

VETERINARSKI GLASNIK

VOL. 66

BROJ 1 - 2

STRANA 1-160

Beograd 2012.

1-2

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. 66 Br. 1-2 Str. 1 - 160 Beograd, 2012.



IZDAVAČ:

FAKULTET VETERINARSKJE 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 Ćupić*

UREĐIVAČKI ODBOR – EDITORIAL BOARD: *Vojin Ivetić, Milovan Jovićin, Vera Katić, Sanja Kovačević-Aleksić, Zoran Kulišić, Zoran Rašić, Horea Šamanc, Vesna Matekalo-Sverak, Jadranka Tijanić, Dragiša Trailović*

MEĐUNARODNI UREĐIVAČKI ODBOR – INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD: *Arturo Anadon (Španija), Horia Cernescu (Rumunija), Toni Dovenski (Makedonija), Petar Džaja (Hrvatska), Marijan Kosec (Slovenija), Mehmed Muminović (Bosna i Hercegovina), Dimitrios Raptopoulus (Grčka), Peter Šotony (Mađarska), Carlo Valente (Italija)*

TEHNIČKI UREDNIK – TECHNICAL EDITOR: *Sandra Dilkić*

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 prosvete i nauke Republike Srbije

Publication of this journal is financially supported by:

Ministry of Education and Science, Republic of Serbia

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

Adresa časopisa:

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

VETERINARSKI GLASNIK

ČASOPIS FAKULTETA VETERINARSKE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

VET. GLASNIK Vol. 66 Br. 1 - 2 str. 1 - 160 Beograd, 2012.

SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

ORIGINALNI RADOVI – ORIGINAL PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

- Cincović M. R., Belić Branislava, Stevančević M., Toholj B., Lako B., Potkonjak A.: Uticaj stepena lipomobilizacije na rezultate testa opterećenja glukozom kod mlečnih krava u toplotnom stresu
Effect of Degree of Lipomobilization on Results of Glucose Test in Dairy Cows in Heat Stress
Влияние степени липомобилизации на результаты теста нагрузки глюкозой у молочных коров в тепловом стрессе 3
- Jonić B., Dimitrijević B., Mirilović M., Obrenović Sonja, Bacić D.: Procena kolostralne zaštite teladi
Evaluation of Colostrum Protection of Calves
Оценка колостральной охраны телят 13
- Prka I., Vuković D., Perković S.: Procenjivanje plodnosti bikova na osnovu nepovraćanja krava (non-return metod)
Evaluating Bull Fertility Based on Non-Return Method
Оценивание плодовитости быков на основе не повторного ведения коров (non return метод) 27
- Vasilev S., Cvetković Jelena, Radović Ivana, Sofronić-Milosavljević Ljiljana: Određivanje vrsta trihinela primenom PCR metode
Identification of the *Trichinella* Species by PCR Method
Молекулярное определение видов трихинелл 41
- Bacić D., Obrenović Sonja, Kirovski M., Dimitrijević B., Radojičić Sonja, Valčić M., Mirilović M.: Ispitivanje zaštitnog dejstva dvovalentne inaktivisane vakcine pripremljene od serotipova 1/2a i 4b *Listeria monocytogenes* na miševima
Investigations of Protective Effects of Bivalent Inactivated Vaccine Prepared from Serotypes 1/2a and 4b *Listeria monocytogenes* on Mice
Испытание предохранительного действия двувалентной инактивационной вакцины, подготовленной от серотипов 1/2a и 4b *Listeria monocytogenes* на мышах 49
- Hostnik P., Maurer Wernig Jedrt, Rihtarić Danijela, Grom J., Malovrh T., Toplak I.: Maintain and Control of Vaccination Belt Along Neighbouring Rabies Infected Area
Održavanje i kontrola vakcinacionog pojasa duž susedne površine inficirane besnilom
Содержание и контроль вакцинационного пояса вдоль соседней поверхности инфицированной бешенством 59

■ Vukašinović V. Marija, Kurćubić S. V., Kaljević M. Vesna, Mašković Z. P., Petrović D. M.: Ispitivanja određenih hemijskih pokazatelja kvaliteta fermentisanih suvih kobasica Examinations of Certain Chemical Characteristics of Fermented Dry Sausage Quality Parameters Испытания определенных химических показателей ферментированных сухих колбас	73	
■ Vesković Moračanin Slavica, Rašeta M., Karan Dragica, Trbović Dejana, Turubatović L., Šaponjić M., Škrinjar Marija: Zlatarski sir – karakteristike tradicionalne proizvodnje i prikaz nekih parametara kvaliteta Zlatar Cheese – Characteristics of Traditional Production and Overview of some Quality Parameters Златарский сыр - характеристики традиционного производства и показ неко- торых параметров качества	85	
PREGLEDNI RADOVI – REVIEW PAPERS – ОБЗОРЫ РАБОТЫ		
■ Kirovski Danijela, Šamanc H., Prodanović R.: Procena energetskeg statusa krava na osnovu koncentracije masti, proteina i uree u mleku Assessment of Dairy Cow Energy Status Using Milk Fat, Protein and Urea Concentrations Оценка энергетического статуса коров на основе концентрации жиров, про- теинов и мочевины в молоке	97	
PRIKAZ SLUČAJA – CASE REVIEW – ОБЗОРЫ РАБОТЫ		
■ Stanojević S., Stanojević S., Mićović Z., Plavšić B.: Slinavka i šap u Turskoj i zemljama Bliskog istoka – epizootiološka situacija Foot and Mouth Disease in Turkey and Middle Eastern Countries – Epizootiological Situation Мыт и ящур в Турции и странах Ближнего Востока - эпизоотологическая ситуация	111	
■ Memiši, Marija Škrinjar, Slavica Vesković-Moračanin: Uticaj higijensko-sanitarnih mera u pogonu za proizvodnju maslaca na mikrobiološku ispravnost finalnog proizvoda Effects of Hygiene-Sanitary Measures on Microbiological Safety of Finished Product in Butter Production Plant Влияние эффектов гигиеническо-санитарных мер в цехе для производства масла на микробиологическую исправность финального продукта	123	
■ Stančić I., Stevančević O., Stančić Jelena, Apić I.: Uticaj sezone na pojavu piometre kod kuja Seasonal Effects on Appearance of Pyometra in Bitches Воздействие сезона на явление пиометры у сук	143	
DIPLOMIRANI STUDENTI - DOKTORI VETERINARSKE MEDICINE – GRADUATE STUDENTS - DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE - ДИПЛОМИРОВАННЫЕ СТУДЕНТЫ - ДОК- ТОРЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ		151
UPUTSTVO AUTORIMA - NOTES FOR CONTRIBUTORS.		157

UTICAJ STEPENA LIPOMOBILIZACIJE NA REZULTATE TESTA OPTEREĆENJA GLUKOZOM KOD MLEČNIH KRAVA U TOPLOTNOM STRESU*

EFFECT OF DEGREE OF LIPOMOBILIZATION ON RESULTS OF GLUCOSE TEST IN DAIRY COWS IN HEAT STRESS

M. R. Cincović, Branislava Belić, M. Stevančević, B. Toholj, B. Lako,
A. Potkonjak**

Krave izložene toplotnom stresu pokazuju umanjenu sposobnost mobilizacije lipida zbog povećane osetljivosti na insulin, što se ogleda u sniženoj koncentraciji neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA). Međutim, pojedine krave mogu da očuvaju nivo lipidne mobilizacije i posle adaptacije na toplotni stres. Pretpostavili smo da su krave koje imaju očuvanu sposobnost da mobilišu lipide manje osetljive na insulin i da slabije tolerišu glukozu. Cilj ovog rada bio je da se uporede rezultati intravenskog testa opterećenja glukozom, kod krava koje su u prolongiranom toplotnom stresu pokazale sniženu (NEFA, $<0,20$ mmol/l) ili očuvanu (NEFA $>0,30$ mmol/l) sposobnost lipidne mobilizacije. Merena je koncentracija glukoze i koncentracija NEFA posle intravenske aplikacije glukoze. Srednja vrednost glikemije nije bila statistički značajno različita između dve grupe krava u 10, 15. i 20. minutu posle aplikacije glukoze ($p > 0,05$), ali je u 10. i 15. minutu postojala tendencija da glikemija bude viša kod krava sa očuvanom lipomobilizacijom ($p < 0,1$). U 30, 60. i 90. minutu posle aplikacije glukoze, glikemija je bila statistički značajno viša ($p < 0,01$; $p < 0,05$ i $p < 0,05$) u grupi krava sa očuvanom lipomobilizacijom. Vrednosti glikemije su bile sledeće: 30. minut – $9,91 \pm 0,21$; $9,23 \pm 0,41$; 60. minut – $5,41 \pm 0,5$; $4,67 \pm 0,33$ i 90. minut $4,31 \pm 0,39$; $3,47 \pm 0,37$ mmol/l. Srednja vrednost koncentracije NEFA u uzorcima koji potiču od dve ogledne grupe krava nije se statistički značajno razlikovala posle aplikacije glukoze. Koncentracija NEFA je bila viša kod krava sa očuvanom lipidnom mobilizacijom u odnosu na krave sa sniženom lipomobilizacijom u 20. i 30. minutu posle

* Rad primljen za štampu 04. 03. 2011. godine

** M sc M. R. Cincović, asistent, dr sc Branislava Belić, vanredni profesor, dr sc Milenko Stevančević, redovni profesor, dr sc B. Toholj, docent, dr sc B. Lako, dr sc A. Potkonjak, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija

aplikacije glukoze ($p < 0,1$). Posle intravenskog testa opterećenja glukozom, koncentracija NEFA i glukoze je u značajnoj negativnoj korelaciji, koja je izraženija kod krava sa smanjenom lipomobilizacijom. Krave sa očuvanom lipomobilizacijom slabije tolerišu glukozu u odnosu na krave sa umanjenom lipomobilizacijom tokom toplotnog stresa.

Ključne reči: krave, toplotni stres, intravenski test opterećenja glukozom, glikemija, NEFA

Uvod / Introduction

Toplotni stres kod mlečnih krava predstavlja veliki ekonomski i zdravstveni problem. Globalno zagrevanje i širenje toplog klimatskog pojasa imaju negativan uticaj na proizvodnju i kvalitet mleka kod mlečnih krava u Srbiji (Cincović i sar., 2009). Raniji rezultati ukazuju na fizičke znake reakcija na toplotni stres, a to su: povišena rektalna temperatura, povišen nivo respiracije i smanjen unos suve materije hrane (Belić i sar., 2010; Cincović i sar., 2011a). Promene u količini i kvalitetu mleka, porast rektalne temperature i porast respiracije predstavljaju značajne elemente kratkotrajne aklimatizacije, a u vezi su sa smanjenim unosom suve materije hrane (Horowitz, 2002). Krave izložene visokoj temperaturi u znatno manjoj meri unose suhu materiju hrane zbog njenog kalorigenog efekta, zbog čega organizam troši sopstvene rezerve i povećava se lipidna mobilizacija (Beede i Colier, 1986). Naša istraživanja na kravama koje su hranjene *ad libitum*, pokazala su da tokom toplotnog stresa postoji diurnalno variranje NEFA, tako da je koncentracija masnih kiselina najviša u toku najtoplijeg dela dana (Cincović i sar., 2010a).

Kasnija istraživanja u kojima su krave kontinuirano više dana izlagane toplotnom stresu pokazuju da je karakterističan nalaz zapravo smanjena koncentracija glukoze i neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) u krvi (Bernabucci i sar., 2010; O'Brien i sar., 2010; Cincović i sar., 2010b). To ukazuje na umanjenu lipomobilizaciju. Ovaj adaptacioni mehanizam nastaje posle nekoliko dana, a objašnjen je povećanom osetljivošću na insulin kod krava u toplotnom stresu. Insulin ima antilipolitički efekat i pospešuje iskorišćavanje glukoze u ćelijama (Randle, 1998), što je dobar adaptacioni mehanizam, jer se sagorevanjem jednog grama masti dobija znatno veća količina toplotne energije. Povišena koncentracija NEFA povezana je sa smanjenom osetljivošću na insulin (Leblanc, 2010). Shodno navedenom, postavljena je hipoteza da krave koje imaju očuvanu sposobnost lipomobilizacije pokazuju manju osetljivost na insulin i da slabije tolerišu glukozu.

Cilj ovog rada bio je da se uporede rezultati intravenskog testa opterećenja glukozom kod krava koje su pokazale sniženu ili očuvanu sposobnost lipidne mobilizacije u prolongiranom toplotnom stresu.

Materijal i metode / *Material and methods*

Organizacija oglada: Oglad je obavljen na 20 krava holštajn-fizijske rase koje su bile u drugom i trećem paritetu i u sredini laktacije. Krave su držane u slobodnom sistemu i hranjene obročno 2 puta dnevno. Ishrana je bazirana na silaži i koncentrovanom delu, shodno potrebama krava. Krave su izmuzane dva puta dnevno u izmuzištima tipa riblja kost sa zatvorenim vakuumskim sistemom. Objekat je imao duboku prostirku, a mikroklimat je kondicioniran ventilatorima.

Ambijentalni uslovi: U svrhu izvođenja oglada krave su tokom 7 sunčanih, letnjih dana držane isključivo u ispustu u periodu između dve muže (od 7 do 19 h). Bile su zaštićene od direktnog sunčevog zračenja. Temperatura i vlažnost vazduha u ispustu mereni su 3 puta dnevno (10 h, 14 h, 18 h) i izračunavan je indeks toplotnog stresa (THI – temperature humidity index). THI je izračunavan prema formuli $mTHI = 0.8 \times MAT + (mRH \times (MAT - 14.4) + 46.4$ (mTHI – srednja vrednost THI, MAT – srednja atmosferska temperatura (°C), mRH – srednja relativna vlažnost u decimalama).

Trijažiranje: Rektalna telesna temperatura, srčana frekvencija i frekvencija respiracije merene su svakodnevno u periodu od 13 do 15 časova po dva puta.

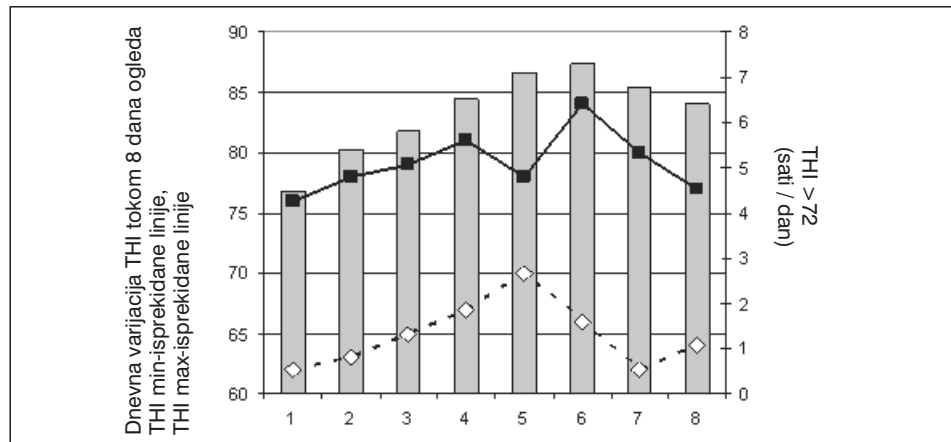
Mlečnost: Proizvodnja mleka merena je svakodnevno od nultog dana oglada u obe muže.

Intravenski test opterećenja glukozom i metaboliti: Sedam dana nakon izlaganja sunčevom zračenju izvršen je kod svih krava intravenski test opterećenja glukozom (0,3 g/kg telesne mase). Sedam dana je potrebno da se u potpunosti ispolji metabolička aklimatizacija na toplotni stres (O'Brien i sar., 2010), što je uslovilo dužinu pripremnog perioda. Glukoza je aplikovana kao sterilni 50% vodeni ratvor. Posle aplikacije glukoze, krv je uzimana 10, 15, 20, 30, 60, 90. i 120. minuta. U uzetoj krvi je određivana koncentracija glukoze (GOT, Point science, USA) i NEFA (enzimski kinetički metod, Randox, UK) pomoću spektrofotometrijskog analizatora Rayto-RT1904C.

Ogledne grupe i statistika. Na osnovu bazalne koncentracije NEFA dobijene od 1. do 7. dana pripremnog perioda formirane su dve grupe krava – grupa krava sa sniženom lipomobilizacijom (12 krava, bazalna koncentracija NEFA < 0,20 mmol/l) i grupa krava sa očuvanom lipomobilizacijom (8 krava, bazalna koncentracija NEFA > 0,30 mmol/l). Ispitivana je statistički značajna razlika (t-test) između prosečnih vrednosti koncentracije glukoze i NEFA kod dve eksperimentalne grupe krava posle aplikacije glukoze. Ispitivan je značaj koeficijenta korelacije između glukoze i NEFA kod dve eksperimentalne grupe krava. Korišćen je XLSTAT-2010 statistički paket.

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Indeks temperature i vlažnosti vazduha (THI, Temperature Humidity Index) ukazuju na blag do umeren toplotni stres (grafikon 1). Znaci adaptacije na toplotni stres su brojni – porast rektalne temperature, porast frekvence respiracije, porast pa pad srčane frekvence i pad proizvodnje mleka. Ove promene se nisu razlikovale u funkciji koncentracije NEFA, pa su predstavljene kao prosečne vrednosti za obe ogledne grupe krava (tabela 1).



Grafikon 1. Vrednost THI u pripremnom periodu (1–7) i na dan izvođenja testa opterećenja glukozom (8) /

Graph 1. THI values at preparatory period (1–7) and on day of glucose tolerance test (8)

Tabela 1. Frekvencija respiracije i srčane kontrakcije, rektalna temperatura i proizvodnja mleka u pripremnom periodu (1–7) i na dan izvođenja testa opterećenja glukozom (8) /

Table 1. Frequency of respiration and heart contractions, rectal temperature, and milk production in preparatory period (1–7) and on day of glucose tolerance test (8)

	Rektalna temperatura <i>Rectal temperature</i>	Količina mleka / <i>Milk yield, L</i>	Respiracija / <i>Respiration, (/min)</i>	Srčana frekvencija / <i>Heart rate, (/min)</i>
1	38,75	21,8	56	52
2	38,91	21,5	61	59
3	39	20,64	63	58
4	39,04	20,12	67	57
5	39,05	19,8	68	55
6	39,23	19,9	68	50
7	39,3	19,5	69	53
8	39,07	20	65	56
Uticaj dana / <i>Day effect</i>	<0,01	<0,05	<0,05	NS

Srednja vrednost glikemije (tabela 2) nije bila statistički značajno različita u 10, 15. i 20. minutu posle aplikacije glukoze ($p > 0,05$), ali je u 10. i 15. minutu postojala tendencija da glikemija bude viša kod krava sa očuvanom lipomobilizacijom ($p < 0,1$). U 30. minutu posle aplikacije, glikemija je bila statistički značajno viša kod krava sa očuvanom lipidnom mobilizacijom u odnosu na krave sa umanjenom lipomobilizacijom ($9,91 \pm 0,21$; $9,23 \pm 0,41$ mmol/l; $p < 0,01$). Krave sa očuvanom lipidnom mobilizacijom su pokazale značajno višu glikemiju u 60. ($5,41 \pm 0,5$; $4,67 \pm 0,33$ mmol/l; $p < 0,05$) i 90. minutu ($4,31 \pm 0,39$; $3,47 \pm 0,37$ mmol/l; $p < 0,05$) posle aplikacije glukoze.

Tabela 2. Koncentracija glukoze u krvi (mmol/l) posle aplikacije glukoze /
Table 2. Glucose concentration in blood (mmol/l) following glucose application

Vreme posle aplikacije glukoze (minuti) / Time after glucose application (minutes)	Koncentracija glukoze (mmol/l) / Glucose concentration (mmol/l)		P
	Krave sa očuvanom lipidnom mobilizacijom / Cows with preserved lipid mobilization	Krave sa sniženom lipidnom mobilizacijom / Cows with decreased lipid mobilization	
0	$2,4 \pm 0,45$	$2,6 \pm 0,51$	NS
10	$8,85 \pm 0,29$	$8,4 \pm 0,58$	NS ($< 0,1$)
15	$8,99 \pm 0,22$	$8,66 \pm 0,41$	NS ($< 0,1$)
20	$9,21 \pm 0,19$	$9,02 \pm 0,12$	NS
30	$9,91 \pm 0,21$	$9,23 \pm 0,41$	$< 0,01$
60	$5,41 \pm 0,5$	$4,67 \pm 0,33$	$< 0,05$
90	$4,31 \pm 0,39$	$3,47 \pm 0,37$	$< 0,05$
120	$3,3 \pm 0,52$	$2,8 \pm 0,55$	NS

Srednja vrednost koncentracije NEFA u uzorcima koji potiču od dve ogledne grupe krava (tabela 3) nije se statistički značajno razlikovala posle aplikacije glukoze. Koncentracija NEFA je pokazivala tendenciju da bude viša kod krava sa očuvanom lipidnom mobilizacijom u odnosu na krave sa sniženom lipomobilizacijom u 20. i 30. minutu posle aplikacije glukoze ($p < 0,1$).

Korelacija između koncentracije glukoze i NEFA posle opterećenja glukozom je negativna u obe grupe krava, ali je izraženija kod krava sa smanjenom lipidnom mobilizacijom ($-0,541$: $-0,612$). Ovaj nalaz nije statistički značajan.

Opseg kretanje glikemije i koncentracije NEFA u krvi posle intraven-skog testa opterećenja glukozom odgovara prethodno dobijenim rezultatima brojnih istraživača (Jaakson i sar., 2010; Šamanc i sar., 2009; Itoh i sar., 1998). Ovo govori u prilog činjenici da krave tokom toplotnog stresa imaju očuvan sistem za održavanje homeostaze glikemije.

Tabela 3. *Koncentracija NEFA u krvi (mmol/l) posle aplikacije glukoze /*
Table 3. NEFA concentration in blood (mmol/l) following glucose application

Vreme posle aplikacije glukoze (minuti) / <i>Time after glucose application (minutes)</i>	Koncetracija NEFA / <i>NEFA concentration (mmol/l)</i>		P
	Krave sa očuvanom lipidnom mobilizacijom / <i>Cows with preserved lipid mobilization</i>	Krave sa sniženom lipidnom mobilizacijom / <i>Cows with decreased lipid mobilization</i>	
0	0,31	0,18	Signifikantno po uslovu ogleda / <i>Significant per experiment conditions</i>
10	0,25±0.09	0,17±0.1	NS
15	0,17±0.09	0,15±0.05	NS
20	0,14±0.05	0,11±0.08	NS (<0,1)
30	0,13±0.07	0,10±0.05	NS (<0,1)
60	0,12±0.04	0,11±0.05	NS
90	0,2±0.025	0,18±0.03	NS
120	0,22±0.05	0,17±0.031	NS

Najveći broj rezultata ukazuje na to da tokom toplotnog stresa dolazi do pada koncentracije NEFA i glukoze, bez obzira na uslove ogleda (Ronchi, 1999; Wheelock i sar., 2010). Snižena koncentracija glukoze, uz povišen klirens glukoze tokom toplotnog stresa nastaju kao rezultat endokrinih izmena, a pre svega zbog porasta koncentracije insulina (Itoh i sar., 1998; O'Brien i sar., 2010). Organizam krava sa očuvanom lipomobilizacijom postaje manje tolerantan na glukozu tokom toplotnog stresa, što se ogleda u znatno višoj koncentraciji glukoze u 30, 60. i 90. minutu posle testa opterećenja.

Poznato je da povišena vrednost NEFA ukazuje na rezistenciju na insulin (Leblanc, 2010; Le Marchan-Brustel i sar., 2003), čime se može objasniti smanjeni klirens glukoze kod krava sa višim vrednostima NEFA tokom toplotnog stresa. Međutim, rezultati kod gojaznih krava koje su izložene toplotnom stresu pokazuju da ove krave imaju značajno višu koncentraciju NEFA, ali značajno nižu glikemiju (Cincović i sar., 2011b), što je iznenađujući nalaz ako se uzme u obzir da su gojazne krave više rezistentne na insulin. Relacija između iskorišćavanja masti i glukoze za održavanje energetske potrebe kod krava u toplotnom stresu zahteva dalje istraživanje.

Zaključak / Conclusion

Krave sa očuvanom lipomobilizacijom slabije tolerišu glukozu u odnosu na krave sa umanjenom lipomobilizacijom tokom toplotnog stresa. Posle intravenskog testa opterećenja glukozom koncentracija NEFA i glukoze je u značaj-

noj negativnoj korelaciji, a ta korelacija je izraženija kod krava sa smanjenom lipomobilizacijom.

NAPOMENA / *ACKNOWLEDGEMENT*

Ovaj rad je deo projekta „TR 31062“, Ministarstvo obrazovanja i nauke Republike Srbije.

Literatura / *References*

1. Beede DK, Collier RJ. Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. *J Anim Sci* 1986; 62: 543-54.
2. Belić B, Cincović MR, Stojanović D, Kovačević Z, Medić S, Simić V. Hematology parameters and physical response to heat stress in dairy cows. *Contemporary agriculture* 2010; 59(1-2): 161-6.
3. Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domestic ruminants. *Animal* 2010; 4(7): 1167-83.
4. Cincović MR, Belić B, Toholj B, Stevančević M. On-farm measurement of heat stress load in dairy cows. *Book of proceedings 12th Middle European Buiatric Congress Pula, Croatia, May 18-22. 2011a*: 285-9.
5. Cincović MR, Belić B, Toholj B, Potkonjak A, Stevančević M, Lako B, Radović I. Metabolic acclimation to heat stress in farm housed Holstein cows with different body condition scores. *African J Biotechnol* 2011b; 10(50): 10293-303.
6. Cincović MR, Belić B, Stojanović D, Kovačević Z, Medić S, Simić V. Metabolic profile of blood and milk in dairy cows during heat stress. *Contemporary agriculture* 2010a; 59(1-2): 167-72.
7. Cincović MR, Belić B, Stevančević M, Lako B, Toholj B, Potkonjak A. Diurnal variation of blood metabolite in dairy cows during heat stress. *Contemporary agriculture* 2010b; 59 (3-4): 300-5.
8. Cincović MR, Belić B. Uticaj termalnog stresa krava na količinu i kvalitet proizvedenog mleka. *Veterinarski žurnal Republike Srpske* 2009; 9(1): 53-6.
9. Horowitz M. From molecular and cellular to integrative heat defence during exposure to chronic heat. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2002; Part A 131: 475-83.
10. Itoh F, Obara Y, Rose MT, Fuse H, Hashimoto H. Insulin and Glucagon Secretion in Lactating Cows During Heat Exposure1. *J Anim Sci* 1998; 76: 2182-9.
11. Jaakson H, Ling K, Samarütel J, Ilves A, Kaart T, Kärt O. Field trial on glucose-induced insulin and metabolite responses in Estonian Holstein and Estonian Red dairy cows in two herds. *Acta Vet Scand* 2010, 52: 4.
12. Leblanc S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J Reprod Dev* 2010; 56: 29-35.
13. Le Marchand-Brustel Y, Gual P, Gremeaux T, Gonzalez T, Barres R, Tanti JF. Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Biochemical Society Transactions* 2003; 31(6): 1152-6.
14. O'Brien MD, Rhoads RP, Sanders SR, Duff GC, Baumgard LH. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 2010; 38: 86-94.

15. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14: 263-83.
16. Ronchi B, Bernabucci U, Lacetera N, Verini Suplizi A, Nardone A. Distinct and common effect of heat stress and restricted feeding on metabolic status in Holstein heifers. *Zootecnica e Nutrizione Animale* 1999; 25: 231-41.
17. Šamanc H, Stojić V, Kirovski D, Pudlo P, Vujanac I. Glucose tolerance test in the assessment of endocrine pancreatic function in cows before and after surgical correction of left displaced abomasum, *Acta Veterinaria (Beograd)* 2009; 59(5-6): 513-23.
18. Wheelock JB, Rhoads RP, VanBaale MJ, Sanders SR, Baumgard LH. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2010; 93: 644-55.

ENGLISH

EFFECT OF DEGREE OF LIPOMOBILIZATION ON RESULTS OF GLUCOSE TEST IN DAIRY COWS IN HEAT STRESS

M. R. Cincović, Branislava Belić, M. Stevančević, B. Toholj, B. Lako, A. Potkonjak

Cows exposed to heat stress exhibit a decreased ability to mobilize lipids due to increased sensitivity to insulin, which is expressed in a decreased concentration of NEFA. However, certain cows can preserve the level of lipid mobilization after adapting to heat stress. We assumed that cows that have a preserved ability to mobilize lipids are less sensitive to insulin and that they have a lower tolerance for glucose. The aim of this work was to compare the results of an intravenous glucose tolerance test in cows that exhibited, in prolonged heat stress, a decreased (NEFA<0.20 mmol/l) or preserved (NEFA>0.30 mmol/l) ability for lipid mobilization. Glucose concentration and NEFA concentration were measured following intravenous application of glucose. The mean glycaemic index value did not differ statistically significantly between the two groups of cows at 10, 15 and 20 minutes after glucose application ($p>0.05$), but there was a tendency at 10 and 15 minutes for the glycaemia to be higher in cows with preserved lipomobilization ($p<0.1$). At 30, 60 and 90 minutes after glucose application, glycaemia was statistically significantly higher ($p<0.01$; $p<0.05$ and $p<0.05$) in the group of cows with preserved lipomobilization. The glycaemic index values (mmol/l) shown in the same order (30, 60 and 90 minutes) were as follows 9.91 ± 0.21 ; 9.23 ± 0.41 ; 5.41 ± 0.5 ; 4.67 ± 0.33 and 4.31 ± 0.39 ; 3.47 ± 0.37 . The mean value for NEFA concentration in samples originating from the two experimental groups of cows did not differ statistically significantly following glucose application. The NEFA concentration showed a tendency to be higher in cows with preserved lipid mobilization in comparison with cows with decreased lipomobilization at 20 and 30 minutes after glucose application ($p<0.1$). Following the intravenous glucose tolerance test, NEFA and glucose concentrations were in a significant negative correlation, and that correlation was more expressed in cows with decreased lipomobilization. Cows with preserved lipomobilization have a lower tolerance for glucose than cows with a decreased lipomobilization during heat stress.

Key words: cows, heat stress, intravenous glucose tolerance test, glycaemia, NEFA

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ЛИПОМОБИЛИЗАЦИИ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕСТА НАГРУЗКИ ГЛЮКОЗОЙ У МОЛОЧНЫХ КОРОВ В ТЕПЛОМ СТРЕССЕ

М. Р. Цинцович, Бранислава Белич, М. Стеванчевич, Б. Тохоль, Б. Лако, А. Потконяк

Коровы, подвергнутые тепловому стрессу показывают уменьшенную способность мобилизации липоидов из-за увеличенной чувствительности на инсулин, что померяется силами в пониженной концентрации НЕФА. Между тем, некоторые коровы могут сохранить уровень липидной мобилизации и после адаптации на тепловой стресс. Предположено нами, что коровы, имеющие сохраненную способность мобилизовать липиды меньше чувствительные на инсулин и слабее относятся терпимо глюкозу. Цель этой работы была сравнить результаты внутривенной глюкозы толеранс теста у коров, которые в пролонгированном тепловом стрессе показали пониженную ($\text{НЕФА} < 0,20$ ммол/л) или сохраненную ($\text{НЕФА} > 0,30$ ммол/л) способность липидной мобилизации. Мерена концентрация глюкозы и концентрация НЕФА после внутривенной аппликации глюкозы. Средняя стоимость гликемии не была статистически значительно различная среди двух групп коров в 10, 15 и 20 минуте после аппликации глюкозы ($p > 0,05$), но в 10 и 15 минуте существовала тенденция, что гликемия будет больше у коров с сохраненной липомобилизацией ($p < 0,1$). В 30, 60 и 90 минуте после аппликации глюкозы, гликемия была статистически значительно больше ($p < 0,01$; $p < 0,05$ и $p < 0,05$) в группе коров с сохраненной липомобилизацией. Стоимости гликемии (ммол/л) показаны таким же порядком (30, 60 и 90 минута) были следующие: $9,91 \pm 0,21$; $9,23 \pm 0,41$; $5,41 \pm 0,5$; $4,67 \pm 0,33$ и $4,31 \pm 0,39$; $3,47 \pm 0,37$. Средняя стоимость концентрации НЕФА в образчиках, присходящие из двух опытных групп коров не статистически значительно различалась после аппликации глюкозы. Концентрация НЕФА показывала тенденцию, что будет более большая у коров с сохраненной липидной мобилизацией в отношении коров с пониженной липомобилизацией в 20 и 30 минуте после аппликации глюкозы ($p < 0,1$). После внутривенной глюкозы толеранс теста концентрация НЕФА и глюкозы в значительной отрицательной корреляции, а эта корреляция более выразительная у коров с пониженной липомобилизацией. Коровы сохраненной липомобилизации слабее относятся терпимо глюкозу в отношении коров с уменьшенной липомобилизацией в течение теплового стресса.

Ключевые слова: коровы, тепловой стресс, внутривенная глюкоза, толеранс тест, гликемия, НЕФА

PROCENA KOLOSTRALNE ZAŠTITE TELADI* *EVALUATION OF COLOSTRUM PROTECTION OF CALVES*

B. Jonić, B. Dimitrijević, M. Mirilović, Sonja Obrenović, D. Bacić**

Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita koncentracija ukupnih proteina i ukupnih imunoglobulina u krvnom serumu teladi i na osnovu toga izvrši procena rizika oboljenja u prvom mesecu života. Ispitivanje je izvedeno na 23 teleta u farmskim uslovima držanja, čije je zdravstveno stanje praćeno u prvom mesecu života. Uzorci krvi uzimani su punkcijom v. jugularis neposredno po rođenju, 24. i 48. sata, a krvni serum je dobijen spontanom koagulacijom. Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu određivana je biuretskom probom, a nivo imunoglobulina refraktometrijskom metodom korišćenjem cink-sulfat testa (ZST).

Prosečna vrednost ukupnih proteina kod teladi neposredno po rođenju bila je niska i iznosila je $42 \pm 0,3$ g/l. Povećanje koncentracije ukupnih proteina kod teladi nakon unošenja kolostruma rezultat je apsorpcije kolostralnih imunoglobulina. Visoka pozitivna korelacija utvrđena je između koncentracije ukupnih proteina i ukupnih imunoglobulina u periodu 24. i 48. sata po rođenju ($r_{xy} = 0,92$ i $r_{xy} = 0,75$). Na osnovu rezultata praćenja zdravstvenog stanja i vrednosti koncentracije ukupnih proteina u ispitivanom periodu (24-og i 48-og sata) moguće je dati sledeću procenu rizika oboljenja novorođene teladi: 1) proteinemija manja od 50 g/l odgovara visokom riziku; 2) proteinemija između 50 i 54 g/l odgovara srednjem riziku i 3) proteinemija između 55 i 69 g/l odgovara malom riziku za pojavu oboljenja novorođene teladi.

Ključne reči: telad, imunoglobulini, rizik, oboljenje

Uvod / Introduction

Značaj pravovremenog uzimanja adekvatne količine kvalitetnog kolostruma proizilazi iz činjenice da se telad rađaju u stanju tzv. fiziološke agama-

* Rad primljen za štampu 26. 09. 2011. godine

** Dr sci. med. vet. Branko Jonić, docent, mr sci. med. vet. Blagoje Dimitrijević, asistent, Katedra za bolesti papkara; dr sci med. vet. Milorad Mirilović, docent, Katedra za ekonomiku i statistiku; dr sci. med. vet. Sonja Obrenović, asistent, dr sci. med. vet. Dragan Bacić, docent, Katedra za zarazne bolesti i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

globulinemije. Naime, sindezmo-horijalni tip placente goveda podrazumeva formiranje sincicijuma između maternalnog endometrijuma i fetalnog trofoektoderma, jasno odvajajući maternalni od fetalnog krvotoka, čime je sprečen prenos imunoglobulina (Ig) (Lazarević i sar., 2010) i drugih makromolekula sa majke na plod (Arthington, 2000). Osim imunoglobulina, kolostrum kao prvi sekret mlečne žlezde sadrži i druge biološki aktivne supstance (peptidne i steroidne hormone, citokine, poliamine, nukleotide, enzime, tiroksin, laktoferin, lizozome, IGF-1, IGF-2 i dr.) koji imaju važnu ulogu u razvoju novorođene teladi (Hagiwara i sar., 2000). Klase imunoglobulina, prisutne u kolostrumu ispoljavaju individualne varijacije u zavisnosti od rase, starosti majke, sezone, ishrane i dr. Ipak, može se reći da u kolostrumu najviše ima IgG (85%), zatim IgM (7%) i IgA (5%) (Kehoe i sar., 2007). Imunoglobulini G klase goveda dele se u dve potklase (G_1 i G_2), koje su u krvi prisutne u približno jednakim koncentracijama, ali s obzirom na to da samo IgG₁ prelazi iz krvotoka u mleko, 90% IgG kolostruma pripada G₁ potklasi (Baintner, 2007).

Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu rezultat je zbira pojedinih proteinskih frakcija – albumina, alfa, beta i gama globulina (Kraft, 1989). Poznato je da je nivo albumina u krvnom serumu novorođene teladi konstantan i da *pp* ishrana kolostrumom ne dovodi do njegove promene (Reid i Clifford, 1974; Schwartz, 1980; Arthington i sar., 2000). Takođe, koncentracija ukupnih proteina u novorođene teladi znatno je niža nego kod odraslih goveda. Po prvom uzimanju kolostruma ove vrednosti se povećavaju od početnih vrednosti (44 – 47 g/l), do prosečnih od 58 g/l i maksimalnih vrednosti od 67 – 74 g/l. Pri tome je utvrđeno da se nivo alfa-globulina ne menja po uzimanju kolostruma, već na ovaj porast utiču beta-globulini do trećeg dana po rođenju i gama-globulini sve do osme nedelje (Larson, 1985).

Uzimanjem kolostruma telad dobijaju zaštitna antitela, tzv. „pasivno stečeni imunitet“. Adekvatan nivo pasivno stečenog imuniteta je izuzetno važan za zdravlje teladi (Wheeler i sar., 2000; Quigley i sar., 2001; Jaster, 2005; Lazarević i sar., 2010). Telad koja imaju izražen „neuspešan prenos pasivnog imuniteta“ – FAILURE OF PASSIVE TRANSFER, predisponirana su prema oboljenjima digestivnog i respiratornog sistema, oboljenjima septikemičnog karaktera kao i drugim sistemskim oboljenjima. Iz ovoga se jasno vidi značaj pasivno stečenog imuniteta (Elizondo-Salazar i Heinrichs, 2008). Utvrđivanje imunskog statusa novorođene teladi, tj. determinacija stepena globulinemije predstavlja dijagnostički postupak od posebnog značaja u kliničkoj praksi, jer se na osnovu ovog parametara odlučuje o pravovremenom preduzimanju preventivnih mera i, u slučaju bolesti, o primeni odgovarajuće terapije (Tyler i sar., 1996; Rea i sar., 1996). Smatra se da je koncentracija IgG₁ u serumu teladi veća od 10 g/l, pokazatelj uspešnog pasivno stečenog imuniteta i da obezbeđuje optimalnu zaštitu teladi na infektivne agense sredine (Parisich, 1990).

Radioimunodifuzija je standardna metoda za određivanje koncentracije Ig (pasivno stečenog imuniteta). Međutim, ovo je vremenski zahtevna metoda i njena primena u rutinskoj dijagnostici trenutno nije izvodljiva. S druge strane, s

obzirom na to da su Ig deo proteinskih frakcija seruma, čija se koncentracija povećava po uzimanju i apsorpciji sastojaka kolostruma, koncentracija ukupnih proteina u serumu se može uzeti kao mera za pasivno stečeni imunitet novorođenčadi (Hopkins i sar., 1984).

Na tržištu postoje komercijalni test paketi (zasnovani na ELISA metodi), ali su prilično skupi i zahtevaju sofisticiranu opremu za izvođenje (Sedlinska i sar., 2005; Vandeputte i sar., 2011). Zbog toga je cilj ovog istraživanja procena imunskog statusa teladi određivanjem koncentracije ukupnih proteina i imunoglobulina u krvnom serumu primenom dva prihvatljiva i pouzdana testa (biuretskog i cink-sulfat testa) za procenu rizika oboljenja teladi u prvom mesecu života.

Materijal i metode / *Material and methods*

U periodu februar-mart, na farmi visokomlečnih krava, holštajn-frijske rase, za ispitivanje su odabrana 23 teleta (10 ženskih i 13 muških). Ova telad su uključena u ispitivanja nakon kliničkog pregleda. Odabrana telad imala su ravnomernu obraslost tela i pupka dlakom, pravilnu probijenost i položaj sekutića u gingivi donje vilice, bez znakova asfiksije i sa minimalnom telesnom masom od 35 kg pri rođenju. Telad kod kojih su bili prisutni klinički poremećaji vitalnosti ili su ustanovljene telesne anomalije kao i blizanci, nisu uključena u ispitivanja.

Za kliničku procenu vitalnosti teladi korišćena je shema prema preporuci VIRGINIA APGAR (1974) koja se koristi u humanoj medicini za procenu vitalnosti novorođene dece. Ova shema koristi se uz određene modifikacije i u veterinarskoj medicini (Borg, 1981). Prema ovoj shemi kod teladi se ocenjuju: reakcija – promena položaja glave nakon termičke stimulacije (hladnom vodom), refleksi očne jabučice i papaka nakon mehaničke stimulacije, disanje i boja sluznica. Za svaki od navedenih parametara dodeljuju se poeni od 0 do 2 (0, 1, 2). Na osnovu zbira poena određuje se stepen vitalnosti novorođene teladi, tako da se klasifikuju kao vitalna (7–8 poena), slabo vitalna (5–6 poena) i avitalna (0–4 poena). Ocenjivanje teladi po ovoj shemi obavljeno je dvokratno (ujutru i uveče) tokom trajanja oglada. Krv teladi dobijena je punkcijom *v. jugularis* neposredno po rođenju, 24. i 48. časa po rođenju. Nakon spontane koagulacije krvi, u izdvojenom krvnom serumu određena je koncentracija ukupnih proteina i ukupnih imunoglobulina.

Telad su u prvih 36 sati života napajana kolostrumom svojih majki, *ad libitum*. Telad oteljena tokom večernjih sati dobila su prvi napoj kolostruma tek narednog dana, nakon jutarnje muže. Telad oteljena u noćnim i jutarnjim satima su takođe dobila prvi napoj kolostruma nakon jutarnje muže. Ovakvim načinom napajanja nije osigurano da svako tele dobije dovoljnu količinu kolostruma između 12 i 36 sati po rođenju, tj. u vremenu kada je apsorpcija Ig još uvek zadovoljavajuća. Od 36. sata života telad su pila zbirno mleko, nakon jutarnje i večernje muže. Temperatura mleka je bila oko 38°C.

Kod teladi koja su pokazivala kliničke znake oboljenja u toku oglada primenjivana je odgovarajuća terapija.

Koncentracija ukupnih proteina određivana je biuretskom metodom, korišćenjem komercijalnog test paketa (Bioanalytica, Srbija), merenjem absorbancije, $\lambda=540$ nm, na spektrofotometru VetScreen, Biochemical Systems (Italy). Rezultati su izraženi u g/l.

Koncentracija ukupnih imunoglobulina određivana je refraktometrijski, cink-sulfat testom. Cink-sulfat test (ZST) izveden je po modifikovanoj McEvan-ovoj metodi (McEvan i sar., 1974). U ovom testu se korišćenjem refraktometra određuje stepen zamućenja (turbidimetrija) nastao dodavanjem 1,7 ml 0,7 mM rastvora cink-sulfata u 25 μ l ispitivanog seruma, upoređivanjem sa zamućenjem standardnog seruma poznate koncentracije (u razblaženjima sa koncentracijom od 4, 8, 10, 15, 20 i 25 g/l). Rezultati su izraženi u ZST jedinicama (g/l). Jedna ZST jedinica odgovara koncentraciji od 1 g/l proteina (McEvan i sar., 1974).

Statistička obrada podataka / *Statistical processing of data*

Dobijeni rezultati obrađeni su deskriptivnim statističkim metodama. Statistička značajnost razlika određena je putem ANOVA testa, korišćenjem Tukey-ovog testa (Graph Pad Prism 4.00, Ca, USA), a minimalni nivo statističke značajnosti je $p < 0,05$.

Rezultati / *Results*

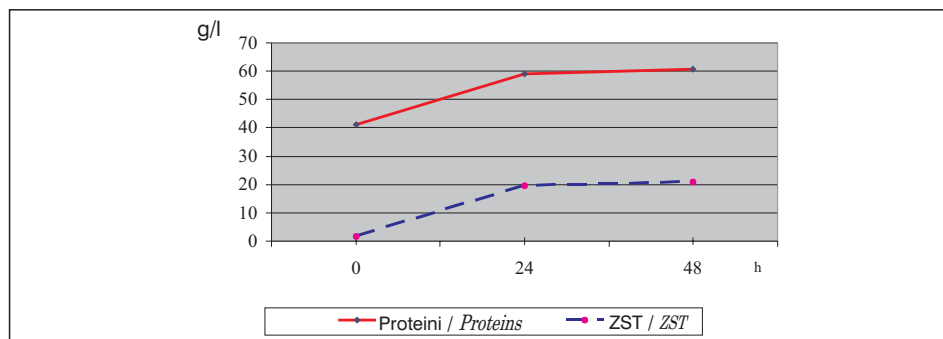
Rezultati ispitivanja koncentracije ukupnih proteina i Ig u ispitivanim periodima prikazani su u tabeli 1 i na grafikonu 1.

Tabela 1. *Deskriptivni statistički parametri koncentracije ukupnih proteina u krvnom serumu teladi (n=23) u ispitivanim periodima / Table 1. Descriptive statistical parameters for concentration of total proteins in blood serum of calves (n=23) for examined periods*

Parametri / <i>Parameters</i>	0 sati / <i>0 hours</i>		24 sata / <i>24 hours</i>		48 sati / <i>48 hours</i>	
	Ukupni proteini <i>Total proteins</i> (g/l)	ZST jedinica <i>ZST unit</i> (g/l)	Ukupni proteini <i>Total proteins</i> (g/l)	ZST jedinica <i>ZST unit</i> (g/l)	Ukupni proteini (g/l)	ZST jedinica <i>ZST unit</i> (g/l)
$\bar{X}$	41,16 ^{xy}	1,65 ^{qw}	59,00 ^x	19,69 ^q	60,68 ^y	21,04 ^w
SD	2,43	0,83	11,69	10,27	8,53	9,91
CV	5,90	57,3	19,81	52,15	14,06	47,10
Sx	0,50	0,27	2,44	2,14	1,78	2,96
IV	35,40-45,24	1-3	45-72	4-38	45-83	6-43

Istim slovima označene su značajne razlike: x, y, q, w, $p \leq 0,01$ /
Same letters mark significant differences: x, y, q, w, $p \leq 0,01$

Na osnovu statističke analize ustanovljeno je da je koncentracija ukupnih proteina neposredno po rođenju (0 sata) iznosila $41,16 \pm 2,43$ g/l, što je statistički značajno manje ($p \leq 0,01$) od koncentracije ukupnih proteina 24 sata posle rođenja $59,00 \pm 11,69$ g/l. Nije ustanovljena signifikantna razlika između koncentracije ukupnih proteina 24 i 48 časova nakon rođenja ($p \geq 0,05$). Gotovo istovetni odnos je ustanovljen poređenjem rezultata ZST. Vrednosti dobijene nultog sata bile su statistički vrlo značajno različite u odnosu na vrednosti ZST nakon 24 sata ($p \leq 0,01$). Poređenjem vrednosti dobijene ZST nakon 24 i 48 sati nije ustanovljena statistička značajnost razlika ($p \geq 0,05$).



Grafikon 1. Prosečne vrednosti koncentracije ukupnih proteina i imunoglobulina u ispitivanim vremenskim periodima /

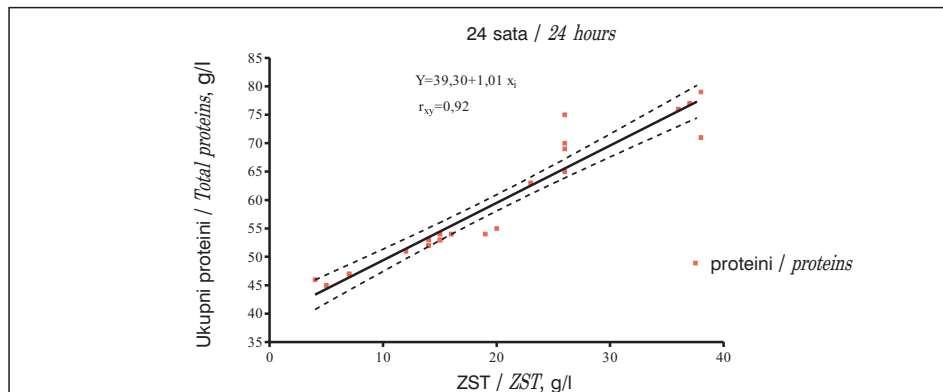
Graph 1. Average values for total protein and immunoglobulin concentrations at examined time periods

Na grafikonu 1 prikazane su srednje vrednosti koncentracije ukupnih proteina i imunoglobulina u serumu ispitivane teladi. Neposredno posle rođenja srednje vrednosti ukupnih proteina u serumu bile su niske, dok su vrednosti imunoglobulina (određene ZST) skoro nemerljive. Jasno povećanje koncentracije ukupnih proteina uočeno je 24. sata života. Ove vrednosti pratilo je i povećanje vrednosti koncentracije ukupnih imunoglobulina. Sledećeg dana (48 sati) vrednosti su dostigle svoj maksimum, $60,68 \pm 8,53$ g/l za ukupne proteine, odnosno $21,03 \pm 9,91$ g/l za imunoglobuline. Odnos prikazan na grafikonu 1 kao i činjenica da su 1/3 proteina imunoglobulini, upućuje na povezanost odnosa ova dva parametra (proteina i imunoglobulina). To je i prikazano u grafikonima 2 i 3, posebno za 24 i 48 sati života teladi.

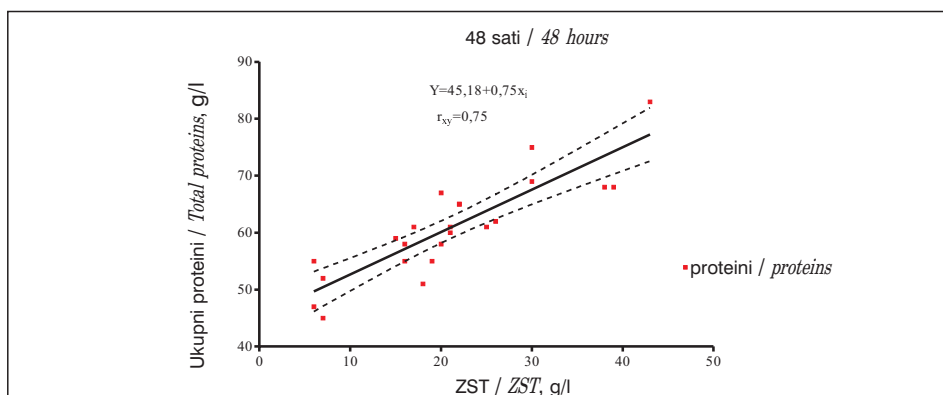
Korelacionom analizom između koncentracije ukupnih proteina i imunoglobulina prva 24 sata posle rođenja ustanovljen je koeficijent korelacije 0,92, a za 48 sati nakon rođenja 0,75. Ovakvi koeficijenti korelacije ova dva parametra predstavljaju visoku korelacionu zavisnost.

Značaj imunog statusa na zdravstveno stanje teladi ustanovljen je praćenjem njihovog zdravstvenog stanja u toku 30 dana, na osnovu sledećih parametara: vremenski interval između porođaja i pojave prvih znakova oboljenja; trajanje tipičnih kliničkih simptoma oboljenja; početak kliničkog poboljšanja; potpuno kliničko izlečenje, ukupno trajanje oboljenja i ocene vitalnosti. Na osnovu

ovih parametara ispitivana telad su podeljena u tri grupe. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 2.



Grafikon 2. Regresiona analiza odnosa koncentracije ukupnih proteina i Ig 24 časa posle rođenja /
Graph 2. Regression analysis of ratio between concentration of total proteins and Ig 24 hours after birth



Grafikon 3. Regresiona analiza odnosa koncentracije ukupnih proteina i Ig 48 časova posle rođenja /
Graph 3. Regression analysis of ratio between concentration of total proteins and Ig 48 hours after birth

Statističkom analizom rezultata ZST ustanovljena je statistički značajno veća koncentracija ($p \leq 0,01$) imunoglobulina kod teladi treće grupe starosti od 24 sata ($30,66 \pm 5,18$) u odnosu na telad druge ($15,40 \pm 2,28$) i prve grupe ($5,75 \pm 1,30$). Takođe je značajno veća i koncentracija imunoglobulina kod teladi druge grupe 24. sata života u odnosu na telad prve grupe. Analizom koncentracije ukupnih proteina kod eksperimentalne teladi ustanovljeno je da je statistički značajno veća koncentracija ukupnih proteina kod III grupe ($71,66 \pm 5,24$) u odnosu na koncentraciju proteina II ($53,10 \pm 8,13$) i I ($45,50 \pm 9,45$) grupe teladi ($p \leq 0,01$).

Tabela 2. Procena uticaja imunog statusa teladi na zdravstveno stanje teladi /
Table 2. Evaluation of effect of calves immune status on their health condition

Grupa / Group	I	II	III
Interval između porođaja i pojave prvih znakova oboljenja (u danima) / Interval between birth and appearance of first signs of disease (in days)	2,25 ± 0,43	5 ± 0,84	15 ± 1,22
Trajanje tipičnih kliničkih simptoma oboljenja (u danima) / Duration of typical clinical symptoms of disease (in days)	11,5 ± 1,80	4,5 ± 0,67	do 36 sati / up to 36 hours
Početak kliničkog poboljšanja (u danima) / Onset of clinical recovery (in days)	14,45 ± 0,5	8,1 ± 0,83	unutar 36 sati / within 36 hours
Potpuno kliničko izlječenje (u danima) / Full clinical recovery (in days)	16,5 ± 0,5	11,1 ± 0,94	za 36 sati / in 36 hours
Ukupno trajanje oboljenja (u danima) / Total duration of disease (in days)	14,24 ± 0,07	6,1 ± 0,05	36 sati / 36 hours
Ocena vitalnosti / Assessment of vitality	3,5 ± 1,2	4,8 ± 2,6	6,8 ± 1,2

Grupa I (n=4) teško obolela telad (telad sa visokim rizikom) /

Group I (n=4) gravely ill calves (high-risk calves)

Grupa II (n=10) srednje obolela telad (telad sa srednjim rizikom) /

Group II (n=10) calves with medium grave disease (medium-risk calves)

Grupa III (n=9) zdrava i lako obolela telad /

Group III (n=9) healthy and calves with mild form of disease

Tabela 3. Vrednosti ispitivanih parametara krvnog seruma teladi podeljene u tri grupe /
Table 3. Values of examined blood serum parameters in three groups of calves

Mere varijacije / Variation measures	Grupa I / Group I (n=4)		Grupa II / Group II (n=10)		Grupa III / Group III (n=9)	
	ZST / ZST (g/l)	Ukupni proteini / Total proteins (g/l)	ZST / ZST (g/l)	Ukupni proteini / Total proteins (g/l)	ZST / ZST (g/l)	Ukupni proteini / Total proteins (g/l)
24 sata / 24 hours						
$\bar{X}$	5,75 ^{xy}	45,5 ^q	15,4 ^{xz}	53,1 ^w	30,66 ^{yz}	71,66 ^{qw}
SD	1,3	9,45	2,28	8,13	5,18	5,24
CV	32,5	20,82	14,18	2,13	19,5	7,32
Sx	0,65	4,73	0,72	0,35	1,99	1,74
IV	4-7	45-47	12-20	51-55	23-38	63-79
48 sati / 48 hours						
$\bar{X}$	6,5 ^{xy}	49,75 ^q	18,9 ^{xz}	59,10 ^w	29,88 ^{yz}	67,77 ^{wq}
SD	0,70	3,86	3,14	4,57	7,92	7,07
CV	7,69	7,8	16,61	7,61	16,50	10,4
Sx	0,25	1,93	0,94	1,47	2,5	2,23
IV	6-7	45-55	15-26	51-65	21-43	61-83

Istim slovima označene su signifikantne razlike: x, y, q, w, p ≤ 0,01 /

Same letters mark significant differences: x, y, q, w, p ≤ 0.01

Kod sve tri grupe teladi 48 časova nakon rođenja između navedenih parametara bile su identične signifikantne razlike. Naime, kod III grupe teladi značajno je veća koncentracija ukupnih proteina i ukupnih imunoglobulina (ZST) u odnosu na I i II grupu teladi ($p \leq 0,01$). Analizom je ustanovljeno da postoji i značajna razlika kod oba parametra između I i II grupe teladi ($p \leq 0,01$).

Diskusija / Discussion

Pre prvog unošenja kolostruma koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu ispitivane teladi prosečno je iznosila $41,16 \pm 2,43$ g/l. Ovim su potvrđeni rezultati ispitivanja Perino i sar. (1993), koji su ustanovili da je gornja granica proteinemije u teladi pre prvog uzimanja kolostruma ispod 42 g/l. Ovakav nalaz proteinemije je prihvatljiv, s obzirom na to da se telad rađaju u stanju fiziološke agamaglobulinemije. Po prvom uzimanju kolostruma prosečne vrednosti koncentracije ukupnih proteina su se povećale na $59,00 \pm 11,69$ g/l, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Larson, 1985). Koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu ispitivane teladi 48 sati posle rođenja iznosila je $60,68 \pm 8,53$ g/l. Ove vrednosti su nešto veće od onih koje u svojim ispitivanjima navode Braun i sar. (1983). Prema navodima ovih autora ovo povećanje je rezultat povećanja koncentracije beta i gama globulina u krvi teladi. Uočeno znatno povećanje nivoa proteina u toku prvog dana života rezultat je uzimanja kolostruma odnosno resorpcije prisutnih antitela (Hopkins, 1984; Perino, 1993). Kao razlozi za varijacije koncentracije ukupnih proteina u krvnom serumu teladi navode se različit sadržaj proteina u kolostrumu, individualna resorptivna sposobnost sluznice creva novorođene teladi i način uzimanja kolostruma (sisanjem ili napajanjem) (Rajala i sar., 1995; Fratrić i sar., 2005). Pasivni imunitet novorođene teladi isključivo se zasniva na uzimanju kolostruma. Između vrednosti koncentracija ukupnih proteina i imunoglobulina prvog i drugog dana života postoji pozitivna korelacija (grafikon 2 i 3), što ukazuje na usku povezanost ova dva parametra (Schwartz, 1980). Pri tome, treba imati u vidu da se sposobnost resorpcije imunoglobulina iz kolostruma smanjuje za 50 % nakon 6 sati, (Fratrić i sar., 2005), a u potpunosti prestaje nakon 24 do 36 sati od rođenja (Elizondo-Salazar i Heinrichs, 2008; Lazarević i sar., 2010; Gvozdić i sar., 2010).

Između refraktometrije i drugih metoda za određivanje koncentracije ukupnih proteina u krvi teladi postoji pozitivna korelacija. Tako je opisana pozitivna korelacija sa koeficijentom korelacije od $r_{xy} = 0,95$ između refraktometrijske i biuretske probe (Sedlinska i sar., 2005). Pozitivnu korelaciju između refraktometrijski dobijenih koncentracija ukupnih proteina i ukupnih imunoglobulina dobijenih agar gel radialnom imunodifuzijom ($r_{xy} = 0,71$) utvrdili su McBeath (1971) i Reid i Clifford (1974), zaključivši da je koncentracija proteina 75% uslovljena promenama koncentracije imunoglobulina (grafikon 1). Na osnovu te činjenice, ovi autori navode da se refraktometrijsko određivanje proteina može smatrati pouzdanim za utvrđivanje koncentracije imunoglobulina u krvnom se-

rumu. Niže koncentracije ukupnih proteina u serumu ogledale su se i u nižim koncentracijama imunoglobulina. Naše ispitivanje je potvrdilo istraživanja ovih i drugih autora (Donovan, 1986; Quigley, 2001; Jaster, 2005), po kojima je veći sadržaj imunoglobulina u krvnom serumu teladi uslovljen većom koncentracijom ukupnih proteina.

Različita patološka stanja, poput, enteropatija, intenziviranje kataboličkih procesa gama globulina, eksikoze (Borg, 1981) dovode do pada ili povećanja ukupnih proteina i promena u relativnom odnosu pojedinih proteinskih frakcija krvnog seruma (Stober i sar., 1990).

Pojedini autori su ispitivali odnos između niskih nivoa imunoglobulina i ukupnih proteina u serumu i povećane prijemčivosti novorođenčadi za infektivna oboljenja. U literaturi su navedene vrednosti koncentracije ukupnih proteina krvnog seruma ispod 58 g/l (Hopkins i sar., 1984) odnosno ispod 60 g/l (Larson, 1985; Biswal i sar., 1993) prvog dana života, koje ukazuju na povećani rizik za nastanak sistemskih oboljenja teladi. Prema drugim autorima, telad sa nivoom proteinemije manjim od 55 g/l češće obolevaju nego ona sa vrednošću iznad 55 g/l. Interesantno je da su niže vrednosti od 50 g/l proteina u serumu ustanovljene kod teladi koja su istovremeno obolevala od dijareje i pneumonije (Beyer, 1988; Mohamed i sar., 1991). Po mišljenju ovih autora, vrednosti koncentracije ukupnih proteina u serumu ispod 50 g/l odraz su smanjenog nivoa imunoglobulina, tako da telad nisu adekvatno zaštićene od izazova sredine. Da bi se smanjio rizik za nastanak oboljenja kod teladi, na osnovu dobijenih rezultata koncentracije ukupnih proteina, Braun i saradnici (1983) smatraju da vrednosti od 55 do 69 g/l ukazuju na optimalnu zaštitu, a da vrednosti ispod 50 g/l ukazuju na nedovoljnu zaštitu i predispoziciju za nastanak bolesnih stanja. Prema novijim saznanjima, kao granična vrednost za dobro snabdevanje adekvatnom količinom kvalitetnog kolostruma smatra se koncentracija ukupnih proteina u krvnom serumu teladi veća od 52 g/l (Wheeler, 2000). U našem ispitivanju telad sa dramatičnom kliničkom slikom (ocena vitalnosti ispod 5) imala su u serumu smanjene vrednosti ukupnih proteina i imunoglobulina u odnosu na telad koja su lakše obolela ili koja nisu ispoljavala kliničke simptome bolesti. Kod teladi sa višim vrednostima koncentracije ukupnih proteina i imunoglobulina u krvnom serumu vreme od pojave prvih kliničkih simptoma bolesti do prvih znakova ozdravljenja bilo je kraće i oporavak je bio brži (tabela 2 i 3).

Zaključak / Conclusion

Rezultati ispitivanja u ovom radu ukazuju na to da je neadekvatna koncentracija imunoglobulina u krvnom serumu teladi direktno povezana sa većim rizikom od nastajanja poremećaja zdravlja pre odlučivanja. To je razlog što se predlaže da se koncentracije imunoglobulina i ukupnih proteina u krvnom serumu, u 24. satu života, koriste kao indikatori stepena imunske zaštite. Određivanje ovih parametara može se izvršiti primenom jednostavnih i pouzdanih me-

toda. Uticaj pasivno stečene imunske zaštite na zdravlje teladi ukazuje na značaj strategije upravljanja u tehnološkom procesu na farmama visokomlečnih krava kako bi se blagovremeno utvrdili propusti u odgoju novorođene teladi i na taj način sprečilo nastajanje bolesnih stanja u ranoj fazi njihovog života.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Ispitivanja u ovom radu deo su istraživačkih faza projekta TR31085 Ministarstva prosvete i nauke, R Srbije / *The investigations carried out within this work were a part of the investigative stages of Project TR31085 of the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia.*

Literatura / References

1. Artington JD, Catell MB, Quigley JD., Hurley WL. Passive immunoglobulin transfer in newborn calves fed colostrum or spray-dried serum protein alone or as supplement to colostrum of varying quality. *J Dairy Sci* 2000; 83(12): 2156-62.
2. Baitner K. Transmission of antibodies from mother to young: Evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 117: 153-9.
3. Beyer C. Gesundheitszustand und Immunstatus neugeborener Kalber nach Gabe des Molkeneiweispulvers COLOSTRIX; Hannover, Tierarztl Hochsch Diss, 1988.
4. Biswal SP, Dutta NK, Mishara PK. Estimation of total serum protein and immunoglobulin level in neonatal calves. *Indian Vet J* 1993; 70: 7-9.
5. Borg L. Quantitative Untersuchungen über den Gesamtein und Immunoglobulin Gehalt im Blutserum kranker, bis zum 12 Wochen alter Kalber mit Hilfe der Refraktometrie, Biuret-methode, Elektrophorese und Nephelometrie. Hannover, Tierarztl Hochsch Diss, 1981.
6. Braun RK, Tennant BC. The relationship of serum G-globulin levels to mortality caused by enteric diseases. *Agri-Practice* 1983; 4: 14-24.
7. Donovan GA, Bading L, Collier RJ, Wilcox CJ, Braun RK. Factors influencing passive transfer in dairy calves. *J Dairy Sci* 1986; 69: 754-9.
8. Elizondo-Salazar JA, Heinrichs AJ. Review: Heat treating bovine colostrum. *Prof Anim Scient* 2008; 24: 530-8.
9. Fratrić N, Stojić V, Janković D, Šamanc H, Gvozdić D. The effect of a clinoptilolite based mineral adsorber on concentrations of immunoglobulin G in the serum of newborn calves fed different amounts of colostrum. *Acta Vet Beograd* 2005; 55(1): 11-21.
10. Gvozdić D, Aleksić J, Fratrić N, Jakić-Dimić D, Stojić V, Pavlović V, Pavlović M, Vakanjac S. Blood serum free amino acids pattern in newborn calves on colostrum diet and orally treated with zeolite. *Acta Vet Beograd* 2010; 60(4): 411-23.
11. Hagiwara K, Kataoka S, Yamanaka H, Kirisawa R, Iwai H. Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; 76: 183-8.
12. Hopkins FM, Dean DF, Greene W. Failure of passive transfer in calves: Comparison of field diagnosis methods. *Mod Vet* 1984; 65: 625-8.
13. Jaster EH. Evaluation of quality, quantity, and timing of colostrum feeding on immunoglobulin G, absorption in Jersey calves. *J Dairy Sci* 2005; 88: 296-302.
14. Kehoe SI, Jayarao BM, Heinrichs AJ. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *J Dairy Sci* 2007; 90: 4108-12.

15. Kraft H. Klinische Labormethoden der Veterinarmedizin bei Haussaugetieren. 3. Auf Verlag Enke Stuttgart, 1989.
16. Larson B. The relationship between total protein in serum, glutaraldehyde coagulation test and disease in feedlot calves. Nord Veterinaarmed 1985; 37: 90-6.
17. Lazarevic M, Spring P, Shabanovic M, Tokic V, Tucker LA. Effect of gut active carbohydrates on plasma IgG concentrations in piglets and calves. Animal 2010; 4-6: 938-43.
18. McBeath DG, Penhale WJ, Logan EF. An examination of the influence of husbandry on the plasma immunoglobulin level of the newborn calf, using a rapid refractometer test of assessing immunoglobulin content. Vet Rec 1971; 88: 266-70.
19. McEvan AD, Fisher EW, Selman IE, Penhale WJ. A turbidity test for the estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. Clin Chim Acta 1974; 27: 129-32.
20. Mohammed HO, Sherer JK, Brennenman JS. Transfer of immunoglobulins and survival of newborn calves. Cornell Vet 1991; 81: 173-82.
21. Parish SM. Ruminant immunodeficiency diseases. In Smith B.P. Large animal internal medicine. St.Louis: CV Mosbey Co 1990; 91-115.
22. Perino LJ, Sutherland RL, Woollen NE. Serum gamma-glutamyltransferase activity and protein concentration at birth and after suckling in calves with adequate and inadequate passive transfer of immunoglobulin G. Am J Vet Res 1993; 1: 56-9.
23. Quigley JD, Kost CJ, Wolfe TM. Absorption of protein and IgG in calves fed a colostrum supplement or replacer. J Dairy Sci 2001; 85: 1243-8.
24. Rajala P, Castren H. Serum immunoglobulin concentrations and health of dairy calves in two management systems from birth to 12 weeks of age. J Dairy Sci 1995; 78: 2737-44.
25. Rea DA, Tyler JW, Hancock DD. Prediction of calf mortality use of tests for passive transfer of colostral immunoglobulin. J Am Vet Med Assoc 1996; 86(7): 2044-9.
26. Reid JFS, Clifford DJ. Use of the refractometer in estimating immune globulin levels of neonatal lamb serum. Vet Rec 1974; 95: 22-5.
27. Schwartz E. Von Vergleichende Untersuchungen zum Immunstatus junger Kalber in den ersten 8 Lebenswochen unter Praxisbedingungen. Hannover, Tierarztl Hochsch Diss, 1980.
28. Sedlinska M, Krejči J, Vyskočil M. Evaluation of field methods for determining immunoglobulins in sucking foals. Acta Vet Brno, 2005; 74:51-8.
29. Stober M, Grunder HD, Kreislauf H. In Dirksen G, Grunder HD, Stober M, Rosenberger G.: Die klinische Untersuchung des Rindes. 3. Auf. Verlag Parey, Berlin, Hamburg, 1990; 171-241.
30. Tyler JW, Hancock DP, Parish SM. Evaluation of three assays for failure of passive transfer in calves. J Vet Intern Med 1996; 10: 304-7.
31. Vandeputte S, Detilleux J, Rollin F. Comparison of four refractometers for the investigation of the passive transfer in beef calves. J Vet Intern Med 2011; 25:1465-9.
32. Wheeler DM, Tyler JW, Van Metre DC, Hostetler DE, Barrington GM. Passive transfer of colostral immunoglobulin in calves. J Vet Intern Med 2000; 14: 569-77.

ENGLISH

EVALUATION OF COLOSTRUM PROTECTION OF CALVES

B. Jonić, B. Dimitrijević, M. Mirilović, Sonja Obrenović, D. Bacić

The aim of these investigations was to examine the concentration of total proteins and total immunoglobulins in blood serum of calves and on the bases of the obtained results to evaluate the risk of their contracting a disease in the first month of life. Examinations were carried out on 23 calves maintained in farm conditions, whose medical condition was monitored in the first month of life. Blood samples were taken by puncture from the *v. jugularis* immediately at birth, and at 24 and 48 hours after that, and blood serum was obtained by spontaneous coagulation. The concentration of total proteins in blood serum was determined using biuretic probe, and the immunoglobulin level using the refractometric method with the zinc-sulphate test (ZST).

The average value of total proteins in calves immediately at birth was low and stood at 42 ± 0.3 g/l. The increased concentration of total proteins in calves after the intake of colostrum is a result of the absorption of colostrum immunoglobulins. A high positive correlation was established between the concentration of total proteins and total immunoglobulins at 24 and 48 hours after birth ($r_{xy} = 0.92$ and $r_{xy} = 0.75$). Based on the results of monitoring the health condition and the values for total protein concentrations during the examined period (24 and 48 hours after birth) it is possible to make the following risk evaluation regarding diseases in newborn calves: 1) proteinaemia lower than 50 g/l presents a high risk; 2) proteinaemia between 50-54 g/l presents a medium risk; and, 3) protein-aemia between 55-69 g/l presents a low risk for diseases occurring in newborn calves.

Key words: calves, immunoglobulins, risk, disease

РУССКИЙ

ОЦЕНКА КОЛОСТРАЛЬНОЙ ОХРАНЫ ТЕЛЯТ

Б. Йонич, Б. Димитриевич, М. Мирилович, Соня Обренович, Д. Баич

Цель этого исследования была испытать концентрацию совокупных протеинов и совокупных иммуноглобулинов в кровяном сыворотке телят и на основе этого совершить оценку риска заболевания в первом месяце жизни. Испытание сделано на 23 телёнка в фермных условиях содержания, чьё состояние здоровья слежено в первом месяце жизни. Образчики крови брали пункцией *v. jugularis* непосредственно после рождения, 24-ого и 48-ого часа, а кровяной сыворотке получен спонтанной коагуляцией. Концентрация совокупных протеинов в кровяном сыворотке определялась биуретической пробой, а уровень иммуноглобулинов рефрактометрическим методом использованием цинк-сульфат теста (ЦСТ).

Средняя стоимость совокупных протеинов у телят непосредственно после рождения была низкая и составляла (в сумме) $42 \pm 0,3$ г/л. Увеличение концентрации совокупных протеинов у телят после внесения колострума результат абсорбции колостральных иммуноглобулинов. Высокая положительная корреляция утверждена между концентрацией совокупных протеинов и совокупных иммуно-

глобулинов в периоде 24-ого и 48-ого часа после рождения ($r_{xy}=0,92$ и $r_{xy}=0,75$). На основе результатов слежки состояния здоровья и стоимости концентрации совокупных протеинов в испытыванном периоде (24-ого и 48-ого часа) возможно дать следующую оценку риска заболевания новорождённых телят: 1) протеинемия меньше 50 г/л отвечает высокому риску; 2) протеинемия среди 50-54 г/л отвечает среднему риску и 3) протеинемия среди 55-69 г/л отвечает маленькому риску для заболевания новорождённых телят.

Ключевые слова: телята, иммуноглобулины, риск, заболевание

**PROCENJIVANJE PLODNOSTI BIKOVA NA OSNOVU
NEPOVAĐANJA KRAVA (NON-RETURN METOD)***
EVALUATING BULL FERTILITY BASED ON NON-RETURN METHOD

I. Prka, D. Vuković, S. Perković**

Za ocenu reproduktivnih rezultata krava i junica koriste se različiti parametri plodnosti i to servis period, indeks osemenjavanja, međute-lidbeno vreme i drugo, a za bikove u priplodu vrednosti dobijene non-return metodom. Da bi ejakulat u Centrima za v.o. bio uzet u dalju obradu potrebno je da se zadovolje propisani parametri kvaliteta. Oce-na parametara ejakulata obuhvata makroskopsku (volumen, boja, kon-zistencija, miris i pH vrednost) i mikroskopsku ocenu (pokretljivost, gustina, procenat živih i patološki oštećenih spermatozoida).

Pored kvaliteta sperme i plodnosti ženske jedinke, na rezultate non-return metode utiče i čitav niz egzogenih uzroka (godišnje doba, starost, rasa, tehnika osemenjavanja) koji imaju ne mali uticaj na krajnji rezultat osemenjavanja – steonost.

U cilju dobijanja što objektivnijeg rezultata plodnosti bikova, pris-tupilo se rešavanju sledećih zadataka: 1. da se non-return metodom izračuna plodnost bikova na preko 10.000 po prvi put osemenjenih krava – junica, u periodu od 6 godina i 2. da se analizira uticaj kvaliteta semena, godišnjeg doba, starosti plotkinje i bika, rase bika na dobijene rezultate plodnosti.

Ključne reči: parametri plodnosti, ejakulat bika, parametri kvaliteta, non-return metod.

Uvod / Introduction

Proizvodnja kvalitetnog duboko zamrznutog semena je preduslov sa uspešno veštačko osemenjavanje. U centrima za veštačko osemenjavanje u oceni plodnosti bikova vrlo često se koristi non-return metod, čije se vrednosti unose pored selekcijskih osobina i u katalog bikova.

* Rad primljen za štampu 29. 06. 2011. godine

** Igor Prka, dr vet. spec., Stočarsko-veterinarski centar Krnjača, Beograd; dr sci. med. vet. Dragan Vuković, profesor, Katedra za porodiljstvo, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veteri-narske medicine, Srbija; dr Stevan Perković, naučni savetnik, Stočarsko-veterinarski centar Krnjača, Beograd

Non-return metod je definisan kao mera broja i procenta osemenjenih plotkinja u određenom vremenskom periodu. Ako se za 60 do 90 dana ili izostanka 3 do 4 očekivanih ciklusa nisu „vratile“ na ponovno osemenjavanje pretpostavlja se da su steone. Na rezultate ove metode utiče čitav niz činilaca od kojih su na prvom mestu oplodna sposobnost (kvalitet) sperme i fertilitet ženske jedinke. Pored ovih postoje i mnogobrojni egzogeni uzroci (klima, starost, rasa, tehnika osemenjavanja), koji imaju ne mali uticaj na krajnji rezultat osemenjavanja – steonost. Metode korišćene za procenu plodnosti treba da budu praktične, precizne, da daju rezultate i da budu ekonomične. Non-return je pokazatelj, ali nije direktno merenje plodnosti. Takođe, rezultati steonosti dobijeni na ovaj način su za nekih deset posto veći od onih dobijenih rektalnim ili ultrazvučnim pregledom. Osim same plodnosti na pouzdanost podataka mogu uticati i sledeće situacije: pogrešna identifikacija krave kod narednog osemenjavanja, prodaja negravidnih životinja, kasnije parenje sa bikom ili osemenjavanje od strane drugog centra za v.o. U domaćoj stručnoj literaturi malo je i skoro nikako obrađivana tematika koja se bavi odnosom parametara kvaliteta semena koji se određuju u laboratorijama Centara za v.o. i rezultatima plodnosti bikova koji se prikupe sa terena non-return metodom. Kada je reč o stranoj stručnoj literaturi situacija je nešto bolja. Postoje radovi koji se bave analizom uticaja kvaliteta semena i rezultata plodnosti bika na terenu.

Zaključak je da prilikom analize rezultata veštačkog osemenjavanja dobijenih non-return metodom treba uzimati u obzir sve navedene faktore, radi dobijanja što tačnijih rezultata plodnosti bikova u priplodu.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Ispitivanje je obavljano na 30 bikova iz Stočarsko-veterinarskog centra Krnjača koji pripadaju različitim rasama: 3 monbelijar, 23 simentalske, 2 holštajn-frizijske, 1 crveni holštajn i 1 šarole rase. Analizom je obuhvaćeno preko 10.000 prvi put osemenjenih krava i junica u periodu od 1999. do 2004. god., sa područja opština Leskovac, Vučje, Vladičin Han i Surdulica. Korišćeni su podaci dobijeni iz uredno i precizno vođenih evidencija o osemenjavanju (Knjiga za v.o.krava) na području rada veterinarskih stanica i ambulant iz pomenutih opština. Za analizu vrednosti parametara kvaliteta ejakulata ispitivanih bikova korišćeni su podaci iz Knjige uzimanja semena arhive laboratorije SVC Krnjača. Seme je uzimano dva puta nedeljno. Podaci o svim parametrima kvaliteta semena prikupljeni su i obrađeni za period od 1999. do 2004. god. Uzimanje semena je vršeno pomoću veštačke vagine. Posle pravilne pripreme bika, veštačke vagine, skoka bika i uzimanja semena, seme je obezbeđeno u vodenom kupatilu na temperaturi od 38°C. Obrada dobijenog ejakulata bika podrazumeva postupke koji se odvijaju u laboratoriji: obezbeđenje ejakulata, procenu, razređenje, zamrzavanje, odmrzavanje i ponovnu procenu zamrzavanog semena.

Rezultati / Results

Korelacija između procene kvaliteta semena i plodnosti bika (non-return) / Correlation between evaluation of semen quality and bull fertility (non-return)

Za posmatrani period od 6 godina, prosečno je dobijeno 6,54 ejakulata mesečno ($p < 0,05$). Procenat upotrebljivih ejakulata za sve bikove je 90,87 ($p < 0,05$). Prosečna količina upotrebljivih ejakulata po bikovima je 6,50 ml ($p < 0,05$). Prosečna koncentracija spermatozoida u upotrebljivim ejakulatima (mlrd/ml) za sve bikove je 1,44 ($p < 0,05$). Prosečan procenat živih spermatozoida u upotrebljivim ejakulatima je 82,99%, dok procenat progresivno pokretljivih spermatozoida u upotrebljivim ejakulatima iznosi 83,22% ($p < 0,05$).

Tabela 1. Procenat steonosti dobijen non-return metodom (60–90 dana), po bikovima za period od 1999. do 2004. god. /

Table 1. Fertility percentage obtained by non-return method (60–90 days), per bull for period from 1999 to 2004.

R. br. / No.	Ime bika / Bull name	Broj / Bull number	Rasa / Breed	I put v.o. / Times a.i.	Povađanja / Breeding		% steonosti / % fertility
					I	II	
1.	TARAS	HB 1110	Monbeliar / <i>Monbeliarde</i>	545	172	35	68,44
2.	FARAON	HB 1452	Monbeliar / <i>Monbeliarde</i>	157	50	5	66,92
3.	FILIP	HB 1000	Monbeliar / <i>Monbeliarde</i>	335	109	13	65,71
4.	SAŠA	HB 1051	Simentalac / <i>Simmental</i>	69	12	5	82,61
5.	ERC	HB 1377	Simentalac / <i>Simmental</i>	341	63	29	81,52
6.	HOMER	HB 1032	Simentalac / <i>Simmental</i>	1.180	260	65	77,97
7.	MIRAŽ	HB 1326	Simentalac / <i>Simmental</i>	69	15	6	78,26
8.	FAKTOR	HB 1512	Simentalac / <i>Simmental</i>	110	24	16	78,18
9.	REGENT	HB 1448	Simentalac / <i>Simmental</i>	116	26	19	77,59
10.	SAVA	HB 1416	Simentalac / <i>Simmental</i>	210	49	12	76,67
11.	MOLER	HB 1318	Simentalac / <i>Simmental</i>	245	64	13	73,88
12.	HORN	HB 1333	Simentalac / <i>Simmental</i>	141	36	11	73,51
13.	VALTER	HB 1450	Simentalac / <i>Simmental</i>	30	8	5	73,33

nastavak Tabele 1. / *cont Table 1*

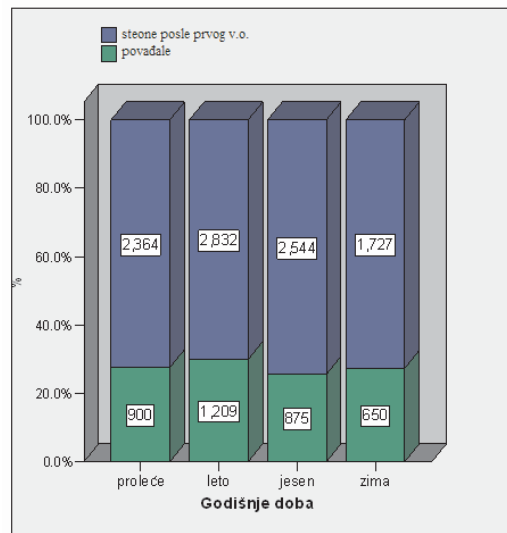
R. br. / No.	Ime bika / Bull name	Broj / Bull number	Rasa / Breed	I put v.o. / Times a.i.	Povađanja / Breeding		% steonosti / % fertility
					I	II	
14.	ZUMBUL	HB 1287	Simentalac / <i>Simmental</i>	1.322	351	56	73,45
15.	SPOT	HB 1376	Simentalac / <i>Simmental</i>	415	115	22	72,29
16.	ZMAJ	HB 1143	Simentalac / <i>Simmental</i>	1.131	322	49	71,53
17.	MIG	HB 1373	Simentalac / <i>Simmental</i>	763	218	45	71,43
18.	VOSTOK	HB 1394	Simentalac / <i>Simmental</i>	623	178	34	71,42
19.	SULTAN	HB 1447	Simentalac / <i>Simmental</i>	841	243	47	71,11
20.	VITEZ	HB 1380	Simentalac / <i>Simmental</i>	833	246	43	70,47
21.	ZAHAR	HB 1319	Simentalac / <i>Simmental</i>	2.119	618	36	70,84
22.	HOGAR	HB 868	Simentalac / <i>Simmental</i>	364	82	28	77,47
23.	VULKAN	HB 1424	Simentalac / <i>Simmental</i>	26	14	2	46,15
24.	DESPOT	HB 1515	Simentalac / <i>Simmental</i>	121	38	9	68,60
25.	HONUS	HB 1378	Simentalac / <i>Simmental</i>	64	23	8	64,06
26.	HOBAL	HB 1397	Simentalac / <i>Simmental</i>	3	-	-	-
27.	IVAN	HB 1467	HF / <i>HF</i>	436	145	17	66,74
28.	RUBENS	HB 1611	HF / <i>HF</i>	134	40	5	70,15
29.	KLIF	HB 1601	RH / <i>RH</i>	270	86	9	68,15
30.	EKSIT	T-101	Šarole / <i>Charolais</i>	88	27	3	69,32
Ukupno / <i>Total</i>				13.101	3.634	650	72,26

Ukupno je bilo 13.101 osemenjavanja po prvi put, a 3.634 krave su povadale posle 60–90 dana; ukupna prosečna steonost je 72,26% po non-return metodi. Dobijena je statistički značajna razlika između non-return rezultata bikova ($p < 0,05$).

Uticaj klimatskih faktora (godišnjeg doba – sezone) na kvalitet semena i rezultate steonosti dobijene non-return metodom /

Effect of climatic factors (season) on semen quality and fertility results obtained using non-return method

Parametri kvaliteta semena i rezultati steonosti dobijeni non-return metodom prikazani su po godišnjim dobima i mesecima. Proleće obuhvata mart, april i maj, leto jun, jul i avgust, jesen septembar, oktobar i novembar, a zima decembar, januar i februar. Najmanji broj skokova bio je leti, 15,21, a najveći u proleće, 20,43 ($p < 0,05$). Najmanji broj upotrebljivih ejakulata dobijen je u leto, 14,09, a najveći u proleće, 18,60 ($p < 0,05$). Procenat upotrebljivih ejakulata najmanji je u septembru 87,45%, a najveći u decembru, 94,08% ($p > 0,05$). Količina upotrebljivih ejakulata najveća je u decembru 6,68 ml, a najmanja u februaru, 6,22 ml. Dobijena razlika između meseci u količini upotrebljivih ejakulata nije statistički značajna ($p > 0,05$). Najveća prosečna koncentracija spermatozoida u upotrebljivim ejakulatima bila je u novembru, 1,52 mlrd/ml, a najmanja u junu, 1,35 mlrd/ml, odnosno u proleće je bila 1,49 mlrd/ml, a najmanja je bila leti, 1,37 mlrd/ml ($p > 0,05$). Najmanji prosečan procenat živih spermatozoida u upotrebljivim ejakulatima po mesecima bio je u avgustu 81,73%, a najveći u martu, 83,94%; posmatrano po godišnjim dobima najmanji je leti, 82,57%, a najveći u proleće, 83,78% ($p > 0,05$). Slični rezultati su dobijeni i za prosečan procenat progresivno pokretljivih spermatozoida u upotrebljivim ejakulatima. Najmanji proce-



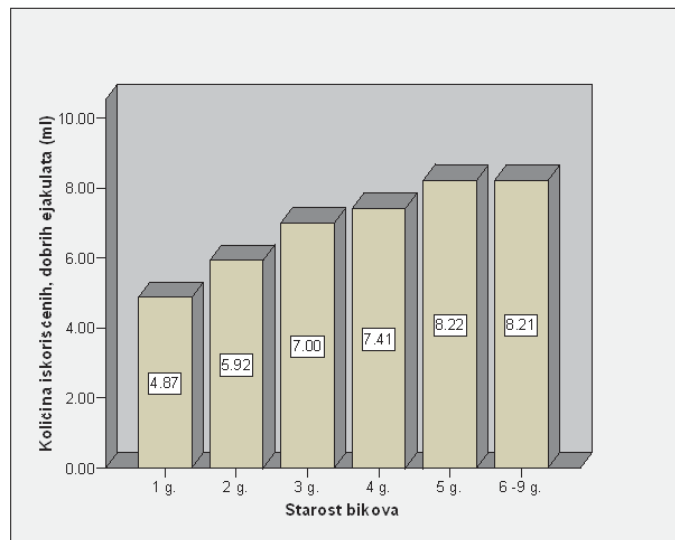
Grafikon 1. Procenat steonosti dobijen non return metodom (60–90 dana), po godišnjim dobima za period od 1999. do 2004. god. /

Graph 1. Fertility percentage using non-return method (60–90 days), per seasons for period from 1999 to 2004.

nat steonosti po non-return metodi bio je leti, 70,1%, u proleće 72,4%, a zimi 72,7%; najveći je bio u jesen 74,4%. Utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u procentu steonosti po godišnjim dobima (grafikon 1).

Uticaj starosti plotkinje i bika na kvalitet semena i rezultate steonosti dobijene non-return metodom / Effect of cow and bull age on semen quality and fertility results obtained using non-return method

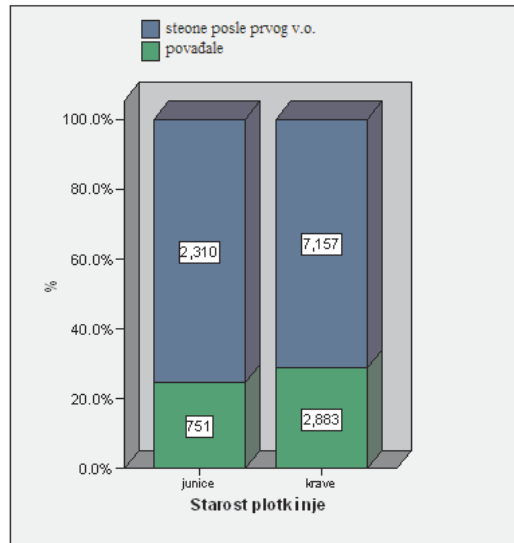
Najmanji broj upotrebljivih ejakulata mesečno bio je kod bikova starih godinu dana, 4,67, zatim kod bikova starih između 6 i 9 godina 6,07. Najveći prosečan broj upotrebljivih ejakulata po mesecu bio je kod bikova starih 5 godina, 6,38, i onih starih 2 godine, 6,36. Dobijena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između bikova različite starosti u broju upotrebljivih ejakulata. Najmanji procenat upotrebljivih ejakulata imali su jednogodišnji bikovi, 85,38%, a najveći bikovi stari 4 godine, 93,42% ($p < 0,05$). Za posmatrani period, najmanju prosečnu količinu upotrebljivih ejakulata (ml) imali su bikovi stari 1 godinu, 4,87ml, a najveću bikovi stari 5 godina, 8,22 ml (grafikon 2). Dobijena je statistički značajna razlika u prosečnoj količini upotrebljivih ejakulata među bikovima različite starosti ($p < 0,05$). Najmanju prosečnu koncentraciju spermatozoida (mlrd/ml) imali su bikovi stari godinu dana, 1,31 mlrd/ml, a najveću bikovi stari 5 godina, 1,49 mlrd/ml ($p < 0,05$). Najmanji procenat živih spermatozoida u upotrebljivim ejakulatima imali su bikovi stari 5 godina, 81,84%, a najveći bikovi stari 2 godine, 83,55%. Dobijena razlika u procentima živih spermatozoida među bikovima različite starosti



Grafikon 2. Količina upotrebljivih ejakulata (ml) po starosti bikova za period od 1999. do 2004. god. /

Graph 2. Quantity of usable ejaculate (ml) per bull age for period from 1999 to 2004.

nije statistički značajna ($p > 0,05$). Slični rezultati su dobijeni i za prosek progresivno pokretljivih spermatozoida u upotrebljivim ejakulatima. Procenat steonosti dobijen non return metodom (60–90 dana), po starosti plotkinje za period 1999–2004.god. bio je najmanji kod krava 71,3%, a najveći kod junica 75,5% (grafikon 3). Utvrđena je statistički značajna razlika u procentu steonosti dobijena non-return metodom po starosti plotkinje ($p < 0,05$).



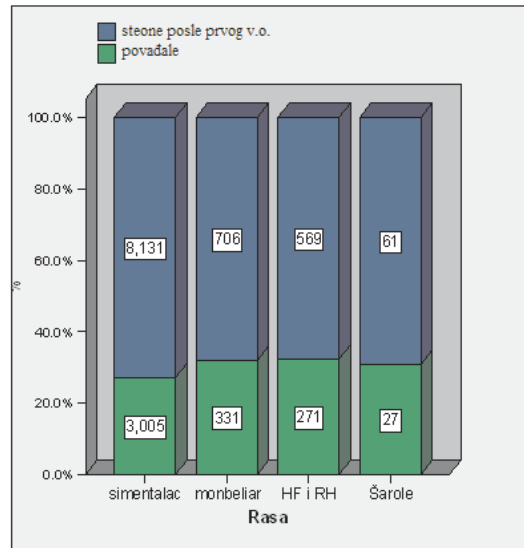
Grafikon 3. Procenat steonosti dobijen non-return metodom (60–90 dana), po starosti plotkinje za period od 1999. do 2004.god. /

Graph 3. Fertility percentage obtained using non-return method (60–90 days), per cow age for period from 1999 to 2004.

Uticaj rase bika na kvalitet semena i rezultate steonosti dobijene non-return metodom /Effect of bull breed on semen quality and fertility results obtained using non-return method

Najviše je dobijeno semena od bikova simentalske rase, 6,67 a najmanje od šarole rase, 4,29. Postoji statistički značajna razlika između bikova različitih rasa u broju skokova ($p < 0,05$) kao i u broju upotrebljivih ejakulata. Najniži procenat upotrebljivih ejakulata je kod šarole rase, 86,21%, a najveći je kod HF i RH rase, 92,49% ($p > 0,05$). Prosečno najveću količinu ejakulata po skoku (ml) dali su bikovi šarole rase, 10,20 ml, a najmanju HF i RH rase, 5,53 ml ($p < 0,05$). Inače, najveću prosečnu koncentraciju spermatozoida (mlrd/ml) imali su bikovi monbeliar rase, 1,56 mlrd/ml, a najmanju šarole rase, 1,41 mlrd/ml ($p < 0,05$). Najmanji prosečan procenat živih spermatozoida utvrđen je kod bikova šarole rase, 81,63%, a najveći kod monbeliara, 83,50%. Utvrđena razlika među

bikovima u procentu živih spermatozoida nije statistički značajna ($p > 0,05$). Slični rezultati su dobijeni i za prosečan procenat progresivno pokretljivih spermatozoida u upotrebljivim ejakulatima. Najmanji procenat steonosti po non-return metodi bio je kod bikova HF i RH rase, 67,7%, a najveći kod bikova simentalke rase, 73,0% (grafikon 4). Utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u procentu steonosti dobijena non-return metodom u odnosu na rasu bika.



Grafikon 4. Procenat steonosti na terenu dobijen non-return metodom (60–90 dana), u odnosu na rasu bika za period od 1999. do 2004. god. /

Graph 4. Fertility percentage in the field obtained using non-return method (60–90 days), per bull breed for period from 1999 to 2004.

Diskusija / Discussion

Cilj ovog rada bio je da se pokaže u kojoj meri parametri kvaliteta semena priplodnih bikova utiču na procenat koncepcije plotkinja dobijen non-return metodom, kao i značaj paragenetskih faktora kao što su godišnje doba, starost plotkinje i bika, rasa bika na rezultate dobijene non-return metodom i na kvalitet semena. Među bikovima postoji statistički značajna razlika u broju skokova ($p < 0,05$), ali ne postoji korelacija između broja skokova i plodnosti bika ($p > 0,05$). Slični rezultati su dobijeni i u vezi sa prosečnim brojem i procentom upotrebljivih ejakulata mesečno, odnosno postoji razlika među bikovima, ali ne i statistička značajnost.

Kada je u pitanju količina (ml) upotrebljivih ejakulata takođe postoji značajna razlika između bikova, ali ne i korelacija sa plodnošću. Prva četiri bika

(Eksit, Zumbul, Homer i Taras) sa najvećom prosečnom količinom ejakulata nisu imali i najveću koncepciju po non-return metodi ($p > 0,05$). Broj spermatozoida, tj. koncentracija u upotrebljivim ejakulatima varira od 1,24 do 2,12 mlrd/ml i ta razlika je statistički značajna ($p < 0,05$). Prva tri bika sa najvećom prosečnom koncentracijom (Faktor 2,19, Despot 1,94 i Rubens 1,85 mlrd/ml) imali su i visok procenat koncepcije non-return metodom (78%, 68% i 70%). Procenat živih i progresivno pokretljivih spermatozoida je približno isti i takođe varira kod različitih bikova, ali u uskim granicama, od 79,8% do 82,99% za žive i 83,22% i 87,78% za progresivno pokretljive. Što se tiče korelacije sa rezultatima koncepcije izdvajaju se bikovi Zmaj, Faktor i Miraž sa visokim procentom živih i progresivno pokretljivih spermatozoida a imaju i visok procenat non-returna.

Iz dobijenih rezultata može se videti da većina parametara nije u korelaciji sa plodnošću bika na terenu. Tu se izdvajaju koncentracija i procenat živih i progresivno pokretljivih spermatozoida čije se visoke vrednosti donekle poklapaju sa dobrim rezultatima koncepcije pojedinih bikova ($p < 0,05$). Izostanak veće korelacije ovih vrednosti može se objasniti strogom kontrolom kvaliteta semena u laboratoriji, odbacivanjem loših a obradom dobrih ejakulata koji zadovoljavaju postavljene standarde. Tako svaka doza semena koja odlazi na teren ima minimum 20 miliona spermatozoida i 60% živih i progresivno pokretljivih spermatozoida; dalje, čuva se u odgovarajućim uslovima, a u stanicama i ambulantama iz kojih su i prikupljeni podaci, sa semenom se rukuje na pravilan način. Može se reći da je svaka doza semena približnog kvaliteta, a da se razlike odnose na genetski materijal koji svaki spermatozoid nosi sa sobom (individualne osobine bika). Kako se vidi u dobijenim rezultatima ovog istraživanja, procenat pokretljivosti spermatozoida jeste u korelaciji sa plodnošću bika na terenu ($p < 0,05$), što potvrđuju i Salisbury i sar. (1973).

Koncentracija spermatozoida koja je povezana sa procentom koncepcije, pokazuje da je raspon broja spermatozoida u dozi prilično širok i da sa smanjenjem koncentracije nije bilo smanjenja rezultata plodnosti (Foote i sar., 1997; Koops i sar., 1995). Klimatski faktori su se pokazali kao značajni i na njih treba obraćati pažnju prilikom procene parametara kvaliteta semena i tumačenja rezultata plodnosti dobijenih non-return metodom.

Između broja skokova i godišnjih doba postoji signifikantna razlika ($p < 0,05$). Najmanji broj skokova je leti (prosečno 15,21) i to u avgustu (4,05), što je u korelaciji sa procentom koncepcije po non-return metodi koja je najmanja u letnjim mesecima (70,01%). Slični su rezultati i što se tiče prosečnog broja i procenta upotrebljivih ejakulata koji se razlikuju po godišnjim dobima i mesecima, tako da je najmanji broj i procenat u leto, što je u korelaciji sa procentom steonosti po non-return metodi ($p < 0,05$). Količina (ml) dobijenih upotrebljivih ejakulata i godišnja doba su u pozitivnoj korelaciji ($p < 0,05$). U jesen je u proseku dobijeno 6,55 ml što se slaže sa rezultatima steonosti po non-return metodi, koji su takođe najbolji u jesenjim mesecima (74,40%). Broj spermatozoida (koncentracija u 1 ml) u upotrebljivim ejakulatima se razlikuje po mesecima i godišnjim dobima.

Najmanja koncentracija je zabeležena tokom letnjih meseci i to u junu mesecu (1,35 mlrd/ml). Taj podatak se poklapa sa najmanjim procentom koncepcije po non-return metodi, takođe leti. Procenat živih i progresivno pokretnih spermatozoida čije su vrednosti približne, najmanje su leti i to u avgustu mesecu (81,73% i 81,92%). To se takođe poklapa sa rezultatima koncepcije koja je po non-return metodi najmanja u letnjim mesecima.

Kada se tumače rezultati ovog istraživanja treba imati u vidu da se u julu i avgustu pravi pauza u uzimanju semena zbog visokih temperatura, pa lošije rezultate koji se odnose na broj skokova treba uzeti sa rezervom.

U stranoj literaturi efekat godišnjeg doba se takođe navodi u nekoliko radova. Rezultati koji su dobijeni u sličnim klimatskim uslovima kao što ih ima naša zemlja potvrđuju rezultate ovog rada da je tokom letnjih meseci uočljiv pad kvaliteta semena (Rhynes i Ewing, 1973). Tucker i Oxender (1980) su takođe analizirali sezonske efekte na plodnost mužjaka. Dobili su rezultate koji su pokazali da je u hladnijim klimatskim uslovima plodnost niža zimi i to kod bikova starijih od 6 godina. Non-return vrednosti su bile najmanje za seme uzimano od bikova tokom avgusta i septembra, a oštećenja spermatozoida koji su prošli zamrzavanje bilo je brže leti nego kod semena koje je uzimano tokom kasne jeseni i proleća. U istraživanju sprovedenom u ovom radu, najbolji rezultati plodnosti non-return metodom su dobijeni u jesenjim mesecima, 74,4%, potom zimi, 72,7%, u proleće 72,4% i u leto 70,1%. Rezultati drugih autora u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim u ovom radu (Al-Katanani i sar., 1999; Rao i sar., 1992; Fryer i sar., 1958; Guaita i sar., 1996; Miglior i sar., 1999; Miah i sar., 2004; Ravagnolo i Misztal, 2002; Taylor i sar., 1985; Gwazdauskas i sar., 1985).

Autori koji su dobili bolje rezultate plodnosti po non-return metodi u letnjim mesecima objašnjavaju to klimatskim uslovima iz kojih dolaze ti podaci. U pitanju su zemlje severne Evrope gde letnje dnevne temperature retko prelaze 25°–28°C (Zakari i sar., 1981; Stalhammar i sar., 1994; Reurink i sar., 1990; Hasenpusch, 2006). Kada je u pitanju uticaj starosti bika na kvalitet semena i rezultate steonosti dobijene non-return metodom, broj skokova mesečno po starosti bika i procenat upotrebljivih ejakulata mesečno po istom kriterijumu pokazuju da su najmanje vrednosti u kategoriji jednogodišnjih bikova. Ovi parametri i njihove vrednosti nisu u korelaciji sa rezultatima steonosti po non-return metodi ($p < 0,05$). Postoji signifikantna razlika u količini (ml) ejakulata među starosnim kategorijama bikova ($p < 0,05$). Najmanje su dali bikovi stari jednu godinu (4,87 ml), zatim prosečna količina raste da bi pokazala pad tek u kategoriji bikova starih 6 do 9 godina. Bikovi iz kategorije jednogodišnjaka su imali sasvim dobre rezultate koncepcije po non-return metodi ($> 70\%$) pa se može reći da ovaj parametar ne utiče na fertilnost bika kod veštačkog osemenjavanja.

Procenat živih i progresivno pokretnih spermatozoida pokazuje da postoje razlike među starosnim kategorijama bikova, ali nisu statistički značajne ($p > 0,05$).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da starost priplodnjaka nema neki značajniji uticaj na fertilitet ($p > 0,05$). Collins i sar. (1962) analiziraju efekat starosti na plodnost bika kod veštačkog osemenjavanja i primećuju trend da posle dostizanja maksimalnih rezultata plodnosti sa dve godine, primetan je pad na vrednosnoj skali non-return metode, koji se nastavlja do isključenja bika.

Istraživanja u ovom radu, o procentu steonosti dobijeni non-return metodom, u odnosu na *starost plotkinje* pokazala su statistički značajne razlike. Tako je najmanji procenat steonosti po non return metodi bio kod krava, 71,3%, a najveći kod junica, 75,5%, što je razlika od 4,2% ($p < 0,05$). Ovi rezultati se poklapaju i sa rezultatima brojnih drugih autora (Rycroft i sar., 1992; Miglior i sar., 1999; Reurink i sar., 1990; Pasman i sar., 2006; Nadarajah i sar., 1988; Schaeffer, 1993; Weigel i Rekaya, 2000). Što se tiče uticaja rase bika na kvalitet semena i rezultate steonosti dobijene non-return metodom, broj skokova i broj upotrebljivih ejakulata mesečno u odnosu na rasu bika najveći su kod simentalca, a najmanji kod HF i RH. To je u korelaciji sa rezultatima steonosti po non-return metodi, gde je najbolji rezultat imao simentalac ($p < 0,05$).

Postoji signifikantna razlika među rasama bikova u količini (ml) ejakulata. Najmanju količinu su dali bikovi HF i RH rase (prosečno 5,53 ml), a najveću simentalke rase (6,49 ml). Rezultati ovog parametra kvaliteta semena u korelaciji su sa se rezultatima koncepcije ($p < 0,05$). Koncentracija spermatozoida je statistički značajna među rasama bikova ($p < 0,05$). Ova razlika nije u korelaciji sa fertilitetom jer su najmanju prosečnu koncentraciju imali simentalac (1,42 mlrd/ml) i šarole (1,41 mlrd/ml) ($p > 0,05$). Slično je sa rezultatima prosečnog procenta živih i progresivno pokretljivih spermatozoida koji se ne poklapaju sa procentom koncepcije. Razlika u ovom parametru kvaliteta semena među rasama postoji, ali nije statistički značajna ($p > 0,05$). Procenat steonosti dobijen obračunom non-return metodom pokazuje da postoji signifikantna razlika među rasama (najplodniji je simentalac sa 73%, a najslabiji crni i crveni holštajn sa 67,7%) ($p < 0,05$).

Uticaj rase na procenat steonosti po non-return metodi u literaturi je obrađivan u relativno malom broju radova, u kojima autori takođe potvrđuju signifikantnu razliku u plodnosti bikova u odnosu na rasu (Hasenpusch, 2006; Rao i sar., 1992; Pickett i sar., 1961).

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Procena plodnosti u ovom ogledu non-return metodom kreće se od 46,15% za bika Vulkan do 82,61% za bika Saša ($p < 0,05$).
2. Kod bikova gajenih za eksploataciju semena za duboko zamrzavanje, vrednost parametara kvaliteta ejakulata je dosta različit i kreće se u okviru granica statističke značajnosti.

3. Utvrđen je uticaj godišnjeg doba na vrednosti parametara kvaliteta semena i rezultata koncepcije dobijene non-return metodom ($p < 0,05$). Najslabiji kvalitet semena se dobija u letnjim mesecima što se poklapa sa rezultatima koncepcije koji su takođe najlošiji u ovom godišnjem dobu.

4. Nije utvrđen značajan uticaj starosti bika na plodnost odnosno na rezultate koncepcije non-return metodom.

5. Dobijeni rezultati ukazuju na značajan uticaj starosti plotkinje na koncepciju. Utvrđeno je da procenat steonosti po non-return metodi kod krava iznosi 71,3%, a kod junica 75,5%.

6. Rasa bika ima značajnog uticaja na vrednosti parametara kvaliteta semena, libido i broj dobijenih upotrebljivih ejakulata, kao i na rezultate koncepcije po non-return metodi. Najbolju plodnost imali su bikovi simentalke rase, 73,0%, šarole 69,3%, monbeliar 68,1% i HF i RH 67,7%.

Literatura / References

1. Al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci* 1999; 82: 2611-6.
2. Collins WE, Inskeep EK, Dreher WH, Tyler WJ, Casida LE. Effect of age on fertility of bulls in artificial insemination. *J Dairy Sci* 1962; 45: 1015-8.
3. Foote RH, Karroth MT. Sperm numbers inseminated in dairy cattle and non-return rates revisited. *J Dairy Sci* 1997; 80: 3072-6.
4. Fryer HC, Marion GB, Farmer EL. Nonreturn rate of artificially inseminated dairy cows as affected by age of semen, breed of bull, and season. *J Dairy Sci* 1958; 41: 987-93.
5. Guaita N, Pizzi F, Pagnacco G. Non-return rates variability in dairy bulls. Book of Abstracts No.2. 1996; EAAP-47th Annual Meeting, Lillehammer. 165.
6. Gwazdauskas FC. Effects of Climate on Reproduction in Cattle. *J Dairy Sci* 1985; 68: 1568-78.
7. Hasenpusch E. Regionale Entwicklung von Non Return und Besamungsindex. *Cong Univ Berlin* 2006; 1-10.
8. Koops WJ, Grossman M, Den Daas JHG. A Model for Reproductive Efficiency of Dairy Bulls. *J Dairy Sci* 1995; 78: 921-8.
9. Linford E, Glover FA, Bishop C, Steward DL. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J Reprod Fert* 1976; 47: 283-91.
10. Miah AG, Salma U, Hossain MN. Factors Influencing Conception Rate of Local and Crossbred Cows in Bangladesh. *Int J Agri Biol* 2004; 6: 797-801.
11. Miglior F, Pizzi F, Guatta N. Effect of environmental factors on Non Return Rate in Italian Holstein-Friesians. *J Anim Sci* 1999; 85: 91.
12. Nadarajah K, Burnside EB, Schaeffer LB. Genetic parameters for fertility of dairy bulls. *J Dairy Sci* 1988; 71: 2730-4.
13. Pasman E, Jaitner J, Reinhardt F, Rensing S. Development of new Evaluation for Sire and Cow Fertility. *Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V. (VIT)*, 2006.
14. Pickett BW, Martig RC, Cowan WA. Preservation of bovine spermatozoa at -79°C and -196°C. *J Dairy Sci* 1961; 44: 2089-96.

15. Rao AV N, Sankar NM, Narayana MY. Effects of Breed Type and Season on Conception Rates in Cows. *World Review of Anim Reprod* 1992; 27: 24-5.
16. Ravagnolo O, Misztal I. Effect of Heat Stress On Nonreturn Rate in Holstein Cows: Genetic Analyses. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3092-100.
17. Ravagnolo O, Misztal I. Effect of Heat Stress on Nonreturn Rate in Holsteins: Fixed-Model Analyses. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3101-6.
18. Reurink A, Den Dassel JHG, Wilmink JBM. Effects of AI sires and technicians on non-return rates in the Netherlands. *Livestock Production Science* 1990; 26: 107-18.
19. Rhynes WE, Ewing LL. Testicular endocrine function in Hereford bulls exposed to high ambient temperatures. *Endocrinology* 1973; 92: 509.
20. Rodriguez-Martinez H. Optimization of Sperm Quality in AI bulls. *Reprod Dom Anim* 1998; 33: 235.
21. Rycroft H, Bean B. Factors influencing non-return data. *Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, National Association of Animal Breeders* 1992; 43-6.
22. Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR. *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle* 1973; Second edition, Chapter 14: Semen evaluation, 415-19.
23. Schaeffer LR. Evaluation of bull for non-return rates within artificial insemination organizations. *J Dairy Sci* 1993; 76: 837-42.
24. Stalhammer E, Janson L, Philipsson J. Genetic studies on fertility in AI bulls. II. Environmental and genetic effects on non-return rates of young bulls. *Anim Reprod Sci* 1994; 34: 193-207.
25. Taylor JF, Everett RW, Bean B. Systematic Environmental, Direct, and Service Sire Effects on Conception Rate in Artificially Inseminated Holstein Cows. *J Dairy Sci* 1985; 68: 3004-22.
26. Tucker HA, Oxender WD. Seasonal aspects of reproduction, growth and hormones in cattle and horses. *Prog Reprod Biol* 1980; 5: 155.
27. Weigel KA, Rekaya R. Genetic Parameters for Reproductive Traits of Holstein Cattle in California and Minnesota. *J Dairy Sci* 2000; 83: 1072-80.
28. Zakari AY, Molokwu ECI, Osori DIK. Effect of season on the oestrus cycle of cows (*bos indicus*) indigenous to northern Nigeria. *Vet Rec* 1981; 213-5.

ENGLISH

EVALUATING BULL FERTILITY BASED ON NON-RETURN METHOD

I. Prka, D. Vuković, S. Perković

In order to evaluate the results of reproductive cows and heifers, different parameters of fertility are used, such as the service period, insemination index, intercalving time and others, and of the breeding bulls the values obtained through non-return. An ejaculate is taken up for further processing by veterinary centres only provided it meets the prescribed quality parameters. Rating semen parameters includes a macroscopic (volume, colour, consistency, smell and pH) and a microscopic evaluation (mobility, density, percentage of live sperm and abnormal and damaged sperm).

In addition to sperm quality and the fertility of the female animal, the results of the non-return method are also influenced by a number of exogenous causes (season, age, race, insemination techniques) that have no small impact on the end result of insemination - pregnancy.

In order to obtain more objective results of the fertility of bulls the following tasks were undertaken, namely: 1. to calculate with the non-return method the fertility of bulls in over 10,000 cows inseminated for the first time during a period of 6 years; and 2. to analyze the impact of semen quality, season, age of cow and bull, and the bull breed on the results of fertility.

Key words: parameters of fertility, bull semen, quality parameters, non-return method.

РУССКИЙ

ОЦЕНИВАНИЕ ПЛОДОВИТОСТИ БЫКОВ НА ОСНОВЕ НЕ ПОВТОРНОГО ВЕДЕНИЯ КОРОВ (NON RETURN МЕТОД)

И. Прка, Д. Вукович, С. Перкович

Для оценки репродуктивных результатов коров и тёлочек пользуются различными параметрами плодovitости а именно сервис период, индекс осеменения, время между отёлом и прочее, а для быков в приплоде стоимости, полученные non-return методом. Чтобы эякулят в Центрах для и.о. был взят в дальнейшую обработку нужно удовлетворить предписанные параметры качества. Оценка параметров эякулятов охватывает макроскопическую (вместимость, цвет, консистенция, запах и рН стоимость) и микроскопическую оценку (подвижность, густота, процент живых и патологически повреждённых сперматозоидов).

Возле качества спермы и плодovitости женского единичного животного, на результаты non return метода влияет и целый ряд экзогенных причин (время года, старость, раса, техника осеменения), имеющие не маленькое влияние на крайний результат осеменения - стельность.

С целью получения, что более объективного результата плодovitости быков приступилось решению следующих заданий а именно: 1. что non-return методом вычислить плодovitость быков на больше 10.000 в первый раз осеменённых коров-тёлок в периоде в 6 лет, и 2. анализировать влияние качества семени, времени года, старости плодovitости коровы-тёлки и быка, расы быка на полученные результаты плодovitости.

Ключевые слова: параметры плодovitости, эякулят быка, параметры качества, non return метод

**ODREĐIVANJE VRSTA TRIHINELA PRIMENOM PCR
METODE******IDENTIFICATION OF THE TRICHINELLA SPECIES BY PCR METHOD***

S. Vasilev, Jelena Cvetković, Ivana Radović,
Ljiljana Sofronić-Milosavljević**

Srbija je zemlja sa visokom prevalencijom infekcije domaćih svinja trihinelom (*Trichinella* spp.) u endemskim regionima, što predstavlja ozbiljan rizik za zdravlje stanovništva. Iako je primena PCR uvedena pre dve godine u INEP-u, do sada je samo za nekoliko izolata larvi trihinele, otkrivenih u mesu svinja, urađena genotipizacija. Novi podaci pokazuju da na teritoriji Srbije, u silvatičnom ciklusu postoji više od jedne vrste *Trichinella*, i to *T. spiralis* i *T. britovi* (istovremeno nađeno u Beogradskom okrugu). Zbog rizika od mogućeg preklapanja silvatičnog i domaćeg ciklusa, veliki epidemiološki značaj bi imalo dalje ispitivanje ovom molekularnom metodom svih larvi koje se otkriju tokom obaveznog pregleda mesa (kako na klanicama, a poreklom su iz domaćinstava, tako i sa farmi koje se nalaze u ugroženim područjima Srbije). Iz tog razloga smo ispitali, primenom PCR, larve *Trichinella* izolovane iz svinjskog mesa, čija je konzumacija dovela do infekcije ljudi u Grockoj, Beograd, 2011. g. Ustanovljeno je da larve pripadaju vrsti *T. spiralis*.

Ključne reči: Trichinella spiralis, Trichinella britovi, PCR

Uvod / Introduction

Parazitske nematode iz roda *Trichinella* izazivaju oboljenje ljudi i infekciju životinja (sisara, ptica i reptila). To su paraziti sa direktnim životnim ciklusom, infektivni oblik je larva prvog stadijuma (L1) koja može da parazitira godinama u poprečno-prugastim mišićima domaćina (Pozio, 2007). Unutar ovog roda pre-

* Rad primljen za štampu 06. 06. 2011. godine

** Mr sci. med. vet. Saša Vasilev, istraživač-saradnik; dipl. mol. biol. Jelena Cvetković, istraživač-saradnik; dr med. Ivana Radović, istraživač saradnik, dr sci. med. Ljiljana Sofronić-Milosavljević, naučni savetnik, Nacionalna referentna laboratorija za trihinelozu, Odeljenje za imunologiju i imunoparazitologiju, Institut za primenu nuklearne energije – INEP, Univerzitet u Beogradu, Srbija

poznamo inkapsulirane i neinkapsulirane forme. Vrste i genotipovi koji formiraju kapsulu inficiraju samo sisare (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *Trichinella* T6, T8 i T9). Od tri vrste koje pripadaju neinkapsuliranoj formi, jedna dovodi do infekcija sisara i ptica (*T. pseudospiralis*), a dve kod sisara i reptila (*T. papuae* i *T. zimbabwensis*) (Pozio i Murrell, 2006; Zarlenga i sar., 2006). Novi podaci pokazuju postojanje još jednog genotipa (T12) koji formira kapsulu (Pozio i sar., 2009). Prisustvo parazita kod domaćih i divljih životinja samo po sebi nije dovoljno za infekciju koja se javlja u humanoj populaciji. Trihinelozu kod ljudi striktno je vezana za kulturu pripreme hrane, kao i neadekvatan ili izostao pregled mesa na prisustvo larvi. Bolest nastaje kao posledica konzumiranja sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa različitog animalnog porekla (od domaćih svinja ili konja, a od divljači su to najčešće divlje svinje i medvedi) u kome se nalaze infektivne larve trihinela (Gajadhar i sar., 2009).

Izuzev po postojanju kapsule, vrste i genotipovi koji pripadaju rodu *Trichinella* se morfološki ne mogu razlikovati, pa se zbog toga za identifikaciju genotipa parazita mogu koristiti samo molekularne metode. Mnoge metode su razvijene u tu svrhu, ali se danas najčešće koristi ona koja se zasniva na lančanoj reakciji polimeraze (PCR od engl. Polymerase Chain Reactions) (Zarlenga i sar., 1999; Pozio i La Rosa, 2003). Upotreba ove metode za određivanje vrsta *Trichinella* uvedena je u INEP-u 2009. godine.

U Srbiji su paraziti iz roda *Trichinella* prvi put detektovani kod svinja 1918. godine, dok je prvi slučaj infekcije kod ljudi zabeležen 1923. godine (Đorđević, 2003). Od uvođenja obaveznog pregleda mesa 1958. godine prevalencija infekcije kod svinja se smanjivala, kao i broj obolelih ljudi. Međutim, 90-ih godina XX veka se naglo povećao broj inficiranih svinja (sa 0,009% do 0,017%) pa i broj obolelih ljudi, koji u tom periodu dostiže oko 500 godišnje. Poslednjih godina je ovaj broj u opadanju, ali i dalje svake godine u Srbiji oboli od nekoliko desetina do 200 ljudi od ove bolesti (Čuperlović, 2005). Kod divljih životinja (vukova, šakala i lisica) u Srbiji nedavno je otkriveno prisustvo *T. britovi* (što je očekivano i karakteristično za silvatični ciklus), ali i *T. spiralis* (što ukazuje na preklapanje sa domaćim ciklusom). Samo u jednom okrugu su registrovane obe vrste i to kod lisica uhvaćenih na području opštine Surčin, Beogradski okrug (Cvetković i sar., 2011). Ovaj nalaz ukazao je na realnu mogućnost prenošenja *T. britovi*, preko zaraženih pacova i miševa, na domaće svinje, a zatim i ljude. U opštini Grocka, Beogradski okrug, tokom februara 2011. godine evidentirana je epidemija trihineloze kod ljudi. Do skora se svaka infekcija trihinelom kod ljudi ili životinja pripisivala *T. spiralis*. Savremena saznanja zahtevaju drugačiji pristup tj. jasnu identifikaciju vrste *Trichinella* koja je dovela do infekcije.

Institut za primenu nuklearne energije – INEP ustanova je sa dugom tradicijom na polju dijagnostike zoonoza izazvanih helmintima, posebno trihineloze, i to na ekspertskom nivou, a kao takav je prepoznat i u zemlji i u svetu. Zato je još 1993. godine Ministarstvo poljoprivrede sertifikovalo INEP kao Referentnu laboratoriju za serološku dijagnostiku trihineloze kod životinja, a od 2008. godine

Ministarstvo zdravlja Republike Srbije donelo je rešenje na osnovu koga je INEP i Odeljenje za imunologiju i imunoparazitologiju, kao njegov odgovorni deo, postao Nacionalna referentna laboratorija za trihinelozu (NRLT). U cilju ispitivanja zastupljenosti vrsta *Trichinella* u Srbiji, INEP je 2009. godine uveo PCR metodu u cilju određivanja vrsta *Trichinella*. NRLT poseduje sve mogućnosti za primenu najsavremenijih metoda za dijagnostiku infekcije sa *Trichinella* spp. i za definisanje vrste i/ili genotipova *Trichinella* u epidemiološko-epizootičke svrhe.

Zbog svih navedenih razloga u uzorcima svinjskog mesa koje je izazvalo epidemiju u Grockoj uradili smo pregled na prisustvo larvi *Trichinella*, kao i određivanje vrste.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

U dostavljenim uzorcima mesa i proizvoda od mesa (suvo svinjsko meso, kobasica, suva svinjska rebra) analiza prisustva larvi *Trichinella* je urađena primenom vesačke digestije, metoda magnetne mešalice, u skladu sa direktivom Evropske komisije 2075/2005. godine.

U cilju određivanja vrste *Trichinella* urađena je izolacija DNK iz pojedinačnih larvi koje su dobijene iz navedenih uzoraka i, zatim, multipleks PCR.

Ekstrakcija DNK / *Extraction of DNA* – Genomska DNK je izolovana iz pojedinačnih larvi upotrebom komercijalnog kita QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. Iz svakog uzorka je urađena izolacija DNK iz najmanje 5 larvi.

Multipleks PCR / *Multiplex PCR* – Multipleks PCR analiza je urađena prema protokolu Evropske referentne laboratorije za parazite (EURLP), Rim, Italija (<http://www.iss.it/crlp>). Ukratko, u ovom ispitivanju reakciona smesa (30 µl) je sadržala: 2 x PCR Master Mix, 4 µl H₂O, 1 µl SetB (set od 10 različitih prajmera) i 10 ml genomske DNK. Uslovi PCR reakcije su se sastojali od inicijalne denaturacije na 95°C tokom 4 minuta, 35 ciklusa od tri koraka – denaturacije DNK na 95°C tokom 10 sekundi, hibridizacije prajmera na 55°C tokom 30 sekundi i ekstenzije prajmera na 72°C tokom 30 sekundi i finalne elongacije na 72°C tokom 3 minuta. Kao pozitivne kontrole korišćene su pojedinačne referentne larve tj. dve inkapsulirane (*T. spiralis*, ISS3; *T. britovi*, ISS2) i jedna neinkapsulirana vrsta *Trichinella* (*T. pseudospiralis*, ISS13) dobijene od EURLP.

Gel elektroforeza / *Gel electrophoresis* – Analiza amplifikovanih PCR produkata je urađena gel elektroforezom u 2% agaroznom gelu (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) u TAE puferu. Za bojenje i vizuelizaciju DNK fragmenata na gelu korišćen je etidijum bromid i transluminator za detekciju.

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

U dostavljenim uzorcima ustanovljeno je prisustvo larvi *Trichinella* i to: 1) u uzorku suvog svinjskog mesa 4,76 larvi po gramu; 2) u uzorku kobasice 6,74 larvi po gramu, i 3) u uzorku suvih svinjskih rebara 0,006 larvi po gramu.

Rezultati PCR analize pojedinačnih larvi izolovanih iz dobijenih uzoraka sušenog svinjskog mesa i kobasice pokazali su prisustvo *T. spiralis* u uzorcima. Zaključak je baziran na postojanju trake od 173 bp iz ispitivanih uzoraka koja se nalazi na identičnoj poziciji kao i pozitivna kontrola dobijena iz larvi *T. spiralis*-ISS3, za razliku od položaja traka nastalih nakon analize drugih referentnih uzoraka vrsta *Trichinella*, tj. 127 i 253 bp za *T. britovi* i 310 bp za *T. pseudospiralis*.

Problemi koji trihinelôza izaziva su ekonomske prirode kada je u pitanju infekcija kod životinja, odnosno zdravstvene, ali i ekonomske prirode kada dođe do razvoja bolesti kod ljudi. U Srbiji je najveći broj epidemioloških podataka i *ad hoc* istraživanja na prisustvo *Trichinella* kod domaćih i/ili divljih životinja vezan za pojavu epidemija kod ljudi (Čuperlović, 2005; Cvetković i sar., 2011). Zastupljenost vrsta *Trichinella* razlikuje se unutar balkanskih zemalja. U Srbiji, Rumuniji, Bugarskoj i Hrvatskoj, trihinelôza je veoma rasprostranjena i predstavlja ozbiljan humani zdravstveni problem, ali i ekonomski problem u uzgoju svinja (Pozio, 2007). Širenje trihinelôze bilo je zabeleženo u ovim zemljama kao posledica političkih i socijalnih promena koje su se dešavale tokom poslednje dve decenije, a naročito kao posledica velike migracije stanovništva (Čuperlović, 2003; Gajadhar, 2009). Od drugih zemalja koje se graniče sa Srbijom umerena raširenost trihinelôze je zabeležena u Bosni, a sporadična u Makedoniji. Do skoro je u Srbiji zahvaljujući saradnji sa svetskom referentnom laboratorijom za trihinelôzu (ITRC), istovremeno i Evropskom referentnom laboratorijom za parazite (EURLP) pri Istituto Superiore di Sanita, Rim, Italija, u uzorcima mesa bilo potvrđeno prisustvo samo *Trichinella spiralis*. Međutim, rezultati najnovijeg istraživanja ostvarenog u saradnji sa EURLP, Fakultetom veterinarske medicine i Biološkim fakultetom, Univeziteta u Beogradu ukazuju na prisustvo i *T. britovi* u Srbiji, za sada potvrđeno samo kod divljih životinja (Cvetković i sar., 2011). Podaci o tome koje su vrste *Trichinella* zastupljene postoje za većinu balkanskih zemalja sa izuzetkom, Bosne i Crne Gore. U Rumuniji su prisutne: *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis* i *T. nativa* (Olteanu, 1996); u Hrvatskoj i Bugarskoj otkrivene su: *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. pseudospiralis*; u Mađarskoj i Makedoniji: *T. spiralis* i *T. britovi*, dok su za Bosnu podaci o prisustvu *T. spiralis* i *T. britovi*, dati na bazi pretpostavke EURLP (Pozio, 2007a).

Dobijeni rezultati, nalaz larve *T. spiralis* u uzorcima zaraženim trihinelom, u saglasnosti su sa do sada dobijenim podacima o vrstama larvi kod domaćih svinja. Zbog rizika od mogućeg preklapanja silvatičnog i domaćeg ciklusa parzita, naročito kod svinja koje se gaje van obora – u dvorištu ili se puštaju na žiriranje u šumu, za dobijanje potpune slike i savremenog praćenja stanja trihinelôze u Srbiji neophodno je nastaviti i intenzivirati analize molekularnom metodom larvi koje potiču iz uzoraka mesa koji su doveli do infekcije kod ljudi, ali i

onih uzorka u kojima su larve na vreme otkrivene tokom obaveznog pregleda mesa, te je tako sprečena pojava epidemija. Ove analize bi omogućile i eventualno otkrivanje prisustva drugih vrsta *Trichinella*, pre svega *T. pseudospiralis*. Na kraju, ističemo da je od posebne važnosti da čitava veterinarska struka sagleda značaj ovakvog, savremenog pristupa u praćenju raširenosti infekcije sa *Trichinella* spp. u Srbiji, te da se uzorci (bilo inficiranog mesa ili slobodnih larvi dobijenih nakon digestije) proslede laboratorijama osposobljenim za PCR molekularnu dijagnostiku (a obavezno i odgovarajućoj referentnoj laboratoriji u kojoj treba da postoji banka izolata). U tom cilju pozivamo sve zainteresovane pojedince i/ili organizacije na saradnju na ovom veoma važnom polju rada veterinarske i lekarske struke a sve u okviru veoma značajne svetske inicijative: jedno zdravlje – jedna medicina.

Zaključak / Conclusion

Ovim prikazom slučaja se potvrđuje da infekciju trihinelom kod ljudi u Srbiji izaziva *T. spiralis*. Zbog prisustva i drugih vrsta trihinela u okruženju, a i kod nas, bilo bi značajno sprovođenje sistematskog istraživanja zastupljenosti vrsta *Trichinella*. Angažovanje ljudskih i materijalnih resursa u Srbiji, saradnja sa drugim referentnim laboratorijama u regionu, EURLP i Svetskom referentnom laboratorijom za trihinelozu u Rimu, treba da doprinese boljoj kontroli trihineloze.

ZAHVALNOST / ACKNOWLEDGEMENTS:

Ovaj rad je finansiran sredstvima projekta 173047 Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije. Zahvaljujemo se Veterinarskoj inspekciji Republike Srbije./

This work was financed by funds within Project 173047 of the Ministry for Education and Science of the Republic of Serbia. We wish to thank the Veterinary Inspection of the Republic of Serbia for their help.

Literatura / References

1. Cvetković J, Teodorović V, Marucci G, Vasilev D, Vasilev S, Ćirović D, Sofronić-Milosavljević Lj. First report of *Trichinella britovi* in Serbia. Acta Parasitol 2011; 56(2): 232-5.
2. Čuperlović K, Đorđević M, Pavlovic S. Re-emergence of trichinellosis in southeastern Europe due to political and economic changes. Vet Parasitol 2005; 132: 159-66.
3. Đorđević M, Bacić M, Petrićević M, Čuperlović K, Malakauskas A, Kapel CM, Murrell KD. Social, political, and economic factors responsible for the reemergence of trichinellosis in Serbia: a case study. J Parasitol 2003; 89: 226-31.
4. Gajadhar AA, Pozio E, Gamble HR, Nockler K, Maddox-Hyttel C, Forbes LB, Vallee I, Rossi P, Marinculic A, Boireau P. *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. Vet Parasitol 2007; 159: 197-205.
5. Olteanu G. Trichinellosis in Romania: a short review over the past twenty years. Parasite 2001; 8(2S): S98-9.

6. Pozio E. Taxonomy, biology and epidemiology of *Trichinella* parasites. In: (Eds. J. Dupouy-Camet and K.D. Murell) FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 2007; 1-35.
7. Pozio E. World distribution of *Trichinella* spp. Infections in animals and humans. Vet Parasitol 2007a; 149: 3-21.
8. Pozio E, La Rosa G. PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animals and human samples. Methods in Molecular Biology 2003; 216: 299-309.
9. Pozio E, Hoberg E, La Rosa G, Zarlenga DS. Molecular Taxonomy, Phylogeny and Biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. Infect Gen Evol 2009; 9: 606-16.
10. Pozio E, Murrell KD. Systematics and epidemiology of *Trichinella*. Adv Parasitol 2006; 63: 367-439.
11. Zarlenga DS, Chute MB, Martin A, Kapel CM. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. Int J Parasitol 1999; 29: 1859-67.
12. Zarlenga DS, Rosenthal B, La Rosa G, Pozio E, Hoberg EP. An old genus learns new tricks: late Tertiary colonization and speciation of *Trichinella* nematodes among Eutheria Proc Nat Acad Sci USA 2006; 103: 7354-9.

ENGLISH

IDENTIFICATION OF THE TRICHINELLA SPECIES BY PCR METHOD

S. Vasilev, Jelena Cvetković, Ivana Radović, Ljiljana Sofronić-Milosavljević

Serbia is country with a high prevalence of *Trichinella* infection in pigs, which continues to be a serious human health problem. In Serbia, only a few isolates of *Trichinella* found in pork have been genetically specified to date, and all were proven as *T. spiralis*. New data shows that in the sylvatic cycle in Serbia, at least in the Belgrade district, more than one *Trichinella* species co-exist (*T. spiralis* and *T. britovi*). Increased awareness of the possible overlap among sylvatic and domestic *Trichinella* cycles indicates the need for continuous monitoring of *Trichinella* species circulation and strongly points to the need that all isolates of *Trichinella* found in meat for human consumption should be subject to a determination of the *Trichinella* species (due to the risk of transmission of infection with *T. britovi* to domestic pigs and humans). This is why we examined using PCR the *Trichinella* larvae found in pig meat that caused a human outbreak (*Trichinella* infection) in Grocka (Belgrade district) during February 2011. The isolated larvae belonged to *T. spiralis*.

Key words: *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, PCR

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВ ТРИХИНЕЛЛ

**С. Василев, Желена Цветкович, Ивана Радович,
Лиляна Софронич-Милосавлевич**

Сербия страна с высоким преобладанием инфекции домашних свиней трихинеллой (*Trichinella* spp.) в эндемических регионах, что представляет собой серьёзный риск для здоровья населения. Хотя применение ПЦР введено два года тому назад в ИНЕП-е, до сих пор только для несколько изолятов личинок трихинелл, открытых в мясе свиней сделана генотипизация. Новые данные показывают, что на нашей территории, в слюнном цикле существует больше одного вида *Trichinella*, а именно *T. spiralis* и *T. britovi* (одновременное присутствие, найденное в Белградском округе. Из-за риска от возможного совпадения слюнного и домашнего цикла, большое эпидемиологическое значение бы имело дальнейшее испытание этим молекулярным методом всех личинок, которые откроются в течение обязательного осмотра мяса (как на скотобойнях, а происхождением из домашних хозяйства так и с ферм, находящие в угрожаемых районах Сербии). По этой причине испытано нами, применением ПЦР, личинки *Trichinella*, изолированные из свиного мяса, чьё потребление привело до инфекции людей в Гроцке, Белград, 2011 г. Установлено, что личинки принадлежат виду *T. spiralis*.

Ключевые слова: *Trichineela spiralis*, *Trichinella britovi*, ПЦР

**ISPITIVANJE ZAŠTITNOG DEJSTVA DVOVALENTNE
INAKTIVISANE VAKCINE PRIPREMLJENE OD SEROTIPOVA
1/2a i 4b *Listeria monocytogenes* NA MIŠEVIMA***
***INVESTIGATIONS OF PROTECTIVE EFFECTS OF BIVALENT
INACTIVATED VACCINE PREPARED FROM SEROTYPES 1/2a
AND 4b *Listeria monocytogenes* ON MICE***

**D. Bacić, Sonja Obrenović, M. Kirovski, B. Dimitrijević, Sonja Radojičić,
M. Valčić, M. Mirilović****

Cilj ovog istraživanja bio je da se na laboratorijskim belim miševima proveri zaštitno dejstvo inaktivisane dvovalentne vakcine pripremljene od serotipova L. monocytogenes 1/2a i 4b. Nakon provere sterilnosti i toksičnosti pripremljene vakcine miševi su podeljeni u 6 grupa sa po 10 životinja. Prva i druga grupa miševa su dobile vakcinu bez saponina (vakcina A), a treća i četvrta grupa vakcinu sa saponinom (vakcina B). Miševi pete i šeste grupe nisu vakcinisani i služili su kao negativna kontrola. Dve nedelje nakon vakcinacije izvršena je revakcinacija oglednih grupa, osim kontrolnih. Dve nedelje nakon revakcinacije izvršena je veštačka infekcija svih grupa sa serotipovima L. monocytogenes 1/2a i 4b.

Za vreme ispitivanja (60 dana) uginula su 4 miša iz vakcinisanih grupa. Miševi kontrolnih grupa su počeli da uginjavaju nakon 7. dana, a poslednji miš je uginuo 14 dana posle infekcije.

Pregledom preparata iz parenhimatoznih organa uginulih miševa obojenih po Gramu dokazano je prisustvo L. monocytogenes. Zasejavanjem homogenizata parenhimatoznih organa na triptozni agar urađena je reizolacija i dobijena je čista kultura L. monocytogenes. Upotrebom specifičnih antiseruma potvrđeni su serotipovi 1/2a i 4b. S obzi-

* Rad primljen za štampu 26. 09. 2011. godine

** Dr sci. med. vet. Dragan Bacić, docent, dr sci. med. vet. Sonja Obrenović, asistent, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine; mr sci. med. vet. Marko Kirovski, Veterinarski zavod, Zemun; mr sci. med. vet. Blagoje Dimitrijević, asistent, Katedra za bolesti papkara; dr sci. med. vet. Sonja Radojičić, redovni profesor, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela; dr sci. med. vet. Miroslav Valčić, redovni profesor, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela; dr sci. med. vet. Milorad Mirilović, docent, Katedra za ekonomiku i statistiku, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Srbija

rom na ukupan broj vakcinisanih miševa u ogledu i procenat uginuća (10%), može se reći da je ispitivana vakcina sa saponinom imala zadovoljavajući zaštitni efekat.

Ključne reči: L.monocytogenes, inaktivisana vakcina, miš

Uvod / Introduction

Listerioza je zarazna bolest ljudi i životinja koju izaziva gram-pozitivna, fakultativno intracelularna bakterija *Listeria monocytogenes* (Pamer, 2004). Listerije su široko rasprostranjene u prirodi (ubikvitarni mikroorganizam) i osim kod životinja izolovane su iz zemljišta, otpadnih voda, silaže, povrća, namirnica animalnog porekla i dr. (Cooper i Walker, 1998).

Listerije mogu da se nađu na sluzokoži ždrela, u vaginalnoj sluzi i raznim unutrašnjim organima zdravih jedinki. Rezervoari u prirodi su divlji glodari (miševi, pacovi i kunići). U prirodnim uslovima infekcija se prenosi ekskrementima, pobačenim plodovima, placentom urinom, mlekom, iscetkom iz polnih organa i preko nekih rodova krpelja (Wagner i sar., 2000).

Prema podacima iz literature listerioza je raširena u celom svetu, uključujući i Srbiju, a osim čoveka oboljeva i preko 50 životinjskih vrsta (Seeliger i Jones, 1986).

Listerioza je kod ljudi prvi put opisana 1920. godine. Manifestuje se pojavom meningitisa, ređe encefalitisa, a kod gravidnih žena dovodi do pojave abortusa ili rađanja mrtve ili slabo vitalne dece.

Na osnovu podataka Belgijske referentne laboratorije, listerioza se kod ljudi javlja sporadično, a incidencija na godišnjem nivou je 7 slučajeva na milion stanovnika (Mead i sar., 1999).

Na osnovu dobijenih rezultata laboratorijskih istraživanja dokazano je da serotipovi 1/2a i 4b *L. monocytogenes* dominiraju u Srbiji, kao i u zemljama u okruženju (Sofrenović i sar., 1964).

S obzirom na epizootiološku situaciju u Srbiji i imajući u vidu slab odgovor na antibiotsku terapiju pri pojavi kliničkih simptoma listerioze kao i rezistentnost uzročnika na antibiotike, cilj istraživanja bio je priprema i ispitivanje protektivnog dejstva sopstveno pripremljene adsorbat vakcine, sa i bez saponina, dobijene inaktivisanjem *L. monocytogenes* sa domaćeg epizootiološkog područja.

Materijal i metode rada / Material and methods

Izolacija i serotipizacija izolovanih sojeva *L. monocytogenes* /
Isolation and serotyping of isolated strains of L. Monocytogenes

Za pripremu vakcine korišćeni su lokalni izolati *L. monocytogenes* dobijeni iz uzoraka pobačenih fetusa i mozga uginulih ovaca po standardnoj proce-

duri (Doyle i Schoeni, 1986). Kao podloga za izolaciju bakterija korišćen je triptozni agar (Torlak, Beograd).

Serotipizacija izolovanih listerija je urađena metodom brze aglutinacije na predmetnoj pločici sa monospecifičnim anti O i anti H imunoserumima *L. monocytogenes* (Bioveta, Češka).

Priprema vakcine / Preparation of vaccine

Vakcina je pripremljena od celih bakterijskih ćelija serotipova 1/2a i 4b *L. monocytogenes*, inaktivisanih sa 0,4% formalinom uz dodatak aluminijum-hidroksida kao nosača. Polovina pripremljene vakcine je bila bez saponina i označena je kao vakcina A, a drugoj polovini je dodat saponin (0,1%) i obeležena je kao vakcina B. U 1 ml vakcina je sadržavala 10^6 cfu bakterijskih ćelija.

Ispitivanje sterilnosti vakcine / Investigations of vaccine sterility

U cilju ispitivanja sterilnosti, pripremljena vakcina je zasejana na hranljivi agar, 5% krvni agar i triptozni agar. Tokom 5 dana zasejane podloge su proveravane na prisustvo kolonija aerobnih i anaerobnih mikroorganizama.

Ispitivanje toksičnosti vakcine / Investigations of vaccine toxicity

Toksičnost pripremljene vakcine je ispitivana biološkim ogledom na belim miševima. Ispitivanje je sprovedeno na 10 miševa telesne mase 18–22 g, starosti 3–4 nedelje, koji su podeljeni u 2 ogledne grupe. Prva grupa je vakcinisana vakcinom A (bez saponina), a druga vakcinom B (sa saponinom). Vakcina je aplikovana supkutano (s/c) u količini od 0,3 ml. Biološki ogled je trajao 4 nedelje i za to vreme je praćeno opšte stanje oglednih životinja. Nakon biološkog ogleda životinje su žrtvovane, obdukovane u cilju procene patomorfoloških promena, a suspenzija parenhimatoznih organa je zasejana na hranljive podloge.

Ispitivanje zaštitnog dejstva vakcine na miševima /

Investigations of vaccine protective effects on mice

Ispitivanje protektivnog dejstva vakcine je izvedeno na 60 belih miševa, telesne mase 18 do 22 g i starosti 3–4 nedelje. Miševi su podeljeni u šest oglednih grupa sa po 10 životinja.

Prva i druga grupa vakcinisane su sa 0,2 ml inaktivisane bivakcine bez saponina (vakcina A), s/c u koleno nabor.

Treća i četvrta grupa vakcinisane su sa 0,2 ml inaktivisane bivakcine sa saponinom (vakcina B), s/c u koleno nabor.

Peta i šesta grupa nisu vakcinisane i služile su kao negativna kontrola.

Dve nedelje posle vakcinacije urađena je revakcinacija svih oglednih grupa, osim kontrolnih.

Miševi su držani izolovano, u prostoriji posebno namenjenoj tome, uz svakodnevno praćenje opšteg zdravstvenog stanja. Ogledne životinje su hranjene potpunom krmnom smešom za ovu vrstu i dobijale vodu *ad libitum*.

Veštačka infekcija miševa / Artificial infection of mice

Dve nedelje nakon revakcinacije urađena je veštačka infekcija tako što je miševima s/c aplikovano po 0,3 ml $\times 10^6$ (cfu/ml) 24 h stare bujonske kulture *L. monocytogenes* serotipa 1/2a i 4b.

Miševima iz prve i treće grupe aplikovana je s/c bujonska kultura serotipa 1/2a, u količini od 0,3 ml (cfu/ml), druge i četvrte grupe s/c bujonska kultura serotipa 4b, u količini od 0,3 ml (cfu/ml), pete grupe s/c bujonska kultura serotipa 1/2a, u količini od 0,3 ml, šeste grupe s/c bujonska kultura serotipa 4b, u količini od 0,3 ml (cfu/ml).

Veštačko izazivanje infekcije imalo je za cilj proveru zaštitnog dejstva ispitivanih vakcina, za svaki soj pojedinačno. Kod miševa kontrolnih grupa, koji nisu vakcinisani, cilj je bio da se ispita patogeno dejstvo oba serotipa *L. monocytogenes*.

Tokom oglada miševi su posmatrani svakodnevno i pri tom su praćeni opšte stanje i promene u ponašanju. Nakon uginuća izvršena je obdukcija, a zatim i zasejavanje suspenzije parenhimatoznih organa na odgovarajuće hranljive podloge.

Rezultati / Results

Rezultati ispitivanja sterilnosti vakcine / Results of investigations of vaccine sterility

Ni u jednoj od zasejanih podloga bojenjem po Gramu nije ustanovljen rast kontaminirajućih bakterija, što je potvrdilo sterilnost vakcine.

Rezultati ispitivanja toksičnosti vakcine / Results of investigations of vaccine toxicity

Ispitivanja toksičnosti vakcine na miševima, koje je trajalo 4 nedelje, svi miševi su preživeli, bez pojave kliničkih simptoma i promene opšteg stanja. Nakon oglada miševi su žrtvovani, urađena je obdukcija, a na parenhimatoznim organima nije bilo patomorfoloških promena. Suspenzija parenhimatoznih organa je zasejavana na triptozni i krvni agar, i pri tome nije ustanovljen rast aerobnih i anaerobnih mikroorganizama.

Rezultati zaštitnog dejstva inaktivisane dvalentne vakcine /

Results of protective effects of inactivated bivalent vaccine

Za vreme ispitivanja uginula su 4 miša iz vakcinisanih grupa. Jedan iz prve, dva iz druge i jedan iz četvrte ogledne grupe. Rezultati ispitivanja zaštitnog dejstva vakcine A (bez saponina) i B (sa saponinom) aplikovane u dozi od

0,2 ml x 10⁶ cfu/ml nakon veštačke infekcije bujonskom kulturom *L. monocytogenes* serotip 1/2a i 4b u dozi od 0,3 ml prikazani su u tabeli 1.

Na tabeli 1 su prikazani procentualni rezultati zaštitnog dejstva vakcine A (bez saponina) i B (sa saponinom) kod vakcinisanih miševa, nakon veštačke infekcije patogenim sojevima *L. monocytogenes* ser 1/2a i 4b, kao i rezultati veštačke infekcije miševa koji nisu vakcinisani (kontrolna grupa).

Tabela 1. Rezultati ispitivanja zaštitnog dejstva vakcine A (bez saponina) i B (sa saponinom) aplikovane u dozi od 0,2 ml x 10⁶ cfu/ml nakon veštačke infekcije bujonskom kulturom *L. monocytogenes* ser 1/2a i 4b u dozi od 0,3 x 10⁶ cfu/ml

Table 1. Results of investigations of protective effects of vaccine A (without saponin) and B (with saponin) applied in doses of 0.2 ml x 10⁶ cfu/ml following artificial infection with bouillon culture of ser 1/2a and 4b *L. Monocytogenes* in dose of 0.3 x 10⁶ cfu/ml

Grupe miševa / Groups of mice	Vakcina A / Vaccine A		Vakcina B / Vaccine B		Kontrolna (nevakcinisana) grupa miševa / Control (nonvaccinated) group of mice	
	I (n=10)	II (n=10)	III (n=10)	IV (n=10)	V (n=10)	VI (n=10)
Broj uginulih miševa nakon veštačke infekcije <i>L. monocytogenes</i> ser 1/2a i 4b / Number of mouse deaths following artificial infection with <i>L. monocytogenes</i> ser 1/2a and 4b	1	2	0	1	10	10
% uginulih miševa / % dead mice	10	20	0	10	100	100

Miševi koji nisu vakcinisani počeli su da uginjavaju nakon 7. dana, a poslednji miš je uginuo 14. dana infekcije. Na obdukciji je zapaženo uvećanje jetre manjeg stepena, sa sitnim nekrotičnim žarištima, jaka hiperemija pluća i sluzokože creva.

Zasejavanjem homogenizata parenhimatoznih organa na triptozni agar je urađena reizolacija i dobijena čista kultura *L. monocytogenes* serotipa 1/2a i 4b.

Diskusija / Discussion

Za vakcinaciju životinja protiv listerioze mogu da se koriste inaktivisane ili atenuisane vakcine dobijene od celih bakterijskih ćelija. U novije vreme korišćenjem tehnika molekularne biologije određen je proteinski profil vrste *L. monocytogenes* i postoje pokušaji da se naprave subjedinične vakcine. Međutim, efikasnost ovih vakcina još uvek nije potpuno ispitana i potrebna su dalja eksperimentalna istraživanja (Vazquez-Boland i sar., 2001).

Poznato je da listeriolizin O (LLO), koji nastaje kao odgovor na prisustvo različitih sojeva *L. monocytogenes*, može da indukuje zaštitni imunitet, ali ključni odnos između LLO i stvaranja zaštitnog imuniteta kod zaraženih jedinki nije dovoljno istražen (Carvalho i sar., 2001). U svom ispitivanju Xiong i sar. (1998) su dokazali da kod miševa koji su inficirani virulentnim sojevima *L. monocytogenes* dolazi do stvaranja protektivnog imuniteta, a aplikacijom mrtvih bakterija i nevirulentnih sojeva nije došlo do stvaranja imunskog odgovora. Kod miševa imunizovanih listeriolizinom i mrtvim bakterijama, uz upotrebu Freundovog adjuvansa, došlo je do stvaranja delimičnog zaštitnog imuniteta (Brocke i Hahn, 1991).

Istraživanja na velikom broju životinjskih vrsta ukazala su na to da postoji mogućnost kontrole listerioze primenom vakcina koje kao imunogene komponente sadrže avirulentne ili inaktivisane sojeve listerija (Ramaswamy i sar., 2007).

Ivanov i sar. (1977) su izveli uspešan eksperiment sa atenuiranom vakcinom, dobijenom od serotipova 1/2a i 4b *L. monocytogenes* uz dodatak 0,1 % saponina. Burdarov i sar. (1985) su izveli eksperiment na jagnjadi, zečevima i zamorčicima. Za vakcinaciju je korišćena mrtva vakcina od serotipova *L. monocytogenes* tip 1 i tip 4c, koja je dobijena inaktivacijom toplotom. Kod veštački inficiranih vakcinisanih životinja. Listerie su izolovane u sporadičnim slučajevima iz moždanog tkiva i parenhimatoznih organa, dok je kod veštački inficiranih nevakcinisanih životinja ovaj uzročnik izolovan tokom čitavog perioda ispitivanja. Autori su zaključili da se vakcinacijom eksperimentalnih životinja mrtvom vakcinom smanjuje smrtnost životinja.

Van Dijk i sar. (1980) su proučavali imunogenost inaktivisane vakcine na miševima i dokazali su da sa odgovarajućim adjuvansom može da se proizvede kvalitetna vakcina sa dobrim antigenim karakteristikama. Wirsing (1982) se složio sa ovim ispitivanjima, dodavši da se na ovaj način bolest može staviti pod kontrolu primenom formalinom inaktivisane vakcine.

Zaključak / Conclusion

Rezultati naših ispitivanja su pokazali da serotipovi 1/2a i 4b *L. monocytogenes* ispoljavaju patogeni efekat nakon veštačke infekcije miševa kontrolnih grupa. Pripremljena inaktivisana vakcina sa saponinom, od serotipova 1/2a i 4b *L. monocytogenes* imala je zadovoljavajući zaštitni efekat, imajući u vidu da je nakon veštačke infekcije došlo do uginuća svega 10% vakcinisanih miševa. Poređenjem rezultata dobijenih nakon vakcinacije miševa oglednih grupa vakcinama sa saponinom i bez saponina utvrđeno je da dodavanje saponina najverovatnije povećava zaštitni efekat vakcine.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je finansiran sredstvima Ministarstva prosvete i nauke R Srbije u okviru projekata: TR-20142 i TR-31088. / The work was financed by funds of the Ministry for Education and Science of the Republic of Serbia within projects TR-20142 and TR-31088.

Literatura / References

1. Brocke S, Hahn H. Heat-killed *Listeria monocytogenes* and *L. monocytogenes* soluble antigen induce clonable CD4+ T lymphocytes with protective and chemotactic activities *in vivo*. Infect Immun 1991; 59(12): 4531-9.
2. Burdarov I, Savova-Burdarova S. Immunoprophylaxis of listeriosis in sheep with a killed vaccine. Vet Med Nauki 1985; 22(6): 13-9.
3. Carvalho LH, Hafalla JC, Zavala F. ELISPOT assay to measure antigen-specific murine CD8+ T cell responses. J Immunol Methods 2001; 252, 207-18.
4. Cooper J, Walker RD. Listeriosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1998; 14: 113-25.
5. Doyle MP, Schoeni JL. Selective-enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens. Appl Environ Microbiol 1986; 51(5): 1127-9.
6. Ivanov I, Draganov M, Dikova Ts. Study on the active immunoprophylaxis of sheep listeriosis. Central Veterinary Research Institute, Sofia 1977; 324-9.
7. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis 1999; 5: 607-25.
8. Pamer EG. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. Nat Rev Immunol 2004; 4: 812-23.
9. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. Listeria – review of epidemiology and pathogenesis. J Microbiol Immunol Infect 2007; 40: 4-13.
10. Seeliger HPR, Jones D. Genus *Listeria* Pirie 1940, 383, 1235–1245. U.P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology 1986; vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
11. Sofrenović Đ, Trbić B, Marković B, Movsesijan M. Listerioza gravidnih ovaca. Vet Glasnik 1964; 9: 873.
12. Van Dijk H, Hofhuis FMA, Berns EMJJ, Van der Meer C, Willers JMM. Killed *Listeria monocytogenes* vaccine is protective in C3H/HeJ mice without addition of adjuvants. Nature 1980; 286: 713-4.
13. Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. *Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants*. Clin Microbiol Rev. 2001; 14:584–640.
14. Wagner M, Melzner D, Bago Z, Winter P, Egerbacher M, Schilcher F, Zangana A, Schoder D. Outbreak of clinical listeriosis in sheep: evaluation from possible contamination routes from feed to raw produce and humans. J Vet Med. 2000; B 52: 278-83.
15. Wirsing V, König CW, Fischer H, Hof H. Failure of a killed *Listeria monocytogenes* vaccine to produce protective immunity, Nature, 1982; 297: 233-4.
16. Xiong H, Tanabe Y, Ohy S, Mistuyama M. Administration of killed bacteria together with listeriolysin O induces protective immunity against *Listeria monocytogenes* in mice. Department of Bacteriology, Niigata University School of Medicine, Japan, 1998.

ENGLISH

**INVESTIGATIONS OF PROTECTIVE EFFECTS OF BIVALENT INACTIVATED
VACCINE PREPARED FROM SEROTYPES 1/2a AND
4b *Listeria monocytogenes* ON MICE**

**D. Bacić, Sonja Obrenović, M. Kirovski, B. Dimitrijević, Sonja Radojičić,
M. Valčić, M. Mirilović**

The objective of these investigations was to check on laboratory white mice the protective effect of an inactivated bivalent vaccine prepared from serotypes 1/2a and 4b *L. monocytogenes*. Following verification of the sterility and toxicity of the prepared vaccine, the mice were divided into 6 groups with 10 animals in each group. The first and second group of mice were administered the vaccine without saponin (vaccine A) and the third and fourth group the vaccine with saponin (vaccine B). Mice of the fifth and the sixth group were not vaccinated and served as a negative control. Two weeks following vaccination, the experimental groups were revaccinated, with the exception of the two control groups. Two weeks following revaccination, all groups were artificially infected with serotypes 1/2a and 4b *L. monocytogenes*.

During the course of the investigations (60 days) a total of 4 mice died in the vaccinated groups. Mice of the control groups started dying after day 7, and the last mouse in these groups died 14 days after the infection. Examinations of preparations of parenchymatous organs of the dead mice stained according to Gram proved the presence of *L. monocytogenes*. Homogenates of parenchymatous organs were sown on tryptose agar for reisolation and a pure culture of *L. monocytogenes* was obtained. Through the use of specific antisera, serotypes 1/2a and 4b were confirmed. Considering the total number of vaccinated mice in the experiment and the percent deaths (10%), it can be said that the investigated vaccine with saponin had a satisfactory protective effect.

Key words: *L. monocytogenes*, inactivated vaccine, mouse

РУССКИЙ

**ИСПЫТАНИЕ ПРЕДОХРАНИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ДВУВАЛЕНТНОЙ
ИНАКТИВАЦИОННОЙ ВАКЦИНЫ, ПОДГОТОВЛЕННОЙ ОТ СЕРОТИПОВ 1/2a И
4b *Listeria monocytogenes* НА МЫШАХ**

**Д. Баич, Соня Обренович, М. Кировски, Б. Дмитриевич, Соня Радоичич,
М. Валчич, М. Мирилович**

Цель этого исследования была, что на лабораторных белых мышах проверить предохранительное действие инактивационной двувалентной вакцины, подготовленной от серотипов *L. monocytogenes* 1/2a и 4b. После проверки стерильности и токсичности подготовленной вакцины мыши в 6 групп с по 10 животных. Первая и вторая группы мышей получили вакцину без сапонины (вакцина А) а третья и четвертая группы вакцину с сапонином (вакцина Б). Мыши пятой и шестой групп не вакцинированы и служили как отрицательный контроль. Две недели после вакцинации совершена ревакцинация опытных групп, кроме контрольных. Две недели по-

сле ревакцинации совершена искусственная инфекция всех групп с серотипами *L. monocytogenes* 1/2a и 4b.

Во время продолжительности испытания (60 дней) околели 4 мыши из вакцинированных групп. Мыши контрольных групп начали околеть после 7 дней, а последняя мышь околела 14 дней после инфекции.

Осмотром препарата из паренхиматозных органов околелых мышей, окрашенных по Граму доказано присутствие *L. monocytogenes*. Засеиванием гомогенизатов паренхиматозных органов на триптозный агар сделана реизоляция и получена чистая культура *L. monocytogenes*. Употреблением специфических антисерумов подтверждены серотипы 1/2a и 4b. С учётом на совокупное число вакцинированных мышей в опыте и процент околелости (10%), можно сказать, что испытанная вакцина с сапонином имела удовлетворительный предохранительный эффект.

Ключевые слова: *L. monocytogenes*, инактивационная вакцина, мышь

**MAINTAIN AND CONTROL OF VACCINATION BELT ALONG
NEIGHBOURING RABIES INFECTED AREA***
**ODRŽAVANJE I KONTROLA VAKCINACIONOG POJASA DUŽ SUSEDNE
POVRŠINE INFICIRANE BESNILOM**

P. Hostnik, Jedrt Maurer Wernig, Danijela Rihtarič, J. Grom, T. Malovrh,
I. Toplak**

The programme of oral vaccination of wildlife started in 1988 in Slovenia and is based on our and the experiences of other countries. Red foxes are the main reservoir of rabies in Slovenia. When the oral vaccination programme started in whole territory of Slovenia in the year 1995, 1089 (28.75%) of tested animals were detected positive among wild and domestic animals. Four years later only 6 (0.5%) positive cases were detected among 1195 tested animals. The number of positive cases been increased again in 2001 to 135 cases. Between 2002 and 2008 the vaccination was done only in the protection zone, a 30 to 50 km wide belt along the southern border with Croatia because no new rabies cases were found in the north-west region of the country. When rabies was reintroduced in Italy in 2008 the vaccination was carried out again in the whole territory of Slovenia. In order to improve the vaccination campaign the stability of two vaccines was measured over 8 weeks. In both vaccines the drop of the virus titre was the highest when baits were placed in the sunlight, but, in the shadow, the virus was detected until day 53 of observation. The aim of this study is to summarise the current status of rabies and to look for the best solutions in the next vaccination campaign.

Key words: rabies, oral vaccination, control

* Rad primljen za štampu 20. 01. 2011. godine

** Dr P. Hostnik, Jedrt Maurer Wernig, Danijela Rihtarič, J. Grom, T. Malovrh, I. Toplak,
Institut za mikrobiologiju i parazitologiju, Veterinarski fakultet, Ljubljana, Slovenija /
Institute of Microbiology and Parasitology, Veterinary faculty, Ljubljana, Slovenia

Introduction / Uvod

Rabies is a zoonotic disease of mammals, caused by infection with a negative-stranded RNA virus belonging to the Lyssavirus genus of the Rhabdoviridae family that can be divided into seven genotypes (Bourhy *et al.*, 1999), mainly transmitted via saliva through a bite from an infected animal (Niezgoda *et al.*, 2002). In central and southeast Europe the *red fox* (*Vulpes vulpes*) is the main source of infection (Lontai, 1997). Vulpine rabies was established in Slovenia in 1973 for the first time. Results of phylogenetic analysis of a limited number of rabies virus isolates from a region of Slovenia showed that the isolates belong to genotype 1, groups of CE (Central Europe) and WE (Western Europe) (Bourhy *et al.*, 1999). The control and eradication of rabies has been a common strategy of European Union member states since the beginning of the 1980s (Pastoret, 1998).

Vaccination of wild animals against rabies was developed in the United States (Blancou, 1985; Bear *et al.*, 1975) and was used for the first time in the field in Europe in Switzerland (Steck *et al.*, 1982). Switzerland proposed the vaccination strategy that has been followed by other European countries, consisting of the compartmentalisation of the infected areas using natural or artificial barriers. In Switzerland the last rabies case was recorded in 1996. In EU countries industrially-produced baits have been distributed since 1980s, using live attenuated rabies virus strains known as SAD Bern, SAD B19, SAD-P5/88, SAG1, SAG2. A plastic capsule containing the fluid vaccine is incorporated into manufactured baits containing fish meal (Ahl *et al.*, 2002).

An outbreak of rabies among racoon dogs and foxes started in 1988 in Finland, close to the south-east border of the country. Field vaccination campaigns were begun immediately with two campaigns per year, but since 1991 a single campaign has been done. Thereafter the country remained free of rabies, although the disease is endemic in Russia and Estonia (Metlin *et al.*, 2008).

The Belgian programme of vaccination covered the entire infected area from 1989 to 1991, with 5 campaigns in total, leading to an 80 % decrease of rabies cases. Then more restricted campaigns were conducted between 1992 and 1994 only along the borders of the country. Rabies cases were recorded again from 1994 to 1996, coming from a border residual focus. In 1996, the vaccination strategy was slightly modified and adapted to control rabies re-infected areas with a high density fox population. Two aerial vaccinations were carried out during the cold season (November and March, when the fox population density is the lowest in the year). Control of aerial distribution was improved by the use of GPS (Global Positioning System) and reducing the distance between flight lines, and baiting density was increased from 15 to 17 baits per km², supplemented by an additional den vaccination. Following this modification of the strategy and a close cross border co-operation with their French counterparts, rabies was effi-

ciently controlled. The last rabies case was diagnosed in July 1999 in a 28-month-old cow (Cliquet and Aubert, 2004).

In France, the peak for detected rabid animals with more than 4,200 cases was in 1989. The establishing of a natural barrier from the English Channel and the Swiss border succeeded in stopping the westward and southward spread of the disease. During the vaccination between 1989 and 1996 the infected area was shifted towards borders resulting in a 99.7% decrease of rabies incidence. In France, the last rabies case of vulpine origin was recorded in a cat in 1998. Part of the success story of the eradication of rabies in Europe was the close co-operation between Belgium, France, Luxembourg and Switzerland on preventing cross-border contamination and improving their vaccination techniques (Aubert *et al.*, 1986).

Italy carried out vaccination campaigns in the infected areas only when cases were recorded, since 1984. Rabies was eradicated in 1995, but after 13 years, in 2008 rabies was reintroduced again (De Benedictis *et al.*, 2008). Italy has been classified as a rabies-free country since 1997. In October 2008, two foxes were diagnosed with rabies in the Province of Udine, north-east Italy. One case of human exposure caused by a bite from one of the foxes has occurred and has been properly treated. Since then rabies has been continuing and new rabies cases have been reported in the north-east of the country in three regions; Veneto, Friuli-Venezia Giulia and Provincia autonoma di Trento. More than 180 animal cases have been recorded since 2008, mostly foxes, although other animals have been affected as well; badgers, deer, cats and donkeys. Most of the cases have been identified in the Veneto region where such numbers have increased significantly in 2010 (Mutinelli, 2010).

Due to oral vaccination some European countries are now rabies-free in terrestrial animals; Finland (1991), Netherlands (1991), Italy (from 1997 to 2008), Switzerland (1998), France (2000), Belgium (2001) and Luxembourg (2001) (Potsch *et al.*, 2002) and the Czech Republic as the last (Matouch *et al.*, 2007). In other eastern and southern European countries where vaccination has not been practiced the number of reported rabies cases is still high (Potsch *et al.*, 2002). Although the incidence of rabies has been greatly reduced with vaccination, the zone between a rabies positive area and a rabies negative area should remain as long as the disease is present in neighbouring countries. Unexpected outbreaks have been reported in many countries (Müller, 1997; Matouch and Vitasek, 2007, De Benedictis *et al.*, 2009). These problems were often resolved by increasing the number of vaccine baits (>30 baits/km²), changing the timing and the number of vaccinations, or improving and optimizing flight-line distances (Thulke *et al.*, 1999).

This paper describes the course of rabies eradication in Slovenia and the stability of the used vaccines in field conditions during the summer period.

Material and methods / *Materijal i metode*

Following of rabies epidemiological situation /

Praćenje epidemiološke situacije kod besnila

Rabies was common in Slovenia among dog populations before the Second World War but the disease was eradicated by the vaccination of local dogs during the 1950s. In 1973, the first sylvatic rabies was found in a north-east part of Slovenia. In cooperation with the WHO surveillance centre in Tübingen, Germany, a field campaign with oral vaccination of foxes started in September 1988. In the first period (from 1988 to 1992) the bait distribution was mainly done by local volunteer hunters, but aerial distribution was later used. The second period of eradication started in 1995 and successfully continued until 2010. Rabies cases were decreased first in the north-west part of the country and later along the border with Croatia a 30-50 km protection zone was formed.

According to the Slovenian legislation, veterinary organisations and hunters are obligated to send samples from an animal which had neurological symptoms of the disease for laboratory examination. The Veterinary Administration has regulated additional monitoring of rabies in foxes with the testing of 5 foxes per 100 km². An indirect immunofluorescence test (IIF) has been used for rabies diagnosis. It was performed on impression smears of Ammon's horn and cerebellum samples. The diagnostic technique was performed as it is prescribed in the Manual of standards for diagnostic tests and vaccines (Dean *et al.*, 1996). Immuno-fluorescent conjugate produced by the Bio-Rad Laboratories from France was used. Samples with doubtful results in the IIF test are retested using virus isolation on murine neuroblastoma cells (Webster and Casey, 1996) or with the RT-PCR test (Black *et al.*, 2002). The efficiency control of oral vaccination among foxes has been measured by active and passive monitoring with bait uptake control using the tetracycline biomarker detection method.

Oral vaccination / *Oralna vakcinacija*

The programme of oral vaccination is financed, inspected and planned by the Veterinary Administration of the Republic of Slovenia. In Slovenia, when vaccination was started in 1988, the distribution sites were determined based on locations of previous outbreaks. However, due to an insufficient budget, at the beginning, not every infected area was baited each year. The programme was often interrupted but it has been done regularly at nation level since 1995. The basis of the rabies eradication programme in Slovenia consists of compulsory vaccination of all dogs and regular oral vaccination of foxes. Oral vaccination of foxes started in the whole territory in 1995. During the first two years only the Fuchsoral vaccine which contains the SAD B19 attenuated rabies strain (Steck *et al.*, 1982, Schneider and Cox, 1983) was in use. In the period from 1998 to 2004 the

vaccine Fuchsoral was placed in the east part of the country and the vaccine Lysvulpen® (Vrzal *et al.*, 1996) containing strain SAD Bern produced by Bioveta, Ivanovice, Czech Republic was placed in the west part of the country. Since 2006, only the Fuchsoral vaccine has been used. Baits have been dropped by aircraft twice per year as a rule in September - October and May - June. In 1999 an area of 18,800 km² was covered (the entire territory is 20.273 km²), while the high mountain and the urban area was not included. Later in 2000 when neighbouring countries Italy and Austria eradicated rabies, only the area of a 12,500 km² belt in the south of the country was vaccinated. The average bait distribution density ranged from 20 - 25 baits/km². The baits were dispersed from a height of 300 – 500 meters. Pilots used the GPS navigation system for orientation and a computer-monitored discharge. A special computer program named FICO3J® (constructed by computer engineer Aleksander Modic) monitored the route, time of flying and calculated the density of distributed baits. During the period between 1995 and 2009, over 8 million baits were distributed across the country. Since 2009, after the rabies reintroduction in Italy, vaccination has been carried out in the whole territory of Slovenia again.

Bait stability experiment / *Eksperiment stabilnosti mamaca*

The thermo-stability of both vaccines used for oral vaccination (named now vaccine A and vaccine B) was tested under field conditions. The vaccine baits were placed on three different locations: in the open cut-grassing places, where direct sun was possible (Location 1), in the high grass (Location 2) and in the shadow under trees and bushes (Location 3), where direct sunlight was disabled. The distance between the three locations was not longer than 100 m. This experiment was done during the summer period (from July to August). Ten baits of vaccine A and ten baits of vaccine B were placed in location 1, 30 baits of vaccine A and 30 baits of vaccine B were placed in location 2, and 50 baits of vaccine A and 50 baits of vaccine B were placed in location 3. Baits were laid down directly on the ground in a way that distances between baits were at least 2 cm. Baits were covered with boxes made of wire to be protected against predators. The minimum and maximum temperature in each place was recorded daily using a contact thermometer. Sensors of the thermometer were placed in an ampoule of bait to measure real temperature in the bait. The consistence of baits matrix was observed and described on a daily basis. Baits were collected daily in the morning and stored at minus 70°C until virus titres were determined using a microtitration technique (Aubert MFA., 1996). Briefly, the bait matrix was removed and the liquid of the vaccine was placed into tubes and centrifuged at 2.500 x g for 15 min at 4°C. Ten-fold dilutions from 10⁻¹ to 10⁻⁷ were prepared in mock plates (180 µl cell culture medium and 20 µl of sample) and 50 µl of each dilution was transferred onto 96-well tissue culture microplates (Nunc). Each dilution was transferred into three wells and BHK₂₁ cell cultures were added and plates were incubated for five

days at 37°C to determine the end-point dilution of the virus. After the incubation period, the cell culture medium was removed and cells were fixed with 85% acetone at -20°C. The detection of the rabies virus in cell culture was carried out by an IIF. Briefly, conjugate (BIO-RAD Laboratories, France) were diluted 1:20 in PBS-T (0.01 M phosphate buffered saline plus 0.05% (v/v) Tween 20) and added on the air-dried cell monolayer in 96-well microplates. After one hour of incubation at 37°C, the cells were rinsed with PBS-T and the cell monolayer was examined by UV light microscopy (Zeiss, Axiovert 25, Germany). The virus titre was then calculated as TCID₅₀/ml.

Results / Rezultati

Rabies situation in Slovenia / Situacija sa besnilom u Sloveniji

During the period from 1995 – 2009, 28,095 samples from different animal species were tested and 1,758 of them were rabies positive in the IIF test. The majority of positive cases (94.6 %) were found in wildlife, while among domestic animals only 5.4 % positive cases were recorded. Among wildlife animals, foxes were rabies positive in 1,579 cases, martens in 31, badgers in 22, roe in 23, wild boar 2, red deer in 1 and polecat 2. The highest number of rabies among domestic animals was detected among cats (53 rabies positive cases) followed by dogs (34 rabies positive cases), cattle (7 positive), sheep (3 positive) and horses (1 positive). Comparing the years before (period 1990 – 1995) and after the beginning of the vaccination in the whole country (period 1996 – 2000) the incidence of rabies cases dramatically decreased from 2,989 to 411 rabies positive cases. In 2004, 2005, 2006 and 2007 rabies was confirmed in 2, 3, 2 and 3 animals respectively. In 2008, 55 and in 2009, 34 rabies cases were registered (Table 1). All positive samples were collected in the vaccinated area close to the Croatian border. Only one case was found out of the vaccination area in 2009 in Kanal near the border with Italy.

Stability of vaccines in location 1 (open cut-grassing place) / Stabilnost vakcina na lokaciji 1 (otvoreno mesto sa isečenom travom)

The average maximum air temperature in location 1 during six days of the experiment was 29.8°C. The maximum daily air temperature in shadow was 34.4°C. The maximum recorded temperature measured in bait in the open placed area (location 1) was 46.3°C, and the minimum temperature during the night was 10.5°C. After 24 hours all baits matrix of vaccine B placed in location 1 showed total destruction and the vaccine container was not covered with matrix. In the case of vaccine A the bait matrix was partially destructed and the vaccine container was visible too. The experiment was finished after six days, because the total destruc-

tion of matrix baits was observed. The results of the titrations of both vaccines are shown in Figure 1. The initial titre of rabies virus in vaccine A was $7.47 \log_{10}$ TCID₅₀/ml and the titer of virus in vaccine B was $7.57 \log_{10}$ TCID₅₀/ml. After 24 hours the titre of rabies virus in vaccine A decreased to $2.62 \log_{10}$ TID₅₀, on day 2 it was $0.71 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, on day 3 the virus was not detectible on BHK₂₁ cell culture. After 24 hours the virus titre in vaccine B decreased to $1.67 \log_{10}$ TCID₅₀ and after 48 hours it was not detectible. The colour of liquid in bait vaccine B was changed in all capsules on day 2 and bacterial contamination with *Xanthomonas maltophilia* and *Enterococcus sp.* was subsequently proved.

Table 1. Number of rabies positive animals and percentage of foxes marked by tetracycline in the vaccinated areas

Tabela 1. Broj životinja pozitivnih na besnilo i procenat lisica obeleženih tetraciklinom u područjima vakcinacije

Year / Godina	No. of tested animals / Broj ispitanih životinja	Total No. of rabid animals / Ukupan broj besnih životinja	Percentage / Procenat (%)	No. of rabid foxes / Broj besnih lisica
1995	3,787	1,089	28.76	996
1996	2,285	247	10.81	208
1997	781	29	3.71	18
1998	1,382	14	1.01	14
1999	1,195	6	0.50	5
2000	1,509	115	7.62	104
2001	2,153	135	6.27	117
2002	1,495	15	1.00	14
2003	993	8	0.81	8
2004	1,612	2	0.12	2
2005	1,03	3	0.19	3
2006	1,796	2	0.11	2
2007	2,075	3	0.14	3
2008	2,619	55	2.10	51
2009	2,810	35	1.25	34
Total / Ukupno:	28,095	1,758		1,579

Stability of vaccines in location 2 (high grass) /

Stabilnost vakcine na lokaciji 2 (visoka trava)

The titres of rabies virus in vaccine A and B placed in high grass (half shade conditions) was measured during 18 days. The mean value of the maximum temperature was 36.6°C and the minimum 14.2°C. In vaccine A the virus was detectable 16 days and 14 days in vaccine B. The virus titre in vaccine A decreased by 50 % during 10 days, but in vaccine B in 9 days. The bait matrix be-

came damaged after 9 days in vaccine A, but in vaccine B the ampoules were naked on the 3rd day of observation.

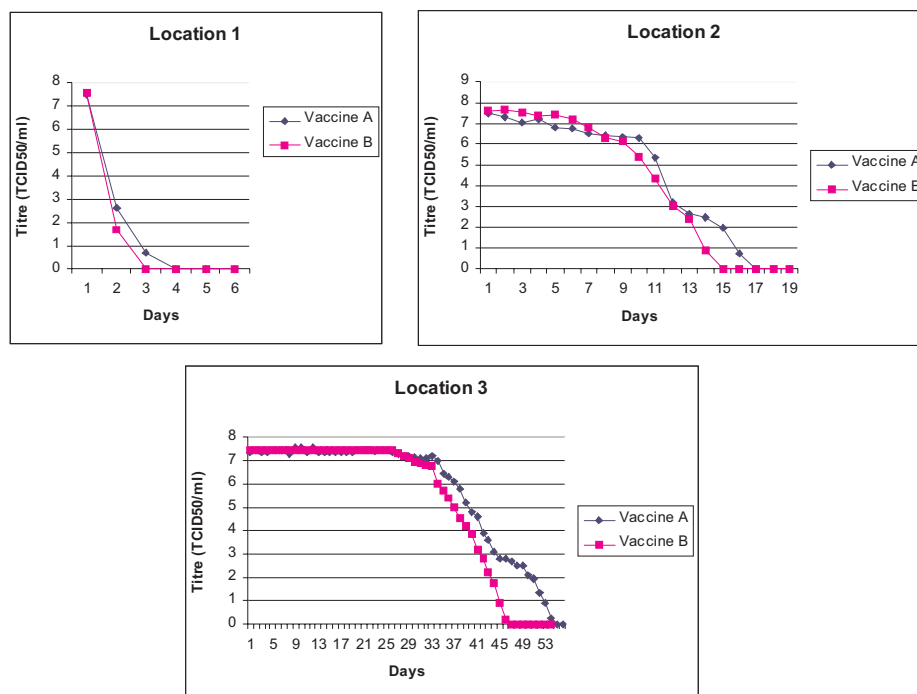


Figure 1. Vaccine titre stability in field conditions /
Slika 1. Stabilnost titra vakcine u uslovima na terenu

Vaccine stability in location 3 (in shadow under trees and bushes) /
Stabilnost vakcine na lokaciji 3 (u senci ispod drveća i žbunja)

The titres of rabies virus in both vaccines were observed for 55 days. The mean value of the maximum temperature was 23.5°C and the mean value of the minimum temperature during the observation period was 13.8°C. The titre of the rabies virus in vaccine A in location 3 was stable for 34 days and the titre decreased by 50 % on day 40. The virus in vaccine B was detectible up to 45 days, and the titre decreased by 50 % on day 39. The bait matrix in vaccine A remained intact during the observation period, but the bait matrix of vaccine B became destructed on day 16 and the ampoule with vaccines was visible.

Discussion / Diskusija

The monitoring of the epidemiological situation in Slovenia is based on quite a big number of collected samples each year. Hunters are motivated to send samples to the laboratory with compensation for each hunted fox, paid by the government. Through all these years we are approaching the WHO recommendation with at least 8 animals per 100 km² to ensure successful control. The results of vaccination between 1988 and 1992 have shown that the vaccination must be continuous, but the use of volunteers for vaccination purposes was unsatisfactory in the long term and the vaccination area did not cover enough territory. Due to the fox rabies vaccination the density of the fox population was enlarged, which shall be considered when planning the vaccination. The increased number of detected rabies cases between 2000 and 2001 was linked to the insufficient number of baits per number of increased fox populations, which has been noted also by other authors (Selhorst *et al.*, 2006). In the period from 1992 to 1996 the territory of Slovenia was heavily affected by rabies, but a rapid decline of rabies was detected between 1995 and 1999, when the oral vaccination programme in the whole territory was practiced using an aircraft bait distributing system (Table 1). In 1999 only 6 rabies cases were laboratory-confirmed, whereas only four years previously a total of 1,089 rabies cases were documented (181-fold decrease). The data in Table 1 shows that in Slovenia foxes account for the most cases diagnosed as positive. Domestic animals infected with rabies represent only a small proportion (4,85 %) of all rabid animals. This low percentage of rabies cases among domestic animals shows that the vaccination programme for dogs and other domestic animals is useful. According to our experiences during two decades the eradication of rabies among wild animals is a long lasting process. An efficient rabies eradication process requires trans-border cooperation which is still missing for the south part of our territory. Despite all the troubles, member states of the EU are efficiently pushing rabies cases from the west part of the EU towards the south-east (Selhorst *et al.*, 2006). The minimum size of a vaccination area should be 5,000 km² (WHO and EU recommendations). If the precise location of a wildlife rabies case is known, the size of the vaccination area is calculated by drawing a circle of 40 km radius around each case. The 27 EU member states have different rabies situations, 9 counties are free of rabies, Belgium (2001), France (2000), Luxembourg (2001), Finland (1991), Netherlands (1991), Czech Republic (2004), Germany (2008) and Italy (1997 – 2008). All these countries have become rabies free as a result of wildlife oral vaccination programmes. All other infected EU countries are currently conducting oral vaccination programmes (Have *et al.*, 2008).

Between 1988 and 1993 in Slovenia the baits were distributed partly using hunters' help plus using helicopters and aircraft. From this experience it turned out that it was impossible to control the actual bait distribution per km². Consequently the decision was made in the second phase of vaccination in 1995

to start dropping the baits by using aeroplanes and GPS, which has proven to be of great value to the pilot as it enables direct control of the dropped baits. The density of baits was increased from 18 bait/km² (1995) to 22 - 25 bait/km² (2010). When we used the vaccines of two different manufacturers (Fuchsoral and Lysvulpen) the experiment of bait stability was performed. It has been determined that the matrix of vaccine A was more stable comparing to the stability of the matrix of vaccine B. From this experiment we can conclude that the vaccination cannot be carried out on days with daily temperatures over 30°C due to the rapid disintegration of the bait matrix. The vaccine sensitivity to high temperatures has been previously reported by Vos and Naubert (2002). The Lysvulpen vaccine stability in another study showed that it is not very suitable for use in summer time (Picard *et al.*, 2006). Some authors (Masson *et al.*, 1999) reported that the recombinant vaccine VRG is remarkably thermo-stable, indifferent to high temperatures in nature and appropriate for carrying out a vaccination in summer months, which is necessary in case of the need for emergency vaccination. Daily temperatures during spring time in our country (end of May, start of June), when the vaccination campaign is performed, often reach 30°C. In this case the vaccine that is sensitive to high temperatures is not efficient enough. Balbo and Rossi (1988) have proven that foxes, vaccinated with baits, which have been exposed to high daily temperatures, contain lower antibody titre. Baits of vaccine A in our study which were laid down in location 2 (high grass) were appropriate for fox vaccination for 9 days, and vaccine B only 3 days because of the degradation of the matrix, although the virus titre was for both vaccines above 6,0 log₁₀/TCID₅₀/ml on day 9. Baits, distributed during the vaccination campaign in forest shadow are considerably more efficient and the matrix of vaccine A in the experiment remained unchanged throughout the 55-day-long testing period. On the other hand, the capsules of vaccine B were less stable and became visible in the same period for 45 % of the tested baits. The percentage of forest areas exceeds 65 % of Slovenian territory and the percentage of agricultural area is around 28 %, which means that there are not a considerable number of baits dropped in an open area such as in our test location 1. During spring time many authors observed a lower uptake of baits comparing to the results obtained for autumn. In spring time, more than 70 % of the baits were taken within 3 to 6 days, but in autumn within 3 days, and the reason for such a difference can be the abundance of food in springtime for foxes (Pastoret *et al.*, 1998).

The protected vaccination zone should be at least a 40 km belt with over 70 % of vaccinated foxes to achieve satisfactory protection of rabies re-entry from an infected area to a rabies free area (Vos *et al.*, 2001). When a considerably large number of rabies cases in Croatia was discovered there was an increased number of rabies cases in Slovenia as well (www.who-rabies-bulletin.org/Queries/Surveillance.aspx?Issue=2009_4), however all the rabies positive animals were discovered in the vaccination zone not more than 15 km from the Croatian boarder. But in the year 2009 one rabid fox was found near the Italian border, 30 km out of the vaccination area, probably as a result of insufficiently wide vaccina-

tion belts in the small border territory of Italy, Croatia and Slovenia. The narrowest vaccination belt in this region was between Trieste (Italy) and Jelovice (Croatia) with only 12 km in distance. A high number of infected foxes in Croatia was detected over the years and this represent a continuous risk for the reintroduction of rabies into our territory. The objective of a buffer zone in Slovenia is to maintain an adequate immunity in the fox population in order to prevent rabies epidemics in Slovenia and also neighbouring countries such as Italy and Austria. Occasionally, administrative borders may constitute barriers to the movement of foxes, but in most situations vaccination zones need to be defined and vaccination campaigns synchronised across administrative borders. A good example of cross border co-operation was in the case of the reappearance of rabies in Italy on the border with Slovenia and Austria in 2008 (De Benedictis *et al.*, 2009). An emergency vaccination plan for Italy, Slovenia and Austria was made and the vaccination area in Slovenia was spread to the whole territory again. Italy implemented local vaccination in 2008 with a protected zone in infected areas (Italy has rabies-free status and the last campaign was carried out in 2004), two times per year in the three provinces of Udine, Gorizia and Trieste close to the border of Slovenia. In order to avoid the spread of sylvatic rabies from Slovenia and Italy to Austria, Austria has also been carrying out an emergency vaccination campaign. The recent example of rabies introduction into Italy clearly demonstrated the need for rabies free countries to maintain rabies expertise and effective disease surveillance both for domestic animals and for wildlife.

ACKNOWLEDGEMENT / NAPOMENA:

We wish to thank hunters for providing field samples for testing. This work was aided by the Veterinary Administration of the Republic of Slovenia.

Želimo da se zahvalimo lovcima za obezbeđivanje uzoraka sa terena za ispitivanje. Ovaj rad je pomog-nut od strane Veterinarske administracije Republike Srbije

Literatura / References

1. Ahl R, Alexander DJ, Broom DM, Dantzer R, Gunn M, Have P, Jensen OS, Neindre PL, Morton DB, Moeninnig V, Noordhuizen PTM, Panina G, Parodi AL, Sharp JM, Oirschot JT, Vanpopdenbosch E, Verga M, Wierup JFM. The oral vaccination of foxes against rabies. Report of the scientific committee on animal health and animal welfare. European Commiission 2002; 1-55.
2. Aubert MFA. Methods for the calculation of titres. In Laboratory techniques in rabies. 4th edition. Edt by Meslin FX et al Genova WHO, 1996; 445-59.
3. Bear GM, Abelseth MK, Dean DJ. Oral vaccination of foxes against rabies, Am J Epidemiol 1975; 93: 487-90.
4. Blancou J. Vaccines and vaccination against rabies for domestic and wild animals in Europe. Rev Sci The Off Int Epiz 1985; 4: 249-59.
5. Bourhy H, Kissi B, Audry L, Smreczak M, Sadkowska-Todys M, Kulonen K, Tordo N, Zmudzinski JF, Holmes EC. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. J Gen Virol 1999; 80: 2545-57.
6. Cliquet F, Aubert M. Elimination of terrestrial rabies in Western European countries. Dev Biol (Basel) 2004; 119: 185-204.

7. De Benedictis P, Capua I, Mutinelli F, Wernig JM, Arič T, Hostnik P. Update on Fox Rabies in Italy and Slovenia. *Rab Bull Europe* 2009; 33: 7-9.
8. Have P, Alban L, Berndtsson LT, Cliquet F, Hostnik P, Rodeia SC, Sanaa M. Risk of rabies introduction by non-commercial movement of pets. *Dev Biol (Basel)* 2008; 131: 177-85.
9. Lontai I. The current state of rabies prevention in Europe. *Vaccine* 1997; 15 (suppl.): 16-9.
10. Masson E, Bruyere-Masson V, Vuillaume P, Lemoyne S, Aubert M. Rabies oral vaccination of foxes during the summer with the VRG vaccine bait. *Vet Res* 1999; 30: 595-605.
11. Matouch O, Vitasek J, Semerad Z, Malena M. Rabies-free status of the Czech Republic after 15 years of oral vaccination. *Rev Sci Tech* 2007; 26(3): 577-84.
12. Metlin AE, Rybakov SS, Gruzdev KN, Mikhlishin VV, Huovilainen A, Neuvonen E. Finnish-Russian programme for the control of rabies (2005-2010). *Dev Biol (Basel)* 2008; 131: 233-8.
13. Muller WW. Where do we stand with oral vaccination of red foxes against rabies in Europe? *Archives of Virology Suppl* 1997; 13: 83-94.
14. Mutinelli F. Rabies and feral cat colonies in Italy. *Vet Rec* 2010; 166(17): 537-8.
15. Niezgodna M, Hanlton CA, Rupprecht CE. Animal rabies. In *Rabies* ed. Jackson AC and Wunner WH. Academic press, Elsevier, Amsterdam, 2002; 163-219.
16. Pastoret PP, Brochier B. Epidemiology and elimination of rabies in Western Europe. *Vet J* 1998; 156: 83-90.
17. Picard E, Barrat J, Biarnias M, Boue F, Cliquet F. Avaluation of the stability of Lysvulpen vaccine baits (batches 92,13 and 93,13). Report of 31 March 2006. AFSSA, OIE reference laboratory for rabies, 2006.
18. Potzsch CJ, Müller T, Kramer M. Summarizing the Rabies situation in Europe 1990 – 2002 from the Rabies Bulletin Europe. *Rab Bull Eu* 2002; 4, 11-7.
19. Selhorst T, Müller T, Bätza HJ. Epidemiological analysis of setbacks in oral vaccination in the final stage of fox rabies elimination in densely populated areas in Germany. *Dev Biol (Basel)* 2006; 125: 127-32.
20. Steck F, Wandeler AL, Capt S, Haflinger U. Oral immunization of foxes against rabies. Laboratory and field studies. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1982; 5: 165-71.
21. Thulke HH, Staubach C, Tischendorf L, Muller S, Schluter H. New answers to the questions of continued rabies control in Germany. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1997; 104: 492-5.
22. Vos A, Müller T, Selhorst T, Schuster P, Neubert A, Schlüter H. Optimising spring oral vaccination campaigns of foxes against rabies. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 2001; 108(2): 55-9.
23. Vos A, Neubert A. Thermo-stability of the oral rabies virus vaccines SAD B19 and SAD P5/88, 2002; 109(10): 428-32.

SRPSKI

**ODRŽAVANJE I KONTROLA VAKCINACIONOG POJASA DUŽ SUSEDNE POVRŠINE
INFIKIRANE BESNILOM**

P. Hostnik, Jedrt Maurer Wernig, Danijela Rihtarič, J. Grom, T. Malovrh, I. Toplak

Program oralne vakcinacije divljači započet je 1988. u Sloveniji i zasniva se na sopstvenom i na iskustvu drugih zemalja. Crvene lisice su glavni rezervoar besnila u Sloveniji. Kada je program oralne vakcinacije započet na celoj teritoriji Slovenije 1995. godine, 1089 (28,75%) ispitivanih životinja je bilo pozitivno među divljim i domaćim životinjama. Četiri godine kasnije, otkriveno je samo 6 (0,5%) pozitivnih slučajeva među 1195 ispitivanih životinja. Broj pozitivnih slučajeva se zatim ponovo povećao godine 2001., i to na 135 slučajeva. Između 2002. i 2008. godine vakcinacija je vršena isključivo u zaštićenoj zoni, na 30 do 50 km širokom pojasu duž južne granice sa Hrvatskom, jer nije bilo ustanovljenih novih slučajeva besnila u severozapadnom delu zemlje. Kada se besnilo ponovo pojavilo u Italiji 2008. godine, ponovo je izvršena vakcinacija na celoj teritoriji Slovenije. U cilju poboljšanja kampanje vakcinacije, stabilnost dveju vakcina je merena tokom 8 nedelja. Kod obe vakcine zabeležen je najveći pad virusnog titra u slučajevima kada su mamci postavljeni na sunce, dok je virus detektovan do 53. dana posmatranja kada je mamac postavljen na senovito mesto. Cilj ove studije je da se rezimira sadašnji status besnila i da se potraže najbolja rešenja kod sprovođenja kampanje vakcinacije.

Ključne reči: besnilo, oralna vakcinacija, kontrola

РУССКИЙ

**СОДЕРЖАНИЕ И КОНТРОЛЬ ВАКЦИНАЦИОННОГО ПОЯСА ВДОЛЬ СОСЕДНЕЙ
ПОВЕРХОСТИ ИНФИЦИРОВАННОЙ БЕШЕНСТВОМ**

P. Hostnik, Jedrt Maurer Wernig, Danijela Rihtarič, J. Grom, T. Malovrh, I. Toplak

Программа оральной вакцинации дичи начата 1988 в Словении и основывается на собственном и на опыте других стран. Красные лисы главный резервуар бешенства в Словении. Когда программа оральной вакцинации начата на целой территории Словении 1995 года, 1089 (28,75%) испытанных животных было положительно среди диких и домашних животных. Четыре года позднее, открыто только 6 (0,5%) положительных случаев среди 1195 испытанных животных. Число положительных случаев затем снова увеличилось 2011 года, а именно на 135 случаев. Между 2002 и 2008 годами вакцинация совершена исключительно в защитной зоне, на 30 до 50 км широком поясе вдоль южной границы с Хорватией, ибо не было установленных случаев бешенства в северо-западной части страны. Когда бешенство снова появилось в Италии 2008 года снова совершена вакцинация на целой территории Словении. С целью улучшения кампании вакцинации, стабильность двух вакцин мерена в течение 8 недель. У обеих вакцин записано самое большое падение вирусного титра в случаях, когда привады поставлены на солнце, пока вирус детектован до 53 дня наблюдения, когда привада поставлена на тенистое место. Цель этого научного труда резюмировать нынешний статус бешенства и поискать самые хорошие решения у проведения кампании вакцинации.

Ключевые слова: бешенство, оральная вакцинация, контроль

**ISPITIVANJA ODREĐENIH HEMIJSKIH POKAZATELJA
KVALITETA FERMENTISANIH SUVIH KOBASICA***
*EXAMINATIONS OF CERTAIN CHEMICAL CHARACTERISTICS OF
FERMENTED DRY SAUSAGE QUALITY PARAMETERS*

**Marija V. Vukašinović, V. S. Kurčubić, Vesna M. Kaljević, P. Z. Mašković,
M. D. Petrović****

Prema podacima dostupnim iz literature zapazili smo visok stepen varijacija vrednosti mnogih fizičko-hemijskih pokazatelja kvaliteta fermentisanih kobasica, pa smo za cilj našeg ispitivanja postavili što sveobuhvatnije ispitivanje odabranih hemijskih parametara kvaliteta – sadržaj ukupnih proteina, relativan sadržaj proteina vezivnog tkiva i sadržaj vlage u deset različitih proizvoda koji pripadaju grupi fermentisanih suvih kobasica. Drugi cilj je bio da vrednosti dobijene u našem ispitivanju uporedimo sa referentnim vrednostima predviđenim Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa (Sl. glasnik SCG, no. 33/2004) i odredimo procentualnu zastupljenost i razloge za neusaglašenost kvaliteta proizvoda, koji se stavljaju van prometa. Koristili smo dve standardne, referentne hemijske metode – određivanje sadržaja azota i vlage (SRPS ISO 937:1992 i SRPS ISO 1442:1998), kao i modifikovanu metodu M050 za određivanje sadržaja hidroksiprolina.

Na osnovu rezultata ispitivanja možemo zaključiti da na reprezentativnom broju ispitanih uzoraka ($n = 156$), poreklom od 10 različitih proizvoda iz grupe fermentisanih suvih kobasica, 51 uzorak (32,7%) nije ispunjavao zahteve propisane Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa. Od navedenog broja uzoraka, razlog neusaglašenosti kvaliteta 40 uzoraka (25,6%) je bio viši nivo RSPVT, a kod 18 uzoraka (11,5%) viši sadržaj vlage. Niži sadržaj ukupnih proteina od onog propisanog Pravilnikom nije utvrđen ni u jednom od ukupnog broja ispitanih uzoraka.

Ključne reči: fermentisane suve kobasice, sadržaj ukupnih proteina, relativan sadržaj proteina vezivnog tkiva (RSPVT), sadržaj vlage

* Rad primljen za štampu 05. 09. 2011. godine

** Dr sci Marija V. Vukašinović, naučni saradnik, Veterinarski specijalistički Institut „Kraljevo“, Srbija; dr sci med. vet. Vladimir S. Kurčubić, docent, Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Srbija; mr sci. Vesna M. Kaljević, Veterinarski specijalistički Institut „Kraljevo“, Srbija; dr sci Pavle Z. Mašković, asistent, dr sci Milun D. Petrović, docent, Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Srbija

Uvod / Introduction

Fermentisane kobasice su proizvodi dobijeni od različitih tipova mesa i čvrstog masnog tkiva različitog stepena usitnjenosti, kojima mogu biti dodati kuhinjska so, zamena soli, aditivi, začini, ekstrakti začina, šećeri i starter kulture, koje se nakon punjenja u omotače konzerviraju procesima fermentacije i sušenja, sa ili bez dimljenja, i sadrže manje od 35% vode. Tokom procesa zrenja dobijaju karakterističan kvalitet, postaju mikrobiološki i hemijski stabilni, održivi proizvodi (Vuković, 2006). Pripremaju se od najranijih civilizacija, pretežno na tradicionalan način. Popularni su za konzum kod miliona potrošača širom sveta. Zahtevi današnjeg tržišta ugrožavaju tradicionalan način proizvodnje, zbog njegove dugotrajnosti (Arnau i sar., 2007).

Razvijen je veliki broj različitih tipova fermentisanih kobasica, što je uslovljeno sastavom, stepenom usitnjenosti sastojaka, dijametrom omotača, sezonom proizvodnje, primenom dimljenja i plesni, trajanjem zrenja. U Nemačkoj, koja je jedan od glavnih proizvođača kobasica, proizvodi se preko 350 tipova, iako tradicija proizvodnje fermentisanih kobasica postoji samo 160 godina. O značaju ove visokovredne grupe kobasica govori podatak da se u Evropskoj uniji na godišnjem nivou proizvede oko 750000 tona (Lücke, 1998). U Španiji je katalogizovano oko 50 varijeteta, mada se mnogo više tipova proizvede u zanatskoj preradi (MAPA, 1997).

Odgovarajući odabir sirovog mesa i masnog tkiva (osnovna tehnološka operacija) ukazuje na to da je proizvodnja fermentisanih kobasica zasnovana na kontrolisanju biohemijskih procesa enzimske i mikrobiološke prirode. Konačan kvalitet fermentisanih kobasica zavisi od dinamike promena frakcija ugljenih hidrata, proteina i masti. Zahvaljujuću njihovom intenzitetu, ovakve promene utiču više ili manje na formiranje senzornih, reoloških i mikrobioloških svojstava gotovog proizvoda (Incze, 1992; 1998; Flores and Bermell, 1996; Ansorena i sar., 2001; Erkkilä i sar., 2001; Andres i sar., 2002).

Tokom proizvodnog procesa fermentisane kobasice se ne obrađuju toplotom, što omogućava da nutritivno najvredniji sastojci mesa ostanu nepromenjene biološke vrednosti. Fermentisane kobasice se mogu proizvoditi kao funkcionalna hrana (Mendoza i sar., 2001; Muguerza i sar., 2004; Müller, 2006; Vasiliev i sar., 2007; Vuković i sar., 2007), korišćenjem probiotika kao starter kultura, što im daje poseban značaj (Vuković i sar., 2007).

Fermentisanim kobasicama se može produžiti rok upotrebe (shelf life), interakcijom dva antimikrobna faktora: simultanim smanjenjem vrednosti aktivnosti vode (a_w) i pH vrednosti. U Centralnoj i Severnoj Evropi se smatra da je pad pH vrednosti (smanjenje sa 5,6–5,8 na 4,6–4,9) fermentisanih proizvoda od mesa najznačajniji put njihovog očuvanja, dok se u mediteranskim zemljama pad vrednosti aktivnosti vode (a_w) uzima kao značajniji parametar pri konzervaciji (Vandendriessche, 2008).

Johansson i sar. (1994) su dokazali rast sadržaja ukupnih proteina ($N \times 6.25$) od 14,8% na početku do 22,4% nakon 21 dana prerade, uključujući zrenje na 25°C tokom 7 dana i sušenje na temperaturi frižidera, tokom dve nedelje. Rast sadržaja ukupnih proteina pripisan je primarno procesu sušenja. Ikonić i sar. (2010) su zapazili da je sadržaj proteina ($\approx 30\%$) utvrđen u većini ispitivanih uzoraka *Petrovske klobáse*, proizvedene na tradicionalan način, sličan onom u italijanskim tradicionalnim suvim kobasicama (Moretti i sar., 2004) ili čak viši u poređenju sa objavljenim vrednostima za većinu različitih fermentisanih kobasica (Casiraghi i sar., 1996; Tojagić, 1997; Stamenković i sar., 1998; Lorenzo i sar., 2000; Comi i sar., 2005; Salgado i sar., 2006).

Sadržaj vlage može značajno varirati tokom perioda zrenja (od 58,9% do 26,4%), što su u 8 ispitivanih tipova fermentisanih suvih kobasica dokazali Acton i Dick (1976). Ikonić i sar. (2010) iznose da su srednje vrednosti vlage u gotovom proizvodu (*Petrovska klobása*) sa intervalom varijacije od $22,14 \pm 1,00$ do $29,11 \pm 0,47$. Prikazane vrednosti su nešto više nego one utvrđene za sremsku kobasicu (Tojagić, 1997), a slične vrednostima pronađenim u nekim italijanskim kobasicama (Moretti i sar., 2004; Bianchi i sar., 1974), ali niže u poređenju sa tradicionalnim španskim kobasicama *Androlla*, *Botillo* i *Chorizo de cebolla* (Lorenzo i sar., 2000; Salgado i sar., 2006) i *Milano Salami* (Casiraghi i sar., 1996).

Trbović i sar. (2009) su ispitivali fizičko-hemijska svojstva uzoraka fermentisanih kobasica užeg dijametra (sremska i levačka, proizvedene u industrijskim uslovima, i užička, proizvedena u porodičnom domaćinstvu). Ogled je izveden u tri ponavljanja, a dobijeni rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ispitivanja. Sadržaj vlage, na kraju proizvodnje, u užičkoj kobasici je iznosio 36,4%, a u sremskoj i levačkoj kobasici je bio 23,1%, odnosno 22,3%. Rezultati su karakteristični za ovu vrstu proizvoda, pri čemu uzorci sremske i levačke kobasice, proizvedene u industrijskim uslovima, imaju ujednačeniji karakter posmatranih promena tokom procesa proizvodnje.

Fermentisane kobasice sa domaćeg tržišta sadrže 17,52% do 32,96% proteina mesa, a relativan sadržaj proteina vezivnog tkiva u proteinima mesa je od 6,22% do 31,15% (Saičić i sar., 2006).

Prema podacima dostupnim iz literature zapazili smo visok stepen varijacija vrednosti mnogih fizičko-hemijskih pokazatelja kvaliteta fermentisanih kobasica, pa smo za cilj našeg ispitivanja postavili što sveobuhvatnije ispitivanje odabranih hemijskih parametara kvaliteta – sadržaj ukupnih proteina, relativan sadržaj proteina vezivnog tkiva i sadržaj vlage u deset različitih proizvoda koji pripadaju grupi fermentisanih suvih kobasica. Drugi cilj je bio da vrednosti dobijene u našem ispitivanju uporedimo sa referentnim vrednostima predviđenim Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa (Sl. glasnik SCG, no. 33/2004) i odredimo procentualnu zastupljenost i razloge za neusaglašenost proizvoda, koji se stavljaju van prometa.

Materijal i metode / *Material and methods*

Uzorci / *Samples*

U našem radu ispitali smo ukupno 156 uzoraka fermentisanih suvih kobasica, proizvedenih od strane brojnih prerađivača registrovanih na teritoriji Zlatiborskog, Moravičkog, Raškog i Rasinskog okruga. Svi ispitani proizvodi (sa proizvođačkim nazivom pod kojim su deklarisani) prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. *Usaglašenost ispitivanih parametara kvaliteta fermentisanih suvih kobasica sa vrednostima propisanim Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa*

Table 1. *Compatibility of examined fermented dry sausage quality parameters with values prescribed by Regulations on quality and other requirements for meat products*

Br. / No.	Ime proizvoda / Name of product	Usaglašenost / <i>Compatibility</i>				
		+	–	<Ukupni proteini/ < Total proteins	>RSPVT / >RPCCT	>Vlaga / >Moisture
1	Kulen (n= 9)	7	2	-	2	2
2	Budimska (n= 25)	20	5	-	4	1
3	Sudžuk (n= 48)	15	33	-	24	12
4	Pikant (n= 2)	1	1	-	1	-
5	Planinska (n= 2)	2	0	-	-	-
6	Goveđa (n= 4)	2	2	-	2	2
7	Užička (n= 3)	3	0	-	-	-
8	Domaća salama (n= 3)	3	0	-	-	-
9	Domaća kobasica (n= 2)	2	0	-	-	-
10	Čajna (n= 58)	50	8	-	7	1
Σ = 156 uzoraka Σ = 156 samples		105 (67,3%)	51 (32,7%)	-	40 (25,6%)	18 (11,5%)

Analitičke metode / *Analytical methods*

Ispitivanja odabranih hemijskih parametara kvaliteta fermentisanih suvih kobasica smo izvršili sledećim metodama:

1. Određivanje sadržaja ukupnih proteina – SRPS ISO 937:1992
2. Određivanje relativnog sadržaja proteina vezivnog tkiva (RSPVT) – M 050 – modifikovana metoda razvijena u Veterinarskom specijalističkom institutu „Kraljevo“, kojom se iz utvrđene količine hidroksiprolina izračunava procenat vezivnog tkiva u svim vrstama mesa i proizvoda od mesa, uključujući i meso i proizvode od mesa živine.
3. Određivanje sadržaja vlage – SRPS ISO 1442:1998.

Obrada podataka / Data processing

Podaci prikazani u tabeli 2 (deskriptivna statistika) izračunati su uz pomoć Statistica statistical software for Windows Release 5.0.

Tabela 2. *Deskriptivna statistika hemijskog sastava ispitivanih fermentisanih suvih kobasica / Table 2. Descriptive statistics of examined fermented dry sausage chemical composition*

Ime proizvoda / Name of product	Hemijski sastav / Chemical composition (%)	$\bar{x}$	S_x	SD	Interval varijacije / Interval of variation	
					min	max
Kulen (n= 9)	Ukupni proteini / <i>Total proteins</i>	26.597	0.962	2.888	22.250	31.400
	RSPVT / <i>RPCCT</i>	12.857	1.496	4.489	5.410	19.350
	Vlaga / <i>Moisture</i>	32.050	1.872	5.615	23.200	41.330
Budimska (n= 25)	Ukupni proteini / <i>Total proteins</i>	23.382	0.578	2.892	16.510	28.030
	RSPVT / <i>RPCCT</i>	17.467	0.926	4.629	6.740	27.870
	Vlaga / <i>Moisture</i>	28.182	1.023	5.115	19.040	36.370
Sudžuk (n= 48)	Ukupni protein / <i>Total proteins</i>	26.397	0.647	4.485	19.140	41.020
	RSPVT / <i>RPCCT</i>	17.814	0.813	5.635	2.730	26.580
	Vlaga / <i>Moisture</i>	30.019	1.016	7.041	14.530	44.880
Pikant (n= 2)	Ukupni proteini / <i>Total proteins</i>	24.740	1.790	2.531	22.950	26.530
	RSPVT / <i>RPCCT</i>	19.350	2.250	3.182	17.100	21.600
	Vlaga / <i>Moisture</i>	24.695	2.915	4.122	21.780	27.610
Planinska (n= 2)	Ukupni proteini / <i>Total proteins</i>	26.670	0.080	0.113	26.590	26.750
	RSPVT / <i>RPCCT</i>	8.005	3.995	5.650	4.010	12.000
	Vlaga / <i>Moisture</i>	28.100	0.820	1.160	27.280	28.920
Goveđa (n= 4)	Ukupni proteini / <i>Total proteins</i>	23.017	0.975	1.950	20.450	25.060
	RSPVT / <i>RPCCT</i>	17.472	6.183	12.367	6.820	31.630
	Vlaga / <i>Moisture</i>	31.910	4.217	8.435	21.970	40.560
Užička (n= 3)	Ukupni proteini / <i>Total proteins</i>	32.253	3.127	5.415	27.200	37.970
	RSPVT / <i>RPCCT</i>	10.150	4.020	6.963	6.070	18.190
	Vlaga / <i>Moisture</i>	33.437	0.613	1.062	32.450	34.560
Domaća salama (n= 3)	Ukupni proteini / <i>Total proteins</i>	26.540	2.286	3.960	22.020	29.400
	RSPVT / <i>RPCCT</i>	6.590	1.715	2.971	3.480	9.400
	Vlaga / <i>Moisture</i>	28.907	1.398	2.421	26.450	31.290
Domaća kobasica (n= 2)	Ukupni proteini / <i>Total proteins</i>	27.865	2.805	3.967	25.060	30.670
	RSPVT / <i>RPCCT</i>	12.855	2.995	4.235	9.860	15.850
	Vlaga / <i>Moisture</i>	22.250	3.550	5.020	18.700	25.800
Čajna (n= 58)	Ukupni proteini / <i>Total proteins</i>	23.771	0.347	2.644	17.730	31.690
	RSPVT / <i>RPCCT</i>	14.926	0.710	5.410	3.290	35.360
	Vlaga / <i>Moisture</i>	27.114	0.576	4.385	17.220	36.120

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Prema odredbama Pravilnika o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa (Sl. glasnik SCG, no. 33/2004), ukupan sadržaj proteina u proizvodima navedene grupe ne sme biti manji od 22%, a RSPVT ne sme biti veći od 15%. U salami ukupan sadržaj proteina ne sme biti niži od 22%, a RSPVT ne sme prelaziti 15%. Ukupan sadržaj proteina u sudžuku ne sme biti niži od 16%, a RSPVT ne sme biti veći od 20%. Minimalan ukupan sadržaj proteina u čajnoj kobasici je 16% %, a RSPVT do 20%. Drugi (srodni) tipovi proizvoda moraju biti u skladu sa članom 42, tačka 1 i članom 43, tačka 1 Pravilnika, pri čemu ukupan sadržaj proteina u njima ne sme biti niži od 16%, a vrednost RSPVT ne sme prelaziti 20%. U proizvodima poreklom od mesa živine vrednost RSPVT ne sme prelaziti 15%.

Rezultati naših ispitivanja odabranih hemijskih parametara kvaliteta fermentisanih suvih kobasica smo prikazali tabelarno, kao i usaglašenost dobijenih vrednosti sa vrednostima predviđenim Pravilnikom.

Ispitivanjem deset različitih vrsta kobasica gore navedene grupe (ukupno 156 uzoraka) ustanovili smo da je 51 (32,7%) neusaglašen, pri čemu je najčešći razlog bio viši RSPVT (40 uzoraka – 25,6%, sa intervalom varijacije od 2,73% u jednom uzorku sudžuka do 35,36% u jednom uzorku čajne kobasice). Viši sadržaj vlage od dozvoljenog je utvrđen u osamnaest uzoraka (11,5%), a interval varijacije se kretao od 14,53% do 44,88%, u različitim uzorcima sudžuka. Sadržaj ukupnih proteina je u svim ispitivanim uzorcima bio u granicama propisanim Pravilnikom (interval varijacije od 16,51% do 41,02%).

U skladu sa Pravilnikom, fermentisane suve kobasice se proizvode prvenstveno od mesa prve i druge kategorije, više ili manje očišćenog od vezivnog tkiva, čiji RSPVT u mesu može biti, u zavisnosti od vrste, 15% ili 20%. Industrija prerade mesa pokušava da snizi cenu proizvoda od mesa koristeći niže kategorije goveđeg i svinjskog mesa (manje biološke i nutritivne vrednosti), sa višim sadržajem vezivnog tkiva. Kobasice koje sadrže više vezivnog tkiva imaju nižu biološku vrednost i niži senzorni kvalitet. Proteini vezivnog tkiva se značajno razlikuju po sadržaju i kompoziciji aminokiselina od mišićnog tkiva, naročito po nižem sadržaju esencijalnih amino kiselina.

Vuković i sar. (2011) su ispitivanjem osnovnih parametara kvaliteta tradicionalnog (domaćeg) kulena zaključili da je sadržaj vlage varirao od 36,3% do 37,7%, proteina mesa 25,5% do 28,7%, i udeo kolagena u proteinima mesa 6,4% do 8,6%. Rezultati ukazuju da kulen sadrži više od 35% vlage, a udeo kolagena u proteinima mesa ispod 10%. Viši sadržaj vlage bez sumnje ukazuje na to da proces sušenja nije završen, ali takođe može biti posledica nižeg sadržaja masti u odnosu na isti kod tradicionalno proizvedenog kulena. Prethodna ispitivanja su pokazala da je industrijski kulen sadržao manje vlage (<30%) u odnosu na isti proizveden na tradicionalan način (Vuković i sar., 2004).

Saičić i sar. (2006) su ispitali ukupno 36 fermentisanih suvih kobasica na sadržaj proteina i hidroksiprolina, poreklom od različitih proizvođača iz Republike Srbije. Sadržaj proteina mesa je bio na nivou od 17,52% do 32,96%, a RSPVT od 6,22% do 31,15%. Od ukupnog broja ispitanih uzoraka, u 6 njih (16,66%) je RSPVT u mesu bio viši nego što je propisano Pravilnikom. Rezultati naših ispitivanja su u skladu sa navedenim rezultatima.

Radović i sar. (1981) su ispitivanjem fermentisanih suvih kobasica utvrdili velike varijacije u RSPVT (od proteina mesa je bilo 14% do 16% proteina vezivnog tkiva). U našem ispitivanju, prosečna vrednost za RSPVT je varirala između proizvoda od 6,59% u domaćoj salami do 19,35% u uzorku pikant kobasice.

Jokanović i sar. (2010) su utvrdili da je sadržaj vlage u svim ispitivanim uzorcima tradicionalne fermentisane suve kobasice (Petrovská klobása) bio ispod 35%. Saičić i sar. (2010) su odredili osnovni hemijski sastav različitih fermentisanih suvih (čajna, sremska, kulen i salama): Vlaga (%) $28,16 \pm 0,57$; $28,17 \pm 0,59$; $27,58 \pm 0,49$; $34,73 \pm 0,56$ i sadržaj proteina (%) $22,58 \pm 0,44$; $22,04 \pm 0,36$; $24,14 \pm 0,45$; $22,20 \pm 0,89$. U našem istraživanju srednje vrednosti sadržaja vlage (%) u uzorcima čajne kobasice, kulena i salame su bile 27,114%, 32,050% i 28,907%, a sadržaj proteina (%) 23,771, 26,597 i 26,540. U našim ispitivanjima je utvrđen viši nivo sadržaja vlage od propisanog Pravilnikom (član 51) u 18 (11,5%) uzoraka od ukupnog broja ispitanih ($n=156$) fermentisanih suvih kobasica. Vuković i sar. (2009) su odredili parametre kvaliteta i hranljivu vrednost nekih funkcionalnih fermentisanih suvih kobasica, i komparacijom sa konvencionalno proizvedenim kobasicama iste grupe utvrdili da je ukupan sadržaj proteina bio 24% (g/100 g) u grupi funkcionalnih, a 20% u grupi konvencionalno proizvedenih kobasica.

Mandić i sar. (2010) su postavili kao cilj istraživanja praćenja kompleksne fizičke, hemijske, mikrobiološke i biohemijske promene tokom zrenja fermentisanih suvih kobasica. Ispitali su hemijski i mikrobiološki sastav nadeva neposredno nakon punjenja istog u omotače, nakon deset dana i na kraju zrenja (20 dana). Fizičko-hemijske analize proizvoda ukazuju na pad pH vrednosti (sa 6,2 na 5,3), smanjenje sadržaja vlage (sa 46,9% na 25,8%) i rast sadržaja masti (sa 34% na 48,9%), proteina (sa 13,2% na 20,4%) i soli (sa 2,8% na 4,8%), zahvaljujući procesu sušenja.

Kovačević i sar. (2010) su ispitali deset tipova fermentisanih suvih kobasica. Varijabilnost vrednosti pH, a_w i sadržaja vlage između različitih proizvoda je bila značajna ($p<0,05$). Vrednosti za nivo sadržaja masti, proteina, kolagena i soli pokazuju velike devijacije (koeficijent varijacije proizvoda za kolagen = 39,48). Ovi rezultati ukazuju na to da proizvođači koriste veoma različite recepture.

Naša istraživanja se moraju nastaviti i produbiti određivanjem vrste aditiva i njihovog sadržaja u proizvodima od mesa.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata ispitivanja možemo zaključiti da na reprezentativnom broju ispitanih uzoraka ($n = 156$), poreklom od 10 različitih proizvoda iz grupe fermentisanih suvih kobasica, 51 uzorak (32,7%) nije ispunjavao zahteve propisane Pravilnikom o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa. Od navedenog broja uzoraka, razlog neusaglašenosti za 40 uzoraka (25,6%) je bio viši nivo RSPVT, a kod 18 uzoraka (11,5%) viši sadržaj vlage. Niži sadržaj ukupnih proteina od onog propisanog Pravilnikom nije utvrđen ni u jednom od ukupnog broja ispitanih uzoraka.

Rezultati naših ispitivanja ukazuju na to da prerađivači koriste veoma različite recepture, u težnji da potrošačima obezbede jeftinije proizvode (pri čemu konzumenti često nisu upoznati sa činjenicom da su hranljive i biološke vrednosti proizvoda niže). Takođe, u cilju kontinuiranog prisustva na tržištu sa kompletnom paletom proizvoda, prerađivači skraćuju trajanje procesa zrenja (sušenja) kobasica, umanjujući kvalitet i održivost proizvoda.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je deo istraživanja iz projekta „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“, evidencioni broj projekta III 046009, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. /

The work is a part of research under the project „Promotion and development of hygiene and technological procedures in production of food items of animal origin aimed at obtaining quality and safe products competitive on the world market“, Project Number III 046009, which is financed by the Ministry for Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Acton JC, Dick RL. Composition of Some Commercial Dry Sausages. J Food Sci 1976; 41(4): 971-2.
2. Andres AI, Cava R, Ruiz J. Monitoring volatile compounds during dry-cured ham ripening by solid-phase microextraction coupled to a new direct-extraction device. J Chromatogr 2002; A 963: 83-8.
3. Ansorena D, Gimeno O, Astiasaran I, Bello J. Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. Food Res Int 2001; 34: 67-75.
4. Arnau J, Serra X, Comaposada J, Gou P, Garriga M. Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. Meat Sci 2007; 77: 81-9.
5. Casiraghi E, Pompei C, Dellaglio S, Parolari G, Virgili R. Quality attributes of Milano salami, an Italian dry-cured sausage. J Agric Food Chem 1996; 44: 1248-52.
6. Comi G, Urso R, Iacumin L, Rantsiou K, Cattaneo P, Cantoni C, Cocolin L. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. Meat Sci 2005; 69: 381-92.
7. Erkkilä S, Petäjä E, Eerola S, Lilleberg L, Mattila-Sandholm T, Suihko ML. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. Meat Sci 2001; 58: 111-6.

8. Flores J, Bermell S. Dry-cure sausages-factors influencing souring and their consequences. *Fleischwirtschaft* 1996; 76(2): 163-5.
9. Ikonić PM, Petrović LjS, Tasić TA, Dž NR, Jokanović MR, Tomović VM. Physicochemical, biochemical and sensory properties for the characterisation of *Petrovská klobása* (traditional fermented sausage). *Acta Periodica Technologica* 2010; 41: 19-31.
10. Incze K. Raw fermented and dried meat products. *Fleischwirtschaft* 1992; 72(1): 58-62.
11. Incze K. Dry fermented sausages. *Meat Sci* 1998; 49: 169-77.
12. Jokanović M, Petrović Lj, Ikonić P, Tomović V, Džinić N, Savatić S, Tasić T. Sensory properties of petrovská klobása (dry-fermented sausage) ripened in traditional and industrial conditions. *Journal on Processing and Energy in Agriculture* 2010; 14(3): 153-6.
13. Konieczny P, Biliska A, Uchman W. Rapid methods of assessing as a tolls for quality improvement and standarization of food products. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Food Science and Technology* 2006; 9: 3. <http://www.ejpau.media.pl/volume9/issue3/art-07.html>.
14. Kovačević D, Mastanjević K, Šubarić D, Jerković I, Marijanović Z. Physico-chemical, colour and textural properties of Croatian traditional dry sausage (Slavonian Kulen). *Meso* 2010; XII(5)..
15. Lorenzo JM, Michinel M, López M, Carballo J. Biochemical characteristics of two Spanish traditional dry-cured sausage varieties: Androlla and Botillo. *J Food Compos* 2000; Anal. 13: 809-17.
16. Lücke FK. *Fermented Sausages in Microbiology of Fermented Foods*, 2nd ed. vol. 2. (Wood, B.J.B., ed) 1998; 441-83. Blackie Academic & Professional, London.
17. Mandić S, Davidović A, Topalić-Trivunović Lj, Savić A, Stojković S, Vučić G. Chemical content changes and microbiological status of fermentated sausages during ripening. IX savjetovanje hemičara i tehnologa RS, Banja Luka, 12. i 13. novembar 2010.
18. MAPA. *Inventario Español de Productos Tradicionales*, Servicio de Publicaciones del MAPA, Madrid, 1997.
19. Mendoza E, Garcia ML, Casa C, Sigas MD. Inulin as Fat Substitute in Low Fat Dry Fermented Sausages. *Meat Sci* 2001; 57: 387-93.
20. Meso i proizvodi od mesa. Određivanje sadržaja azota (referentni metod). SRPS ISO 937:1992. 18.11.1992. Službeni glasnik, br. 33/92.
21. Meso i proizvodi od mesa. Određivanje sadržaja vlage (referentni metod). SRPS ISO 1442:1998. 02.12.1998. Official Gazette, no. 63/98.
22. Moretti VM, Madonia G, Diaferia C, Mentasti T, Paleari MA, Panzeri S, Pirone G, Gandini G. Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Sci* 2004; 66(4): 845-54.
23. Muguerza E, Gimeno O, Ansorena D, Astiasaran I. New Formulations for Healthier Dry Fermented Sausage: a review. *Trends in Food Sci and Technol* 2004; 15: 452-7.
24. Müller W-D. Funktionelle Fleischerzeugnisse - Rohwürste. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* 2006; 45(173): 185-91.
25. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za proizvode od mesa (Sl. Glasnik SCG, no. 33/2004).

26. Radović N, Mrđanov J, Jovanov M, Trajanoski M, Beara M, Sabljak-Uglješić Š, Vuksan B. Osnovni hemijski pokazatelji kvaliteta proizvoda od mesa. *Tehnologija mesa* 1981; 4: 109-11.
27. Saičić S, Vranić D, Pavlov N, Velebit B. Sadržaj proteina i proteina vezivnog tkiva u kobasicama. *Tehnologija mesa* 2006; 47(1-2): 77-80.
28. Saičić S, Trbović D, Vranić D, Janković S, Stefanović S, Petronijević R. Sadržaj masnih kiselina i holesterola u nekim proizvodima od mesa sa domaćeg tržišta. *Tehnologija mesa* 2010; 51(1): 52-9.
29. Salgado A, García Fontán MC, Franco I, López M, Carballo J. Effect of the type of manufacture (homemade or industrial) on the biochemical characteristics of Chorizo de cebolla (a Spanish traditional sausage). *Food Control* 2006; 17: 213-21.
30. Stamenković T, Dević B, Đurković A, Hromiš A, Janković D, Orlić Z. Sirovodimljene i sirovošušene kobasice (senzorna svojstva, hemijski pokazatelji i bakteriološka ispravnost). *Tehnologija Mesa* 1998; 2: 70-5.
31. Statsoft Inc. Statistica For Windows, Version 5.0, Computer program manual. Tulsa,: StatSoft Jnc., 1995.
32. Sveinsdóttir K, Martinsdóttir E, Green-Petersen D, Hyldig G, Schelvis R, Delahunty C. Sensory characteristics of different cod products related to consumer preferences and attitudes. *Food Quality and Preference* 2009; 20(2): 120-13.
33. Tojagić S. Potreba standardizacije sremske kobasice kao nacionalnog proizvoda. *Tehnologija Mesa* 1997; 6: 265-7.
34. Trbović D, Saičić S, Stefanović S, Janković S, Turubatović L, Vesković-Moračanin S. Fizičko-hemijska svojstva fermentisanih kobasica uskog dijametra. Zbornik kratkih sadržaja. Book of Abstracts. Međunarodno 55. savetovanje industrije mesa. Meso i proizvodi od mesa - bezbednost, kvalitet i nove tehnologije, Tara, 15-17. juni 2009.
35. Valous NA, Mendoza F, Sun W, Allen P. Colour calibration of a laboratory computer vision system for quality evaluation of pre-sliced hams. *Meat Sci* 2009; 81(1): 132-41.
36. Vandendriessche F. Meat products in the past, today and in the future. *Meat Sci* 2008; 78: 104-13.
37. Vasilev D, Tubić M, Saičić S, Nonković S, Milanović-Stevanović M, Vuković I. Važniji parametri kvaliteta fermentisanih polusuvih kobasica proizvedenih sa masnim tkivom i biljnim mastima. Međunarodno 54. savetovanje industrije mesa, Vrnjačka Banja, 18-20.06.2007. Zbornik kratkih sadržaja: 60-1.
38. Vuković I, Vasilev D, Saičić S, Bunčić O. Mikroflora i fizičko-hemijski pokazatelji kvaliteta kulena. *Tehnologija mesa* 2004; 45(3-4): 104-7.
39. Vuković KI. Osnove tehnologije mesa, Veterinarska komora Srbije, ISBN: 86-82301-62-8, Beograd, 2006.
40. Vuković I, Vasilev D, Vasiljević N. Fermentisane kobasice kao funkcionalna hrana. I Međunarodni kongres: Tehnologija, kvalitet i bezbednost hrane, Novi Sad, 13.-15. novembar, 2007, Zbornik radova: 119-23.
41. Vuković I, Saičić S, Vasilev D, Tubić M, Vasiljević N, Milanović-Stevanović M. Some quality parameters and nutritional value of functional fermented sausages. *Tehnologija mesa* 2009; 50(1-2): 68-74.
42. Vuković I, Saičić S, Vasilev D. Contribution to knowledge of major quality parameters of traditional (domestic) kulen. Plenary paper on International 56th Meat Industry Conference held from June 12-15th 2011 on Tara mountain.

ENGLISH

EXAMINATIONS OF CERTAIN CHEMICAL CHARACTERISTICS OF FERMENTED DRY SAUSAGE QUALITY PARAMETERS

Marija V. Vukašinić, V. S. Kurćubić, Vesna M. Kaljević, P. Z. Mašković, M. D. Petrović

On the grounds of data available from literature, we observed a high degree of variations in the values of numerous physical-chemical quality parameters of fermented sausages, so that we set as the objective of our investigations to carry out comprehensive examinations of selected chemical quality parameters (total protein content, relative protein content of connective tissue, and humidity in ten different products that belong to the group of fermented dry sausages). The other objective was to compare the values obtained in our investigations with the reference values envisaged under the Regulations on quality and other requirements for meat products (SCG Official Gazette, No. 33/2004) and to determine the percent of products that are found incompatible and the reasons for that. We used two standard reference chemical methods – the determination of nitrogen and moisture contents (SRPS ISO 937:1992 and SRPS ISO 1442:1998), as well as a modification of method M050 for the determination of hydroxyproline content.

We can conclude on the grounds of the results of our investigations that out of the representative number of examined samples ($n = 156$), originating from 10 different products from the group of fermented dry sausages, 51 samples (32.7%) did not meet the requirements prescribed under the Regulations on quality and other requirements for meat products. Among the rejected samples, the reason for the incompatibility of 40 samples (25.6%) was a higher level of RPCCT, and 18 samples (11.5%) had a higher moisture content than permitted. None of the total number of examined samples had a content of total proteins lower than the one prescribed under Regulations.

Key words: fermented dry sausage, total protein content, relative protein content in connective tissue (RPCCT), moisture content.

РУССКИЙ

**ИСПЫТАНИЯ ОПРЕДЕЛЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ СУХИХ КОЛБАС**

**Мария В. Вукашинович, В. С. Курчубич, Весна М. Калевич, П. З. Машкович,
М. Д. Петрович**

Согласно данным доступным из литературы замечена нами высокая степень вариаций стоимости многих физическо-химических показателей качества ферментированных колбас, да мы для цели нашего испытания поставили, что более всеохватное испытание отобранных химических параметров качества (содержание совокупных протеинов, релятивное содержание протеинов соединительной ткани и содержание влаги в десять различных продуктов, принадлежащие группе ферментированных сухих колбас). Вторая цель была, что стоимости, полученные в нашем испытании сравним с референтными стоимостями, предвиденной Инструкцией о

качестве и других требованиях для продуктов из мяса (Сл. Гласник СЦГ, но 33/2004) и определим процентную представленность и причины для несогласования продуктов, ставимые вне оборота. Нами использовано два стандартных, референтных химических метода - определение содержания азота и влаги (СРПС МОС 9375:1992 и СРПС МОС 1442:1998), словно и модифицированный метод M050 для определения содержания гидроксипролина.

На основе результатов испытания можем сделать вывод, что на репрезентативном числе испытанных образчиков ($n=156$), с происхождением из 10 различных продуктов из группы ферментированных сухих колбас, пятьдесят один образчик (32.7%) не исполнял требования, предписанные Инструкцией о качестве и других требованиях для продуктов из мяса. От приведённого числа образчиков, причина несогласования для сорока образчиков (25.6%) была большой уровень РСПСТ, а у восемнадцати образчиков (11.5%) более большое содержание влаги. Более низкое содержание совокупных протеинов того, предписанного Инструкцией не утверждён ни в одном из совокупного числа испытанных образчиков.

Ключевые слова: ферментированные сухие колбасы, содержание совокупных протеинов, релятивное содержание протеинов соединительной ткани (РСПСТ), содержание влаги

**ZLATARSKI SIR – KARAKTERISTIKE TRADICIONALNE
PROIZVODNJE I PRIKAZ NEKIH PARAMETARA KVALITETA***
*ZLATAR CHEESE – CHARACTERISTICS OF TRADITIONAL
PRODUCTION AND OVERVIEW OF SOME QUALITY PARAMETERS*

Slavica Vesković Moračanin, M. Rašeta, Dragica Karan, Dejana Trbović,
L. Turubatović, M. Šaponjić, Marija Škrinjar**

Paralelno sa industrijalizacijom i standardizacijom savremene proizvodnje, proizvodnja sireva bazirana na tradicionalnim principima predstavlja značajno obeležje jednog naroda, država i regija. Svest o osobenostima ovakve proizvodnje potpomognuta je rastućom potražnjom organske i visokokvalitetne hrane sa oznakama geografskog porekla, čija se konkurentnost i cena, u poređenju sa konvencionalnim proizvodima, značajno, iz dana u dan, povećava. Na brdsko-planinskom području Republike Srbije, u okolini Nove Varoši, u podnožju i na obroncima planine Zlatar, u seoskim domaćinstvima, proizvode se sirevi u salamuri po dugogodišnjoj autohtonoj tehnologiji. Poznati su po prepoznatljivom i ustaljenom kvalitetu, izraženim ukusom i specifičnom proizvodnjom.

U ovom radu predstavljen je deo predviđenih istraživanja po Projektu III 46009 (potprojekat 7) koja imaju za cilj da daju odgovore o biodiverzitetu autohtone mikroflore poreklom iz zlatarskog sira, odrede njihova najvažnija tehnološka i protektivna svojstva, kao i da daju odgovore o mogućnostima primene nekog od izolovanog soja BMK tokom novog proizvodnog ciklusa. Najveći deo navedenih istraživanja je u toku. U ovom radu dat je kratak pregled tradicionalne proizvodnje zlatarskog sira nastalog kao rezultat snimanja procesa proizvodnje i anketiranja individualnih proizvođača u okolini Nove Varoši, u selima

* Rad primljen za štampu 28. 07. 2011. godine

** Dr Slavica Vesković Moračanin, specijalista higijene namirnica, viši naučni saradnik, Mladen Rašeta, istraživač-saradnik, mr Dragica Karan, istraživač-saradnik, mr Dejana Trbović, istraživač-saradnik, dr Lazar Turubatović, naučni savetnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd; Milinko Šaponjić, predstavnik Lokalne kancelarije za ekonomski razvoj SO Nova Varoš, Skupština opštine Nova Varoš; dr Marija Škrinjar, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad

Akmačići, Božetići, Jasenovo, Bukovik, Komarani. Takođe, dat je i prikaz najvažnijih hemijskih parametara kvaliteta.

Ključne reči: zlatarski sir, autohtona proizvodnja, tehnologija izrade, parametri kvaliteta

Uvod / Introduction

Sir je jedan od najstarijih prehrambenih proizvoda. Umetnost izrade sira počela se razvijati još pre 8000 godina u dolinama reka Tigra i Eufrata, u današnjem Iraku, što se poklapalo sa početkom domestikacije životinja i biljaka (Fox, 1993). Istorijski posmatrano, nastanak sireva bio je rezultat slučajnih okolnosti u postupcima manipulacije sa mlekom. Ujedno, bio je to jedan od prvih vidova konzervisanja hrane i njenog čuvanja za duži vremenski period. Industrijska proizvodnja sireva započeta je u drugoj polovini XIX veka u SAD, a kasnije i u Evropi (Engleska). Sticanjem iskustva, a prvenstveno znanja, u oblasti biohemije i higijene (mikrobiologije) mleka i sireva, postavljeni su elementi kontrole postupaka proizvodnje. Napredak u tehnologiji sireva ostvaren je uvođenjem industrijskog sirila, termičkih tretmana (postupci pasterizacije) i starter kultura u procese proizvodnje. Intenzivan razvoj proizvodnje sira ostvaren je u drugoj polovini XX veka, kada poprima obeležja moderne i automatizovane industrijske proizvodnje (Ostojić, 2010).

Paralelno sa industrijalizacijom i standardizacijom proizvodnje, značajno mesto zauzima proizvodnja sireva bazirana na tradicionalnim principima. Svest o osobenostima ovakve proizvodnje potpomognuta je rastućom potražnjom organske i visokokvalitetne hrane sa oznakama geografskog porekla, čija se konkurentnost i cena, u poređenju sa konvencionalnim proizvodima, značajno, iz dana u dan, povećava. Danas, autohtoni sirevi predstavljaju obeležje jednog naroda, država i regija. Takođe, zaštitom tradicionalne proizvodnje autohtonih sireva podstiče se razvoj stočarstva s jedne strane, kao i oživljavanje datog, najčešće, brdsko-planinskog područja.

Tradicionalna proizvodnja sireva ne znači nikako vraćanje na prošla vremena, već nastojanje da se autohtona tehnologija sačuva, da dobije svoj organizovani oblik, da se etnografsko bogatstvo jednog podneblja učini prepoznatljivim, a time da se da pečat razvoja jednog naroda.

Na brdsko-planinskom području Republike Srbije (Zlata, Zlatibor, Golija, Kopaonik, Stara planina, Šar-planina i dr.) u seoskim domaćinstvima, proizvode se sirevi u salamuri po dugogodišnjoj specifičnoj autohtonoj tehnologiji. Zahvaljujući geografskoj, klimatskoj i vegetacijskoj raznolikosti autohtoni sirevi su nadaleko poznati i prepoznatljivi po ustaljenom kvalitetu i izraženim senzornim svojstvima. Proizvode se, uglavnom, od sirovog mleka, najčešće kravljeg, a u manjoj meri od mešanog kravljeg i ovčijeg, faza zrenja im je kraća, a sam tehnološki postupak izrade je jednostavan. Prema nekim istraživanjima (Ostojić i

Topisirović, 2006), u poslednje vreme oživela je upotreba kozijeg mleka u izradi autohtonih sireva.

Jedan od najznačajnijih predstavnika autohtonih belih sireva u salamuri je zlatarski sir. Proizvodi se od nekuvanog punomasnog kravljeg mleka u okolini Nove Varoši, u podnožju i na obroncima planine Zlatar. Proizvodnja sira se odvija u seoskim domaćinstvima, kako za svoje sopstvene potrebe, tako i u registrovanim poljoprivrednim domaćinstvima, u objektima koji ispunjavaju propisane veterinarsko-sanitarne uslove, čija je proizvodnja namenjena plasmanu na domaće i inostrano tržište. Takođe, tokom letnjeg uzgoja stoke na planini, proizvodnja se može odvijati i na planinskim pašnjacima – letnjim kolibama (katuni, bačije). Ovaj način prerade mleka je ranije bio mnogo više zastupljen. Međutim, danas, usled smanjenja stočnog fonda, nedostatka radne snage, starenja radno-aktivnog stanovništva, kao i odliva mladog u gradske sredine, proizvodnja sira je značajno smanjena (Dozet i sar. 2004; Maćej i sar. 2006; 2007).

Karakteristike ovoga sira, za koji se zna i u našoj zemlji i u svetu, međutim, ne zavise samo od proizvođača i njihove umešnosti. Autentičnost sireva zlatarskog podneblja, u odnosu na ostale sireve istog tipa, ali i drugih regija, bazirana je na osobenosti autohtone mikroflore, prvenstveno bakterija mlečne kiseline (BMK), koje su nosioci mlečne fermentacije i procesa zrenja sireva. Pored osobenosti, važan element je i raznolikost mikroflore koja se ogleda u zastupljenosti velikog broja različitih vrsta BMK, ali i sojeva u okviru jedne vrste, koji kao rezultat svoje metaboličke aktivnosti dovode do nastanka proizvoda specifičnog ukusa. Dominantnost određene vrste BMK direktno zavisi od vrste mleka, porekla životinje, načina ishrane i dr. Zbog svega toga, autohtone BMK predstavljaju značajan potencijal u oblasti selekcije tehnološki i protektivno značajnih vrsta ili sojeva koji primenjeni u domaćoj proizvodnji mogu dovesti do nastanka zdravstveno bezbednog i proizvoda ujednačenog, standardizovanog kvaliteta (Radulović, 2008; Mijačević i Bulajić, 2007; Vesković, 2010; Barros i sar., 2008). Takođe, njihova mikrobiološka i molekularno-genetska izučavanja daju osnovu za selekciju specifičnih sojeva karakterističnih za određene regione. Naši istraživači (Ostojić i Topisirović, 2008), navode da proizvodnja sopstvenih (domaćih) starter kultura sastavljenih od dobro izučenih prirodnih izolata BMK daje osnovu za dobijanje proizvoda sa deklaracijom specifičnog geografskog porekla.

U ovom radu dat je kratak pregled tradicionalnog procesa proizvodnje zlatarskog sira nastalog kao rezultat snimanja procesa proizvodnje i anketiranja individualnih proizvođača u okolini Nove Varoši, u selima Akmačići, Božetići, Jasenovo, Bukovik i Komarani. Paralelno sa tim, dati su i najvažniji hemijski parametri kvaliteta zlatarskog sira uz opis i ocenu njihovih senzorskih svojstava. Navedena ispitivanja biće deo studije koja je usmerena ka nastojanju da se zlatarski sir zaštiti oznakom geografskog porekla zbog, pre svega, prepoznatljivog kvaliteta koji je uslovljen višedecenijskom tradicijom i iskustvom u proizvodnji, i koji se, kao takav, prenosio sa generacije na generaciju.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Snimanje autohtone tehnologije zlatarskog sira vršeno je metodom anketiranja individualnih proizvođača tokom prolećnih meseci 2011. godine u selima u okolini Nove Varoši. Odabrane su sledeće lokacije: Akmačići, Božetići, Jasenovo, Bukovik, Komarani. Svaki od anketiranih proizvođača (njih 6) imao je uslovan i registrovan objekat za proizvodnju sira, i u novovaroškom kraju je važio za dobrog domaćina i prepoznatljivog proizvođača zlatarskog sira. Za laboratorijska ispitivanja uzimani su uzorci zrelog zlatarskog sira, koji je spreman za konzum, a navedena ispitivanja su obavljena u tri ponavljanja.

U cilju utvrđivanja osnovnih hemijskih parametara kvaliteta vršene su sledeće analize:

1. određivanje sadržaja vode u siru,
2. određivanje sadržaja suve materije,
3. određivanje sadržaja vode u bezmasnoj materiji sira,
4. određivanje sadržaja masti,
5. određivanje sadržaja mlečne masti u suvoj materiji i
6. određivanje kiselosti sira.

Navedene analize obaljene su prema akreditovanim metodama ispitivanja propisanim u „Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i metodama hemijskih i fizičkih analiza mleka i proizvoda od mleka“ (Sl. list SFRJ br.32/83). Dobijeni rezultat procenjeni su u skladu sa važećim pravilnikom u oblasti kvaliteta proizvoda od mleka (Sl. glasnik RS, br. 33/10, izmene i dopune Sl. glasnik RS br. 69/10).

Senzorski kvalitet zlatarskog sira određen je kvantitativno-diskriptivnom metodom (Baltić, 1992; Radovanović i Popov-Raljić, 2001). Senzorske osobine (spoljašnji izgled, boja, izgled preseka, konzistencija, miris i ukus) ocenjene su bodovima od 5 do 1 (5 – izuzetno prihvatljivo, 4 – vrlo prihvatljivo, 3 – prihvatljivo, 2 – na granici prihvatljivosti, 1 - neprihvatljivo).

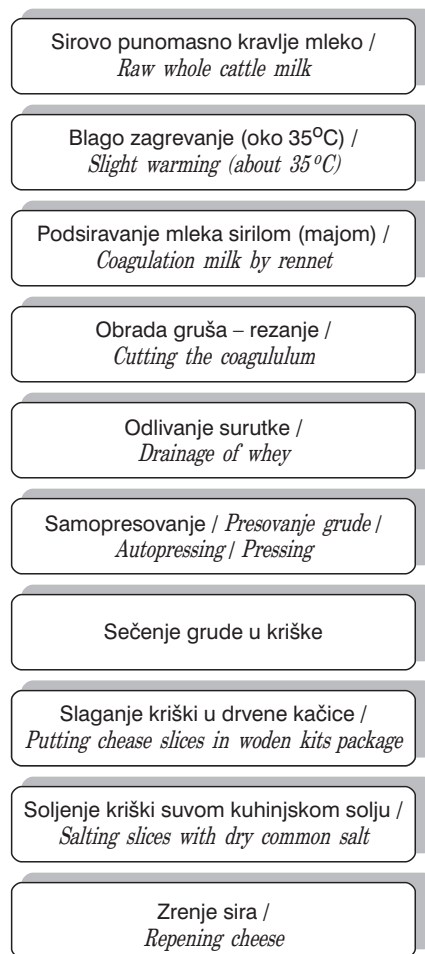
Grupa od šest ocenjivača činila je panel za ocenu senzorskih svojstava. Ocenjivačima su prethodno testirana čula pomoću testa za utvrđivanje osećaja ukusa (Baltić, 1992, SRPS ISO 3972/2002) i testa za obuku ocenjivača u otkrivanju i prepoznavanju mirisa (Baltić, 1992, SRPS ISO 5496/2002).

Rezultati i diskusija / *Results and Discussion*

Karakteristike autohtone proizvodnje zlatarskog sira / Characteristics of autochthonous production of Zlatar cheese

Analiza ankete, koja je sprovedena u cilju prikupljanja validnih podataka o načinu autohtone proizvodnje zlatarskog sira, pokazala je da se za izradu ovog sira koristi punomasno kravlje mleko koje nije pretrpelo termičku obradu. Mleko potiče isključivo sa područja planine Zlatar. Utvrđeno je, takođe, da neki od

proizvođača proizvode sir po istoj autohtonoj tehnologiji, ali od mešanog kravljeg ili ovčijeg mleka. Neki od proizvođača koriste i kozje mleko. Ovakvi sirevi na tržištu nazivaju se „sirevi u tipu zlatarskog sira“. Osnovni principi tehnološkog postupka tradicionalne proizvodnje autohtonog zlatarskog sira predstavljeni su na shemi 1.



Shema 1. Autohtona tehnologija proizvodnje zlatarskog sira /
Diagram 1. Indigenous Zlatar cheese production technology

U letnjem periodu krave se nalaze, uglavnom, na ispaši. Muzu se tri puta dnevno, za razliku od zimskog perioda kada su u stajama i kada se muzu dva puta dnevno. U oba slučaja hrana koja se koristi potiče iz navednog okruženja. Odmah nakon muže, sirovo mleko se posle grubog ceđenja kroz gaze, meša sa blago zagrejanim večernjim mlekom (oko 35°C) i podsirava. Za podsiravanje

uvek se dodaje sirilo (maja), proizvedeno od sirišta preživara, najčešće teladi, i to u količini od jedne supene kašike na deset litara mleka. Stvaranje gruš, tj. koagulacija mleka traje oko 2 sata. Radi boljeg odvajanja surutke, gruš se reže na veće ili manje kocke, veličine, najčešće 10 x 10 cm. Nakon toga, formirani gruš se prebacuje u platnene gaze (grudnjače) i kači na odgovarajuće drvene kuke da bi se postiglo neophodno samopresovanja gruš. Neki proizvođači efekat ceđenja i samopresovanja postižu postavljanjem gruš u cedilu na specijane stolove (grudara). Ova faza traje najviše 1 sat. U sledećoj fazi presovanja grudnjača sa grušem se prebacuje na ravnu površinu, gruda se preslaže, krajevi grudnjače se unakrsno postavljaju tako da ne ostave veliko udubljenje u centru grude, postavlja se drvena ploča (krug), koja se optereti kamenom. Ova faza traje oko 1,5 do 3 sata. Ispresovana gruda debljine do 2 cm se reže na pravilne kriške u obliku kvadrata, veličine oko desetak centimetara i slaže, po mogućstvu, u drvene kačice (slika 1a i 1b). Međutim, kako ovaj vid ambalaže poskupljuje gotov proizvod, većina proizvođača sir slaže u plastične kantice od 5 i 10 kg. Prilikom slaganja sira, svaki sloj se obavezno soli, kao i dno same posude. Ponekad se, pri novom slaganju kriški sira, stara surutka odliva a nova doliva. Proizvođači zlatarskog sira količinu upotrebljene soli određuju dugogodišnjim stečenim iskustvom (jedna zatvorena šaka soli na kilogram sira). Posle svake složene partije, ili kada se kačica napuni, sir se optereti kamenom. Proces zrenja autohtonog zlatarskog sira traje oko 20–60 dana, u zavisnosti od doba godine (leto ili zima), tj. od spoljne temperature u kojoj sir dozreva. Danas, uglavnom, kod registrovanih proizvođača proizvodnja sira se obavlja u posebnim objektima koji su konstruisani tako (zidovi do 1 m debljine, kao i ugrađeni klimatizovani sistemi) da obezbeđuju temperaturu oko 10^o–12^oC, pa je i vreme dozrevanja sira ujednačenije (oko 30–40 dana).



Slika 1a) i 1b). Zlatarski sir u drvenim kačicama i sir spreman za potrošača /
Figure 1a) and 1b). Zlatar cheese in Wooden kits and cheese ready for the consumer

U toku procesa zrenja sir se neguje na način koji podrazumeva da se površina sira čisti, da se kontroliše i povremeno menja salamura ukoliko postoji

potreba za tim, da se čisti površina drvenog kruga tj. poklopca i sl. Prilikom proizvodnje sira u letnjim mesecima treba biti mnogo oprezniji i savesniji. Međutim, niske temperature u proizvodnim objektima obezbeđuju dobro vođenje procesa zrenja, pri čemu su i tehnološke greške manje, a time i štete (Mačej i sar., 2006; Ostojić i sar., 2010).

Navedeni elementi proizvodnje zlatarskog sira u skladu su sa ranijim definisanim uslovima koji su neki od naših autora objavili (Jovanović i sar., 2005; Mačej i sar., 2006; Vučić i sar., 2008).

Hemijski sastav zlatarskog sira / Chemical composition of Zlatar cheese

Hemijski sastav zlatarskog sira prikazan je u tabeli 1. Dobijeni rezultati ispitivanja pokazuju izvesna odstupanja u zavisnosti od ispitivanog uzorka. Međutim, ovakav nalaz predstavlja očekivanu situaciju, s obzirom na to da su uzorci uzeti iz različitih domaćinstava koja u toku procesa proizvodnje koriste različitu sirovinu (sirovo mleko različitog kvaliteta), dok je sama tehnologija zasnovana na približno sličnim principima, ali opet u nekoj od svojih faza proizvodnje ispoljava svoje osobenosti.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja hemijskog sastava zlatarskog sira /
Table 1. Results of the chemical composition of Zlatar cheese

Hemijski parametri kvaliteta / Chemical quality parameters	Utvrđene vrednosti / The determined values		
	X _{min.}	X _{max.}	X _{sr.} ± SD
Sadržaj vode, % / Water content, %	53,04	58,01	55,54 ± 2,73
Sadržaj suve materije, % / Dry matter content, %	41,99	46,95	44,46 ± 2,49
Sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira, % / Water content of cheese fat-free matter, %	72,88	73,68	73,31 ± 0,38
Sadržaj masti, % / Fat content, %	20,50	28,00	24,25 ± 3,75
Sadržaj mlečne masti u suvoj materiji, % / Milk fat content in dry matter, %	48,74	59,64	54,24 ± 5,90
Kiselost sira, °SH / Acidity of cheese, °SH	74,30	94,30	84,30 ± 9,73

SD – standardna devijacija / SD - standard deviation

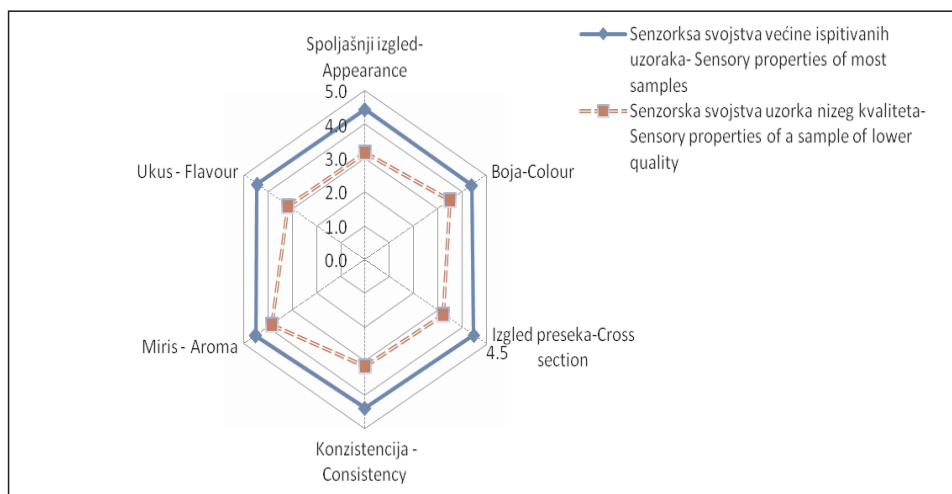
Na osnovu utvrđenih vrednosti sadržaja vode u bezmasnoj materiji sira (73,31 ± 0,38), kao i na osnovu konzistencije i izgleda, svi ispitivani uzorci zlatarskog sira pripadaju kategoriji mekih sireva (Pravilnik, 2010 god.) Na osnovu udela mlečne masti u suvoj materiji sira, koja je iznosila 54,24 ± 5,90 %, zlatarski sir spada u kategoriju punomasnog sira (granične vrednosti propisane Pravil-

nikom su $\geq 47\%$). Dobijeni rezultati poklapaju se sa rezultatima ispitivanja nekih naših istraživača (Puđa i sar., 1994; Vučić i sar., 2008; Dozet i sar., 2004). Najveće variranje ($SD = 9,73$) u pogledu hemijskih parametara kvaliteta, utvrđeno je kod ispitivanja titracione kislosti, čije su se vrednosti kretale od $74,30^\circ$ do $94,73^\circ SH$.

Senzorska svojstva zlatarskog sira / Sensory characteristics of Zlatar cheese

Rezultati ispitivanja senzorskih svojstava zlatarskog sira predstavljeni su na slici 2. Većina uzoraka zlatarskog sira (njih 5) imala je veoma poželjna senzorska svojstva, pa su i ocene za ukupan senzorski kvalitet iznosile od 4,2 do 4,8. Kriške sira bile su bele do beložučkaste boje, pravilnog oblika i ujednačene debljine, oko 1,5 cm. Miris je bio prijatan, izražen, mlečno kiseo, svojstven za ovu vrstu sira. Na presecima, sirno testo je bilo zbijeno, monolitno, porcelanskog izgleda sa malim brojem pravilno raspoređenih sitnih šupljina. Ukus, kao jedno od najvažnijih senzorskih svojstava, ocenjen je ocenama od 4,0 do 4,9, što je bilo približno utvrđenim ocenama za ukupan senzorski kvalitet. Ukus je bio pun, karakterističan mlečno-kiseo i umereno slan.

Kod jednog uzorka zlatarskog sira ispitivana senzorska svojstva su ocenjena nešto nižim ocenama. Ukupan senzorski kvalitet je iznosio 3,4. Ispitivani sir je imao mekšu konzistenciju nego što je uobičajeno, struktura je bila mrvičasta, a same kriške nisu imale pravilan oblik već su bile sa manjim ili većim deformacijama. Presek sirnog testa sadržavao je nešto više šupljina i nije imao karakterističan poželjan sjaj. Ovaj uzorak sira je za senzorsko svojstvo mirisa dobio najveću ocenu (3,8), dok su ostala svojstva bila ocenjena u granicama od 3,2 do 3,5.



Slika 2. Senzorska ocena uzoraka zlatarskog sira /
Figure 2. The sensory evaluation of Zlatar cheese samples

Zaključak / Conclusion

Specifičnost podneblja, odnosno nadmorska visina, klima, vrsta tla, položaj, karakteristična biljna vegetacija zlatarskog kraja, način držanja i rasa životinja objedinili su svoj uticaj na mleko a time, direktno, i na kvalitet zlatarskog sira. Naime, upotreba sirovog mleka, procesi fermentacije zasnovani isključivo na aktivnostima prirodno prisutne (autohtone) mikroflore, prirodni uslovi zrenja i ručna izrada predstavljaju osnovne elemente specifičnosti zlatarskog sira. S obzirom na to da zlatarski sir ima svojstven kvalitet i senzorska svojstva, koja ga čine osobenim od ostalih varijeteta belog sira u salamuri koji se proizvode na području Republike Srbije, on može i mora da bude obeležen imenom porekla.

Razlike utvrđene tokom ovih ispitivanja, u pogledu hemijskog sastava, kao i variranje u njegovim senzorskim svojstvima, rezultat su različitih uslova proizvodnje i navika individualnih proizvođača. Međutim, ukoliko se proizvodnja zlatarskog sira bude obavljala u registrovanim domaćinstvima po autohtonoj, ali uniformnoj, tehnologiji, a zrenje i čuvanje bude, isključivo, u drvenoj ambalaži (kačicama) postojeće razlike će biti minimalne, a gotov proizvod će biti uvek ustaljenog kvaliteta.

Dobijeni rezultati istraživanja predstavljaju doprinos nastojanjima da se autohtoni zlatarski sir zaštiti, kao i da se potpomogne jačanje svesti o nužnostima ovakvih aktivnosti.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rezultati rada su deo naučno-istraživačkog projekta u oblasti integralnih i interdisciplinarnih istraživanja (evidencioni broj Projekta 46009) koji je finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

The results presented in this paper are part of a scientific-research project in the area of integral and interdisciplinary investigations (Project Number 46009) which is financed by the Ministry for Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Baltić M. Kontrola namirnica. Izd. Beograd: Institut za higijenu i tehnologiju mesa, 1992.
2. Barros JJC, Azevedo AC, Rossi DA, Moura CJ, Penna ALB. Biochemical and sensorial changes in Parmesan cheese manufactured with autochthonous starters of *Lactobacillus helveticus*. 5th IDF Symposium on cheese ripening. Abstract book, Bern, Switzerland, 9-13 March 2008: 146.
3. Dozet N, Maćej O, Jovanović S. Autohtoni mliječni proizvodi osnova za razvoj specifičnih originalnih mliječnih prerađevina u savremenim uslovima. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2004; (3-4): 31-48.
4. Fox PF. Cheese: an overview. In: Fox PF, editor. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Chapman & Hall, London, England, 1993: 1-36.
5. Jovanović S, Maćej O, Vučić T, Seratlić S. Karakteristike autohtone proizvodnje zlatarskog sira. Zbornik radova simpozijuma „Mleko i proizvodi od mleka“, Tara, Srbija, 21-25 maj 2005: 84-6.

6. Mačej O, Dozet N, Jovanović S. Karakteristike autohtone proizvodnje sjeničkog, homoljskog, zlatarskog i svrljiškog sira. Poglavlje u monografiji „Autohtono beli sirevi u salamuri“. Urednici: Dozet N i Mačej O. Beograd-Zemun, 2006: 33-63.
7. Mačej O, Jovanović S, Seratlić S, Vučić T. Tehnološki postupak proizvodnje autohtonog zlatarskog sira. Zbornik radova simpozijuma „Mleko i proizvodi od mleka“, Kladovo, Srbija, 2007: 83-8.
8. Mijačević Z, Bulajić S. Prirodna mikroflora tradicionalnih sireva. Prehrambena industrija – mleko i mlečni proizvodi 2007; 18(1-2): 43-6.
9. Ostojić M, Topisirović Lj. Geografska oznaka porekla autohtonih sireva. Ekonomika poljoprivrede 2006; 53(3): 591-604.
10. Ostojić M, Topisirović Lj. Značaj autohtonih sojeva bakterija mlečne kiseline u zaštiti geografskih oznaka mlečnih proizvoda. Prehrambena industrija – mleko i mlečni proizvodi 2008; 19(1-2): 12-7.
11. Ostojić M, Topisirović T, Relić R, Jež G. Autohtona tehnologija proizvodnje Golijškog sira. Prehrambena industrija – mleko i mlečni proizvodi 2010; 21(1-2): 46-51.
12. Puđa P, Bjelanović M, Mačej O, Mikuljanac A. Proučavanje tehnologije autohtonog zlatarskog sira. Zbornik X jubilarnog savetovanja, Aditivi u tehnologiji mleka, Novi Sad, Srbija, 1994.
13. Radovanović R, Popov-Raljić J. Senzorska analiza prehrambenih proizvoda, Izd. Poljoprivredni fakultet, Beograd i Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2000-2001.
14. Radulović Z, Petrović T, Paunović D, Mirković N, Obradović D. Karakterizacija autohtonog soja *Lactobacillus paracasei* 08 na potencijalne probiotske sposobnosti. Prehrambena industrija 2008; (1-2): 23-7.
15. Sl. glasnik RS br. 69/10 Pravilnik o izmenama i dopunama pravilnika o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura, 2010.
16. Sl. list SFRJ br.32/83. Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama hemijskih i fizičkih analiza mleka i proizvoda od mleka, 1983.
17. Službeni glasnik RS br.33/10 Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura, 2010.
18. SRPS ISO 3972. Senzorske analize. Metoda utvrđivanja osećaja ukusa, 2002.
19. SRPS ISO 5496. Senzorske analize. Iniciranje i obuka ocenjivača u otkrivanju i prepoznavanju mirisa, 2002.
20. Vesković Moračanin S. Bakteriocini bakterija mlečne kiseline (BMK) - mogućnosti primene u industriji mesa. Tehnologija mesa 2010; 52(1): 83-94.
21. Vučić T, Mačej O, Jovanović S, Niketić G. Zlatarski sir – autohtona tehnologija i senzorske karakteristike. Prehrambena industrija – mleko i mlečni proizvodi 2008; 19(1-2): 97-101.

ENGLISH

ZLATAR CHEESE – CHARACTERISTICS OF TRADITIONAL PRODUCTION AND OVERVIEW OF SOME QUALITY PARAMETERS

Slavica Vesković Moračanin, M. Rašeta, Dragica Karan, Dejana Trbović,
L. Turubatović, M. Šaponjić, Marija Škrinjar

In parallel with the industrialization and standardization of contemporary production, cheese production based on traditional principles represents an important attrib-

ute of a nation, state or region. Awareness of the specificities of these production characteristics is supported by the growing demand for organic and high quality food with geographic labels of origin, whose competitiveness and price daily increase in comparison with conventional products. In the mountainous territory of the Republic of Serbia, in the region of Nova Varos, on the foothills and slopes of Mount Zlatar, rural households produce cheeses in brine in keeping with autochthonous traditional technology. These cheeses are recognized for their constant quality, remarkable flavour, and unique manner of production.

This paper introduces a part of the planned research within Project III 46 009 (subproject 7), which aim to provide answers about the biodiversity of indigenous microflora originating from Zlatar cheese, to determine their most important technological and protective properties, and to provide answers about the possibilities of implementing some of the isolated LAB strains in a new production cycle. Most of the above research is ongoing. This paper summarizes the traditional production of Zlatar cheese based on the monitoring of the production process and interviewes with individual producers in the area around Nova Varos, in the villages Akmačići, Božetići, Jasenovo, Bukovik, Komarani. Also, there is a review of the most important chemical parameters of quality.

Key words: Zlatar cheese, autochthonous production, production technology, quality parameters

РУССКИЙ

ЗЛАТАРСКИЙ СЫР - ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРАДИЦИОННОГО ПРОИЗВОДСТВА И ПОКАЗ НЕКОТОРЫХ ПАРАМЕТРОВ КАЧЕСТВА

Славица Вескович Морачанин, М. Рашета, Дргица Каран, Деяна Трбович, Л. Турубатович, М. Шапонич, Мария Шкриняр

Параллельно с индустриализацией и стандартизацией современного производства, производство сыров базировано на традиционных принципах представляет собой значительный признак одного народа, государств и регионов. Со знание о своеобразиях такого производства помогло растущим спросом органического и высококачественного корма с обозначениями географического происхождения, чья конкурентность и цена, в сравнении с конвенциональными продуктами, значительно, изо дня в день, увеличивается. На холмисто-горном районе Республики Сербии, в окрестности Нова Варош, в подножии и на скатах горы Златар, в деревенских домашних хозяйствах, производятся сыр в рассоле по многолетней автохтонной технологии. Известны по узнавательному и установившему качеству, выраженным вкусом и специфическим производством.

В этой работе представлена часть предвиденных исследований по Проекту III 46009 (подпроект 7), имеющие для цели дать ответы о биоразнообразии автотонной микрофлоры с происхождением из златарского сыра, определить их вжнейшие технологические и протективные свойства, словно и дать ответы о возможностях применения некоторого из изолированного штамма БМК в течение нового производительного цикла. Самая большая часть приведённых исследований в течение. В этой работе дан краткий обзор традиционного производства златарского сыра возникшего в результате снятия процесса производства и анкетировании индивидуальных производителей в окрестности Нова Варош, в деревнях

Акмачичи, Божетичи, Ясеново, Буковик, Комарани. Также, дан и показ важнейших химических параметров качества.

Ключевые слова: златарский сыр, автохтонное производство, технология
изготовки, параметры качества

**PROCENA ENERGETSKOG STATUSA KRAVA NA OSNOVU
KONCENTRACIJE MASTI, PROTEINA I UREE U MLEKU***
*ASSESSMENT OF DAIRY COW ENERGY STATUS USING MILK FAT,
PROTEIN AND UREA CONCENTRATIONS*

Danijela Kirovski, H. Šamanc, R. Prodanović**

Jedan od načina procene energetskog statusa krava u laktaciji je na osnovu rezultata dobijenih određivanjem koncentracije organskih sastojaka mleka. Prednosti ove metode su u tome što je uzimanje uzorka mleka nestresogeno za kravu i što se mogu koristiti rezultati ispitivanja mleka koje u okviru redovne kontrole vrše mlekare. Za ova ispitivanja se može koristiti zbirni uzorak mleka od svih ili pojedinih krava ili pojedinačni uzorak mleka. Na farmama na kojima postoji neujednačenost genetskog potencijala stada, prednost ima procena energetskog statusa analizom rezultata iz pojedinačnih uzoraka jer se na taj način individualno procenjuje svaka životinja. Dodatna upotreba pojedinačnih uzoraka mleka se preporučuje na novoformiranim farmama radi uspostavljanja referentnih vrednosti za stada.

Za procenu energetskog statusa krava u uzorcima mleka koriste se koncentracija masti, proteina i uree, kao i njihov međusobni odnos.

Koncentracije masti i proteina u mleku krava variraju zavisno od rase, ishrane, starosti, faze laktacije i godišnjeg doba. Sadržaj masti u mleku niži od fizioloških vrednosti očekuje se u slučajevima nepovoljne ishrane krava u periodu oko telenja ili acidoze buraga, a viši kod ketoznog stanja. Viši sadržaj proteina u mleku očekuje se kod visokoproteinske, a niži kod niskoproteinske ishrane.

Fiziološka koncentracija uree u mleku krava zavisi od nutritivnih faktora, sezone, starosti krava, stadijuma laktacije i telesne mase. Tako, starije krave, krave u odmakloj laktaciji i krave u letnjem periodu, imaju tendenciju ka povećanim vrednostima koncentracije uree u mleku. Od nutritivnih faktora najznačajniji je odnos energije i belančevina u obroku krava. Ukoliko je sadržaj proteina u mleku optimalan ili iznad pre-

* Rad primljen za štampu 19. 10. 2011. godine

** Dr sci. med. vet. Danijela Kirovski, profesor; dr sci. med. vet. Horea Šamanc, profesor, dr sci. med. vet. Radiša Prodanović, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Srbija

poručenih vrednosti, ali snabdevenost energijom niža, koncentracija uree raste iznad opsega fizioloških vrednosti. Ako je obrok deficitaran i u proteinima i energiji sadržaj uree u mleku opada.

Dodatno, u ovom radu je prikazan model za procenu energetskog statusa krava analizom međusobnog odnosa pojedinih sastojaka mleka (proteina i masti odnosno uree i proteina) u pojedinačnim uzorcima mleka. Na osnovu odnosa proteina i masti u pojedinačnim uzorcima mleka moguće je odrediti energetski status jedinke a na osnovu odnosa uree i proteina snabdevenost krava proteinima i energijom.

Ključne reči: krava, energetski status, sastojci mleka

Uvod / Introduction

Tokom poslednjih nekoliko decenija, proizvodnja mleka po kravi u našoj zemlji je značajno povećana. Prema podacima dobijenim sa tri farme visokomlečnih krava holštajn rase na teritoriji Vojvodine, prosečna proizvodnja mleka po kravi po laktaciji obračunatoj na 305 dana je tokom desetogodišnjeg perioda (od 1996. godine do 2006. godine) porasla sa 5600 na 7800 litara (Kirovski i sar., 2008). Ovakav napredak postignut je zahvaljujući korišćenju savremenih saznanja iz oblasti genetike i selekcije domaćih životinja, kao i oblasti nauke o ishrani. Međutim, istovremeno sa povećanjem proizvodnje mleka kod krava na tim farmama, došlo je i do povećanja učestalosti pojave metaboličkih oboljenja. Tako je u ispitivanom periodu na istim farmama učestalost metaboličkih bolesti porasla sa 19,2% na 53% obračunato u odnosu na pojavu svih oboljenja na farmi. Posledično, prevremeno isključivanje krava iz proizvodnje je povećano za 10%, odnosno sa 20%, koliko je iznosilo 1996. godine, na 30%, koliko je iznosilo 2006. godine.

Razloge povećane učestalosti metaboličkih oboljenja na farmama visokomlečnih krava treba tražiti u različitim greškama u tehnološkom procesu, od koji su na prvom mestu greške u ishrani. Naime, visoka proizvodnja mleka zahteva sistem ishrane koji se značajno razlikuje od tradicionalnog načina ishrane, primenjivanog kod rasa krava koje nemaju genetsku predispoziciju za visoku proizvodnju mleka. Razlog je to što je neuro-endokrina regulacija metaboličkih funkcija krava selekcionisanih na visoku proizvodnju značajno promenjena u cilju postizanja visoke mlečnosti. Ukoliko ishrana ne prati suptilne fiziološke mehanizme koji su veoma intenzivni kod ovih jedinki, vrlo lako može doći do značajnih poremećaja u metabolizmu.

S obzirom na to da se na velikom broju farmi na kojima je visoka učestalost metaboličkih oboljenja poslednjih godina postavilo pitanje profitabilnosti, bilo je neophodno razviti što pouzdanije, ali istovremeno i ekonomski prihvatljive, metode za rano dijagnostikovanje poremećaja metabolizma kod visokomlečnih rasa krava. Naročito je bilo važno razviti metode kojima bi se ustanovili rani

poremećaji u energetskom metabolizmu koji je izložen najvećim opterećenjima, i to posebno tokom peripartalnog perioda. Od metoda za utvrđivanje poremećaja u energetskom metabolizmu krava, u širu upotrebu su ušli ocena telesne kondicije (OTK), ispitivanje metaboličkog profila i endokrinog statusa životinja (Šamanc i sar., 2010a; Šamanc i sar., 2010b; Prodanović i sar., 2011; Kirovski i sar., 2008). Međutim, poslednjih godina sve je više u primeni metoda kojom se na osnovu koncentracije pojedinih sastojaka mleka vrši procena energetskog statusa krava u laktaciji (Šamanc i sar., 2006; Kirovski i sar., 2011). Ova metoda u odnosu na prethodno navedene metode ima niz prednosti. Najpre, kao uzorak za ispitivanje se koristi mleko čije je uzimanje gotovo potpuno nestresogeno za kravu, pogotovo u odnosu na uzimanje krvi. Pored toga, utvrđivanje sastojaka sirovog mleka rutinski se koristi u kontroli nutritivne vrednosti mleka, pa se rezultati dobijeni u tim kontrolama mleka mogu iskoristiti u dijagnostičke svrhe u sklopu programa praćenja i kontrole zdravlja stada (Giesecke i sar., 1994; Pritchard, 1998). Međutim, jedan od značajnih nedostataka primene ove metode u proceni energetskog statusa krava je u tome što se ne može koristiti u zasušenju, kada nastaju najranije promene u endokrinom i metaboličkom statusu jedinke, a koje imaju presudan uticaj na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate visokomlečnih krava.

Uzimanje uzoraka mleka / *Taking milk samples*

Za procenu energetskog statusa krava može se uzeti zbirni uzorak mleka od svih ili pojedinih muznih krava ili pojedinačni uzorak od pojedinih ili svih krava u laktaciji na jednoj farmi. Uobičajeno je da se uzorak mleka uzima ujutru, međutim naši raniji rezultati su pokazali da se kod krava holštajn rase preciznija procena energetskog statusa može dobiti ukoliko se uzorci mleka uzimaju i tokom jutarnje i večernje muže (Šamanc i sar., 2006).

Zbirni uzorak je reprezentativan i može da bude pokazatelj trenutnog metaboličkog stanja svih izmuženih krava u proizvodnji. Uzorak zbirnog mleka za analizu se uzima u količini od 25 do 60 ml, nakon što se u cisterni prethodno dobro promeša. Uzorak iz cisterne se ne sme uzeti iz gornjeg sloja mleka, jer velika količina masti može značajno uticati na rezultate ispitivanja. Prednost korišćenja zbirnog uzorka za procenu energetskog statusa krava u laktaciji je u tome što se uzima samo jedan uzorak, čime se postiže značajna ušteda u troškovima koji su potrebni za izvođenje analiza. Međutim, glavni nedostatak korišćenja zbirnog uzorka je u tome što rezultati analize zbirnog uzorka mleka ne mogu da ukažu na razlike između krava koje pripadaju različitim laktacionim grupama (ranoj, srednjoj i kasnoj fazi laktacije), kao ni na razlike unutar jedne laktacione grupe. S obzirom na to da je za farme visokomlečnih krava u našem regionu, uključujući i područje Srbije, karakterističan visok stepen neujednačenosti krava u pogledu genetskog potencijala za mlečnost, još uvek se na tim farmama ne preporučuje korišćenje zbirnog uzorka mleka za procenu energetskog statusa krava. Tehnološki nedostaci na farmama, koji prevashodno podrazumevaju nemogućnost

preciznog praćenja količine konzumirane hrane u okviru jedne laktacione grupe dodatno otežavaju procenu energetskog statusa krava na osnovu rezultata analize zbirnih uzoraka mleka.

Pojedinačni uzorci mleka uzimaju se tokom muže životinje uz pomoć uređaja koji obezbeđuje uzimanje uzorka iz mleka namuženog od svake krave pojedinačno. Uređaj predstavlja kalibrisani rezervoar u koji se tokom celog procesa muže odliva izvesna količina mleka. Time se omogućava reprezentativnost uzorka jer je poznato da se hemijski sastav mleka menja tokom pojedinih faza muže. To se odnosi pre svega na sadržaj mlečne masti, čija je zastupljenost u mleku na početku muže relativno niska, a na kraju muže relativno visoka. Uređaj obično odvaja uzorak u količini od 25 ml po 1 litru namuženog mleka. Ako je u pitanju mali zapaht krava, neophodno je ispitati uzorak svake krave, a ako se radi o većem stadu krava, tada se za procenu zdravstvenog stanja krava mogu uzeti pojedinačni uzorci od 10% životinja u stadu ili laktacionoj grupi. Rezultati dobijeni analizom pojedinačnih uzoraka mleka su pogodniji za procenu energetskog statusa krava na jednoj farmi, a tako posredno i izbalansiranosti obroka koji se koristi. Ovakvom analizom se mogu utvrditi razlike između pojedinih laktacionih grupa, a, što je još značajnije, mogu se ustanoviti neujednačenosti u okviru iste laktacione grupe. Može se reći da je glavni nedostatak upotrebe pojedinačnih uzoraka mleka za procenu energetskog statusa krava taj što se povećavaju troškovi za analizu. Međutim, ovaj nedostatak treba uzeti sa izvesnom rezervom jer ukoliko pomoću rezultata dobijenih na ovaj način izvršimo takvu korekciju ishrane koja će smanjiti učestalost metaboličkih bolesti na farmi, onda će se sigurno uštedeti više novca no što je bio trošak analize uzoraka mleka. Na osnovu našeg iskustva, analiza zdravstvenog statusa stada na osnovu analize pojedinačnih uzoraka mleka se preporučuje na novoformiranim farmama, kao i na farmama na kojima je izražena neujednačenost krava u okviru laktacionih grupa.

Fiziološka osnova korišćenja parametrara mleka (masti, proteina i uree) za procenu energetskog statusa krava /

Physiological basis for using milk parameters (fat, proteins and urea) for assessing cow energy status

Za procenu energetskog statusa krava u uzorku mleka potrebno je odrediti koncentraciju masti, proteina, laktoze i uree. Za analizu ovih sastojaka mleka uobičajeno se koriste uređaji koji funkcionišu na principu infracrvene spektroskopije (*MilkoScan*, *Lactoscop*, *CombiFoss*). Ovi uređaji se sve više koriste i za rutinsku analizu nutritivne vrednosti mleka proizvođača.

Fiziološka osnova upotrebe navedenih parametara mleka u proceni energetskog statusa krava zasniva se prevashodno na interakciji energetskog metabolizma i metabolizma proteina tokom iskorišćavanja sastojaka hrane za proizvodnju mleka. Naime, proteini koji se koriste u ishrani goveda su najvećim delom razgradivi u buragu (RDP – Rumen degradibile proteins). Samo mali deo

proteina hrane ne podleže razgradnji od strane bakterija buraga (RUP – Rumen undegradible proteins) već dospeva nepromenjen u tanko crevo gde se koriste. Kao što je poznato, pri razlaganju proteina hrane u buragu se oslobađa amonijak, koji se delom resorbuje i portalnim krvotokom dospeva u jetru gde se u ornitinskom ciklusu detoksikuje prelaskom u ureu (Broderick i Clayton, 1997). Pri pojačanom intenzitetu tog procesa, koncentracija uree u krvi raste. S obzirom na to da je urea lako difuzibilni molekul koji prolazi kroz ćelijsku membranu, njena koncentracija u mleku će takođe vrlo brzo porasti. Intenzitet ovog procesa zavisi od snabdevenosti organizma energijom i proteinima. Smanjen sadržaj energije u obroku smanjuje broj i aktivnost bakterija buraga. To znači da amonijak koji nastaje u buragu razgradnjom proteina, ne može u potpunosti da se iskoristi od bakterija za sintezu bakterijskih proteina, koji će kasnije u tankom crevu biti dalje iskorišćene. Tada, dakle, količina amonijaka raste i posledično se povećava i koncentracija uree u krvi i mleku. S druge strane, smanjen je opseg sinteze bakterijskih proteina u buragu, zbog čega se snižava koncentracija aminokiselina i proteina krvi. S obzirom na to da se aminokiseline krvi koriste za sintezu proteina mleka, smanjenje njihove koncentracije dovodi do smanjene sinteze proteina u mlečnoj žlezdi i posledično manje koncentracije proteina u mleku. Treba napomenuti da je energija koja se dobija razlaganjem glukoze značajan faktor koji doprinosi sintezi proteina mleka (Rius i sar., 2010).

Masti mleka potiču prevashodno iz nižih masnih kiselina resorbovanih u buragu ali i delom iz masnih kiselina iz krvotoka. Od masnih kiselina buraga poseban značaj u sintezi masti mleka ima sirćetna kiselina koja pretežno nastaje digestijom sirovih vlakana iz obroka, ali delom i buterna kiselina koja se u zidu buraga prevodi u BHBA (beta hidroksi buternu kiselinu), koja se koristi za sintezu mlečne masti. Masne kiselina prisutne u cirkulaciji, a koje se koriste za sintezu mlečne masti, potiču delom iz masti mobilisanih iz telesnih depoa, delom iz masnih kiselina resorbovanih iz digestivnog trakta, a delom iz masnih kiselina metabolisanih u jetri.

Koncentracija masti u mleka – procena rezultata /

Fat concentration in milk – evaluation of results

Prosečna koncentracija masti u mleku krava zavisi prevashodno od rase. Kod krava holštajn rase iznosi 3,2% do 3,6%, dok se kod krava Simentalske rase kreće u rasponu od 3,6% do 4,0%. U okviru iste rase koncentracija masti u mleku krava varira zavisno od ishrane krava, njihove starosti, faze laktacije kao i godišnjeg doba u kome se uzima uzorak mleka za analizu. Ishrana bogata sirovim vlaknima dovodi do porasta koncentracije masti u mleku dok je ishrana koncentrovanim hranivima praćena smanjenjem koncentracije masti u mleku. Tokom toplih letnjih meseci praćenih visokom relativnom vlažnošću vazduha koncentracija masti u mleku opada. Dalje, starije krave imaju nižu koncentraciju masti u mleku. Odmah nakon teljenja koncentracija masti je najviša, zatim opada od 25.

do 50. dana laktacije, a onda se opet povećava do 250. dana laktacije (Bauman i Griinari, 2003).

Ukoliko je koncentracija masti u mleku van fiziološkog opsega, ona može da ukaže na određene promene u metabolizmu krava koje su dovele do porasta ili smanjenja koncentracije masti u mleku. Tako je sniženje koncentracije masti u mleku često posledica nepovoljne ishrane krava u periodu oko teljenja, odnosno u peripartalnom periodu. Pored toga, smanjenje koncentracije masti u mleku može biti posledica acidoze buraga, koja je posledica preterane upotrebe koncentrovanih hraniva uz istovremeni nedostatak kabaste hrane. U tom slučaju, smanjen sadržaj acetata u buragu ima za posledicu nedovoljnu sintezu mlečne masti. Toplotni stres je redovno praćen smanjenjem koncentracije masti u mleku, najverovatnije kao posledica smanjene konzumacije hrane koja se tada javlja. Moguće je da je pad koncentracije masti u mleku krava tokom toplotnog stresa posledica veće učestalosti acidoze buraga koja se tada javlja (Kadyere i sar., 2002). Dodatno, visoka zastupljenost hraniva bogatih mastima može dovesti do smanjenja mlečne masti. Razlog tome je dvostruk. Kao prvo, linoleinska kiselina u višku, nakon resorpcije, deluje inhibitorno na lipogenezu u mlečnoj žlezdi, a, kao drugo, višak masti u buragu inhibitorno deluje na aktivnost protozoa zbog čega je smanjena digestija strukturnih vlakana obroka (Perfield i sar., 2007). Porast koncentracije masti u mleku je najčešće udružen sa pojačanom lipomobilizacijom, koja se javlja u uslovima izrazitog negativnog energetskog bilansa krava. U tom slučaju, naime, dolazi do porasta koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi, koje mlečna žlezda koristi kao prekursore, u sintezu mlečne masti (van Knegsel i sar., 2007).

Koncentracija proteina u mleku – procena rezultata /

Protein concentration in milk – evaluation of results

Koncentracija proteina u mleku krava zavisi prevashodno od rase. Kod holštajn rase iznosi prosečno 3,06% dok je kod simentalke rase značajno viša i prosečno iznosi oko 3,4%. Fiziološke varijacije koncentracije proteina u mleku zavise od gotovo istih faktora od kojih zavisi i variranje koncentracije masti u mleku. Tako će ishrana bogata proteinima, pogotovo nerazgradivim u buragu, povećati sadržaj proteina u mleku, dok će niskoproteinska ishrana dovesti do smanjenja koncentracije proteina u mleku krava. Faza laktacije, starost krava i sezona utiču na procenat proteina u mleku na isti način kao što utiču na procenat mlečne masti. Kao što je već istaknuto, smanjenje koncentracije proteina u mleku ispod donje fiziološke granice je najčešće povezano sa unosom hraniva siromašnim u proteinima dok je porast koncentracije proteina u mleku udružen sa ishranom bogatom u proteinima. Visok procenat proteina mleka može nekad biti posledica oboljenja mlečne žlezde odnosno mastitisa (Hortet i Seegers, 1998).

Koncentracija uree u mleku – procena rezultata /

Urea concentration in milk – evaluation of results

Fiziološka koncentracija uree u mleku krava holštajn rase varira u širokom opsegu od 2 do 6 mmol/l. Između koncentracije uree u mleku i krvi postoji visoka korelacija (Kampl i sar., 1993). Prema navodima Marenjaka i sar. (2004) prednost određivanja koncentracije uree u mleku u odnosu na krv, kada je u pitanju procena metaboličkog statusa krava, jeste u tome što je mleko dostupnije pa je stoga metoda jednostavnija, a urea u mleku je manje podložna dnevnim variranjima u odnosu na ureu u krvi, koja se menja s obzirom na dinamiku hranjenja i sastav obroka. Izvesna količina uree prisutne u mleku potiče iz uree sintetisane u mlečnoj žlezdi, pa se time objašnjava nešto viša koncentracija uree u mleku nego u krvi.

Fiziološke varijacije koncentracije uree u mleku su izrazite, a zavise od nutritivnih faktora, sezone, starosti krava, stadijuma laktacije i telesne mase. Takođe, koncentracija uree varira tokom dana s tim da je najviša 4 do 6 sati nakon hranjenja, a najniža neposredno pre hranjenja. Od nutritivnih faktora najznačajniji je odnos energije i belančevina u obroku krava (Westwood i sar., 1998). Koncentracija uree raste sa povećanim unosom proteina razgradivih u buragu, ali i sa nedostatkom energije u obroku jer se tada ni optimalna količina belančevina iz obroka ne može iskoristiti zbog smanjene aktivnosti bakterija buraga. S druge strane, sa porastom energetskog snabdevanja krava putem obroka smanjuje se i koncentracija uree u mleku. Tokom letnjeg perioda koncentracija uree u mleku se povećava zbog povećanog učešća zelenog krmnog konvejera u ishrani krava, koga čine hraniva bogata u razgradivim proteinima, a siromašna u energiji. Starost krava utiče na koncentraciju uree u mleku jer se sa svakom narednom laktacijom povećava koncentracija uree u mleku krava. Naime, krave u prvoj laktaciji su još uvek u fazi rasta i razvoja pa stoga efikasnije koriste aminokiseline iz obroka (Wood i sar., 2003). Međutim, Johnson i Young (2003) navode da je kod krava holštajn rase koncentracija uree najviša u prvoj laktaciji. Na početku laktacije koncentracija uree u mleku je najniža, verovatno zbog smanjenog apetita krava u tom periodu. Kasnije se koncentracija povećava i dostiže svoju maksimalnu vrednost u periodu najveće produkcije mleka u laktaciji. Koncentracija uree u mleku se opet značajno smanjuje na kraju laktacije (Johnson i Young, 2003). Međutim, u slučajevima kada se u završnoj fazi laktacije obrok usklađuje sa potrebama krava smanjivanjem udela samo koncentrovanog dela obroka, koncentracija uree u mleku može da se održava na visokom nivou sve do kraja laktacije. U takvim slučajevima, zbog ishrane velikim količinama kabastih hraniva, koja su kao što je poznato bogata RDP-a, pored povećane koncentracije uree u mleku, doći će i do porasta koncentracije masti u mleku.

Upravo zbog toga što veliki broj faktora utiče na koncentraciju uree u mleku, postoji izvesna sumnja pri interpretaciji rezultata i otpor uvođenju analize uree kao rutinske analize. Da bi se otklonile sve sumnje pri interpretaciji rezultata

potrebno je uzorak mleka za ispitivanje koncentracije uree uzimati uvek u isto vreme dana. Takođe, da bi se koncentracija uree u mleku mogla koristiti kao dijagnostičko sredstvo potrebno je tokom nekoliko meseci uspostaviti bazalne vrednosti koncentracije uree za svaki pojedini zapaat i za svaku laktacionu grupu. Smatra se da je, da bi se uspostavile referentne vrednosti za koncentraciju uree u nekom zapatu, potrebno tokom šest meseci, jednom mesečno u jutarnjim satima, utvrđivati koncentraciju uree u pojedinačnim uzorcima mleka krava iz zapata. Nakon toga analize je moguće izvoditi jednom u tri meseca (Marenjak i sar., 2004; Zadnik i sar., 2000). Kod krava holštajn rase postoji potreba da se ovaj parametar odredi i u uzorcima mleka iz večernje muže, a to je poželjno uraditi i za sadržaj proteina i masti (Šamanc i sar., 2006).

Odstupanje koncentracije uree u mleku od fizioloških vrednosti može da ukaže na probleme u ishrani krava. Tako je smanjenje koncentracije uree u mleku krava ispod fiziološki prihvatljive vrednosti najčešće posledica ishrane deficitarne u proteinima i to posebno onih razgradivih u buragu. Takođe, manjak uree u mleku može biti posledica prisustva viška lako usvojivih ugljenih hidrata u obroku krava. Naime, u tom slučaju, smanjuje se pH buraga i amonijak prelazi u jonizovanu formu koja se slabije resorbuje. Time nema dovoljno amonijaka za sintezu uree u buragu (Westwood i sar., 2007). U svakom slučaju, koncentracija uree u mleku iznad fiziološki prihvatljivih vrednosti najčešće ukazuje na višak razgradivih proteina u obroku i/ili nedostatka energije u obroku.

Koncentracija uree u mleku je povećana u uslovima toplotnog stresa najverovatnije zbog prestrojavanja metabolizma u smislu pojačanog katabolizma proteina koji dovodi do intenziviranja sinteze uree u jetri. Naime, poznato je da se u uslovima toplotnog stresa povećava iskorištavanje glukoze u perifernim tkivima jer se na taj način smanjuje količina oslobođene toplotne energije. Samim tim, potreba za glukozom se povećava. Kod preživara najveći deo glukoze obezbeđuje se glukoneogenezom za čije je odigravanje potrebna i veća koncentracija aminokiselina u krvi, koja se obezbeđuje katabolizmom sopstvenih proteina (Kadyere i sar., 2002).

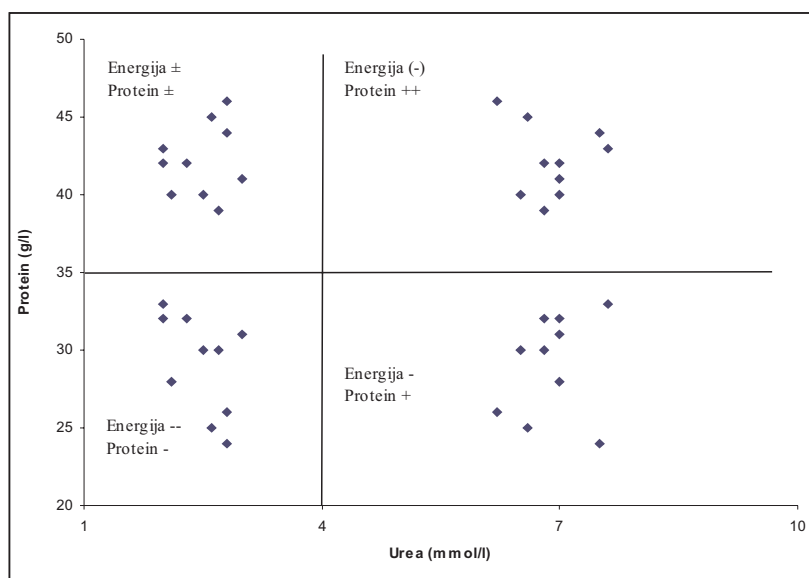
Za vlasnika govedarske farme je značajno da zna da je porast koncentracije uree u mleku uvek udružen sa povećanim ekonomskim gubicima, jer visoka koncentracija uree u mleku najčešće znači preobilnu ishranu proteinima, koji predstavljaju najskuplju komponentu obroka. Takođe, povišena urea u mleku ukazuje na pojačano zagađenje sredine jer smanjena utilizacija azota u proteine znači da se azotna jedinjenja pojačano gube iz organizma, bilo fecesom ili urinom (Van Horn i sar., 1996). Dodatno, visoka koncentracija uree u mleku jasno pokazuje da je intenziviran proces ureogeneze u jetri, proces koji zahteva energiju, te je ona pokazatelj i toga da je organizam dodatno izložen deficitu energije. S druge strane, višak amonijaka koji iz buraga dospeva u jetru ima negativan uticaj na metabolizam jer, dodatno, koči glukoneogenezu u jetri jer se zajednički supstrat, oksalacetat, koristi i za sintezu glukoze i za sintezu aspartata, koji je neophodan za proces stvaranja uree. Zato neki autori smatraju da porast koncentracije uree u

krvi predstavlja opasnost za pokretanje procesa lipomobilizacije, čak i onda kada za to ne postoje fiziološki razlozi (Oetzel, 2004). Dokazano je da porast koncentracije uree u mleku posle teljenja, ukoliko duže traje, dovodi do reproduktivnih problema kod krava (Tamminga, 2006).

Model za procenu energetskog statusa krava analizom pojedinačnih uzoraka mleka / *Model for assessing cow energy status using analysis of individual milk samples*

Za procenu energetskog statusa krava mogu se koristiti pojedinačni uzorci mleka krava u ranoj laktaciji u kojima se određuje koncentracija masti, proteina, laktoze i uree, kao i njihov međusobni odnos.

Na grafikonu 1 je prikazano kako se na osnovu odnosa koncentracije uree i proteina mleka može utvrditi snabdevenost krava energijom i proteinima putem obroka. Kao što se vidi, ukoliko je koncentracija uree manja od 4 mmol/l, a koncentracija proteina veća od 32 g/l, to znači da su krave optimalno snabdevene proteinima i energijom obroka. Ukoliko je koncentracija proteina i dalje povišena i taj porast prati i porast koncentracije uree u mleku (iznad 4 mmol/l) to znači da u obroku ima višak proteina. To se često dešava u letnjem periodu kada se u ishrani krava uvećava udeo zelenog konvejera ili se životinje hrane na pašnjacima. Ukoliko je koncentracija uree iznad 4 mmol/l, a koncentracija proteina manja od 32 g/l to znači da u ishrani krava postoji relativni suficit proteina. Naime, zastupljenost



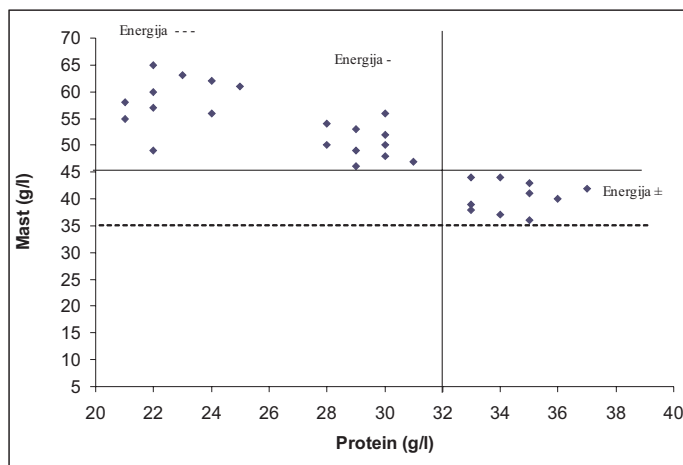
Grafikon 1. Procena snabdevenosti krava energijom i proteina iz obroka na osnovu koncentracije uree i proteina u mleku /

Graph 1. Assessing dietary energy and protein intake using milk protein and urea concentrations

proteina u takvim obrocima je verovatno usklađena sa potrebama krava, ali zbog nedostatka lako usvojive energije u obroku ti proteini ne mogu da se iskoriste u buragu za sintezu bakterijskih proteina, već se gube u obliku amonijaka iz koga se u jetri sintetizuje urea. Ako je koncentracija uree ispod 4 mmol/l a koncentracija proteina manja od 32 g/l to znači da krave ne dobijaju putem obroka dovoljno ni energije ni proteina.

Na grafikonu 2 se dodatno može ustanoviti energetski status krava na osnovu koncentracije proteina i masti u mleku i njihovog međusobnog odnosa. Ukoliko je koncentracija proteina u mleku viša od 32 g/l, a masti između 35 i 45 g/l, to znači da su krave u stanju uravnoteženog energetskog balansa. Ukoliko se koncentracija masti mleka povećava, a koncentracija proteina mleka smanjuje, to znači da su krave u izraženijem negativnom energetskom bilansu na početku laktacije i stoga pokreću sopstvene rezerve masti da bi nadoknadile energetski deficit. To rezultira povećanjem masnih kiselina u cirkulaciji koje se koriste kao prekursori za lipogenezu u mlečnoj žlezdi. Ukoliko je koncentracija masti i proteina mleka manja od 35 odnosno 32 g/l to znači da krave nisu hranjene u skladu sa proizvodnim potrebama.

Zbog načina ishrane, veća koncentracija proteina u mleku je češća kod krava na kraju laktacije. Naime, ako se kod tih krava utvrdi i porast sadržaja masti u mleku to može da ukaže na preobilnu ishranu kvasnim hranivima. Kao što je već istaknuto, često je u takvim uzorcima mleka povišen i sadržaj uree. Međutim, ako je porast proteina u mleku krava na kraju laktacije praćen smanjenim sadržajem masti mleka to može da ukaže na to da su takve krave preobilno hranjene koncentrovanim hranivima, odnosno da su pregojene.



Grafikon 2. Procena energetskog statusa krava na osnovu koncentracije proteina i masti u mleku /

Graph 2. Assessing cow energy status using milk protein and fat concentrations

Zaključak / Conclusion

Određivanje koncentracije proteina i masti u mleku je veoma pouzdan i racionalan postupak za utvrđivanje energetskog statusa krava. Ova ispitivanja je dovoljno obaviti samo u uzorcima mleka dobijenim u jutarnjoj muži. Kod krava holštajn rase postoji potreba da se ovi parametri odrede i u uzorcima mleka večernje muže. Pri tome se mogu koristiti zbirni ili pojedinačni uzorci mleka. Na farmama na kojima postoji neujednačenost genetskog potencijala stada, prednost ima procena energetskog statusa analizom rezultata iz pojedinačnih uzoraka jer se na taj način individualno procenjuje svaka životinja. Dodatno, upotreba pojedinačnih uzoraka mleka se preporučuje na novoformiranim farmama radi uspostavljanja referentnih vrednosti za stada.

Procena snabdevenosti krava energijom i proteinima vrši se na osnovu koncentracije uree i proteina u mleku, a procena energetskog statusa na osnovu koncentracije proteina i masti. Nedostatak ovog dijagnostičkog postupka je u tome što se ne može koristiti kod krava u fazi zasušenja kada započinju promene u metabolizmu koje mogu da ukažu na stepen pripremljenosti životinja za predstojeću laktaciju. Zbog toga se ovaj period mora dodatno proveriti drugim dijagnostičkim metodama.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je finansiran iz sredstava Projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj broj 46002 pod nazivom: „Molekularno-genetička i ekofiziološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanju dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnji bezbedne hrane“. / *The work was financed by funds Project No.46002 entitled: „Molecular-genetic and ecophysiological investigations in the protection of autochthonous animal genetic resources, the preservation of the welfare, health and reproduction of breeding animals, and the production of safe food“ of the Ministry for Science and Technological Development of the Republic of Serbia.*

Literatura / References

1. Bauman DE, Griinari JM. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Anu Rev Nutr* 2003; 23: 203-27.
2. Broderick GA, Clayton MK. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J Dairy Sci* 1997; 80: 2964-71.
3. Giesecke D, Ehrentreich L, Stangassinger M, Ahrens F. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci* 1994; 77: 2376-81.
4. Hortet P, Seegers H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Prev Vet Med* 1998; 37: 1-20.
5. Johnson RG, Young AJ. The association between milk urea nitrogen and DHI production variables in commercial dairy herds. *J Dairy Sci* 2003; 86: 3008-15.
6. Kadyere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 2002; 77: 59-91.

7. Kampl B, Poljićak-Milas N, Francetić Đ, Srebočan E. Determination of the urea content in the deproteinized cow} skim milk by the urease/glutamate dehydrogenase method. *Vet arhiv* 1993; 63: 5-60.
8. Kirovski D, Šamanc H, Vujanac I, Prodanović R, Sladojević Ž. Evaluation of dairy cows energy status by biochemical analysis of organic components of milk, *Proceedings of Days of veterinary medicine*, 9-11 Septembar 2011, Ohrid, Macedonia.
9. Kirovski D, Šamanc H, Cernescu H, Jovanović M, Vujanac I, 2008, Fatty liver incidence on dairy cow farms in Serbia and Romania, *Proceeding of International Symposium "New Research in Biotechnology"*, USAMV Bucharest, Romania, 130-7.
10. Marenjak TS, Pljićak-Milas N, Stojević Z. Svrha određivanja koncentracije ureje u kravljem mlijeku. *Praxis Veterinaria* 2004; 52(3): 233-41.
11. Oetzel GR. Monitoring and testing dairy herds for metabolic diseases. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2004; 20: 651-74.
12. Perfield JW 2nd, Lock AL, Griinari JM, Saebø A, Delmonte P, Dwyer DA, Bauman DE. Trans-9, cis-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2007; 90: 2211-8.
13. Pritchard GC. Making the best use of milk antibody tests. *Cattle Practice* 1998; 6(2): 133-7.
14. Prodanović R, Kirovski D, Jakić-Dimić D, Vujanac I, Kureljušić B. Telesna kondicija i pokazatelji energetskog statusa krava u visokom graviditetu i ranoj fazi laktacije. *Veterinarski glasnik* 2011; 64(1-2): 43-52.
15. Rius AG, Appuhamy JA, Cyriac J, Kirovski D, Becvar O, Escobar J, McGilliard ML, Bequette BJ, Akers RM, Hanigan M. Regulation of protein synthesis in mammary glands of lacting dairy cows by starch and aminoacids. *J Dairy Sci* 2010; 93: 3114-27.
16. Šamanc H, Kirovski D, Jovanović M, Vujanac I, Bojković-Kovačević S, Jakić-Dimić D, Prodanović R, Stajković S. New insights into body condition score and its association with fatty liver in Holstein dairy cows. *Acta Veterinaria Belgrade* 2010; 60(5-6): 525-40.
17. Šamanc H, Dimitrijević B, Vujanac I, Damjanović Z, Polovina M. Procena energetskog statusa krava u laktaciji određivanjem koncentracije organskih sastojaka mleka. *Veterinarski glasnik* 2006; 60(5-6): 283-97.
18. Šamanc H, Stojić V, Kirovski D, Jovanović M, Cernescu H, Vujanac I. Thyroid hormones concentrations during the mid-dry period: an early indicator of fatty liver in Holstein-Friesian dairy cows. *J Thyroid Res* 2010a; article ID 897602.
19. Šamanc H, Kirovski D, Jovanović M, Cernescu H, Vujanac I, Prodanović R, 2008, Uticaj telesne kondicije krava na učestalost i stepen zamašćenja jetre. *Veterinarski glasnik* 2010b; 62(1-2): 3-12.
20. Tamminga S. The effect of the supply of rumen degradable protein and metabolisable protein on negative energy balance and fertility in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2006; 96: 227-39.
21. Van Horn HH, Newton GL, Kunkle WE. Ruminant nutrition from an environmental perspective: factors affecting whole-farm nutrient balance. *J Anim Sci* 1996; 74: 3082-102.
22. van Knegsel AT, van den Brand H, Dijkstra J, Kemp B. Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation. *Theriogenology* 2007; 68, Suppl 1: S 274-80.

23. Westwood CT, Lean IJ, Kellaway RC. Indications and implications for testing of milk urea in dairy cattle: A Quantitative review. Part 1. Dietary protein sources and metabolism. New Zeland Vet J 1998; 46: 87-96.
24. Wood GM, Boettcher PJ, Jambrozik J, Jansen GB, Kelton DB. Estimation of genetic parameters for concentrations of milk urea nitrogen. J Dairy Sci 2003; 86: 2462-9.
25. Zadnik T, Klinkon M, Nemec M, Mesarić M. Dijagnosticiranje pojedinih bolesti goveda iz zajedničkih uzoraka mlijeka. Praxis Veterinaria 2000; 48(1-2): 55-63.

ENGLISH

ASSESSMENT OF DAIRY COW ENERGY STATUS USING MILK FAT, PROTEIN AND UREA CONCENTRATIONS

Danijela Kirovski, H. Šamanc, R. Prodanović

One of the ways to make an assessment of the energy status of cows in lactation is to consider the results obtained from the evaluation of the concentrations of organic milk components. The advantages of this method are that the taking of milk samples is not stressful for the cow and that it is also possible to use the results of milk examinations carried out by dairy plants within regular control. A bulk milk sample from all individual cows can be used, or an individual milk sample. In farms that have herds of unequal genetic potential, it is preferable to assess the energy status by analyzing the results for individual samples, because each animal is assessed individually in that way. Furthermore, the use of individual milk samples is recommended at newly-established farms in order to facilitate the establishment of reference values for the herd.

The energy status of cows is assessed using the milk samples by analyzing fat, protein and urea concentrations and their mutual ratios.

Fat and protein concentrations in cow milk vary depending on the breed, the diet, age, stage of lactation, and the season of the year. A fat content lower than the physiological values can be expected in cases of unfavourable diet of the cows during the period around calving or rumen acidosis, and it can be expected to be higher during ketotic conditions. A higher protein content in milk can be expected during a high-protein, and a lower one during a low-protein diet of the cows.

The physiological concentration of urea in milk depends on nutritive factors, the season, age, stage of lactation, and body mass. Specifically, older cows, cows in advanced lactation, and cows in the summer period tend to have higher values for urea concentration in milk. Among nutritive factors, the most important is the ratio between energy and proteins in the cow feed ration. In cases when protein content in milk is optimal or above the recommended values but the energy supply is lower, the urea concentration increases to over the range of physiological values. In the event that the feed ration is deficient in both proteins and energy the urea content in milk drops.

This work also presents a model for assessing the energy status in cows by analyzing the mutual ratios between the individual milk components (proteins and fat, or urea and proteins) in the individual milk samples. It is possible to determine the energy status of the animal on the basis of the ratio between proteins and fat, and the supply of the cow with proteins and energy on the basis of the ratio between urea and proteins.

Key words: cow, energy status, milk components

ОЦЕНКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО СТАТУСА КОРОВ НА ОСНОВЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ЖИРОВ, ПРОТЕИНОВ И МОЧЕВИНЫ В МОЛОКЕ

Даниела Кировски, Х. Шаманц, Р. Проданович

Один из способов энергетического статуса коров в лактации на основе результатов, полученных определением концентрации органических составных частей молока. Преимущества этого метода в этом, что брание образчика молока нестрессогено для коровы и что могут пользоваться результаты испытания молока, которые в рамках регулярного контроля совершают молочные. Для этого испытания можно пользоваться собирательный образчик молока из всех или некоторых коров или отдельный образчик молока. На фермах на которых существует неприравнение генетического понециала стада, преимущество имеет оценка энергетического статуса анализом результатов из отдельных образчиков ибо таким образом индивидуально оценивается каждое животное. Дополнительно, употребление отдельных образчиков молока рекомендуется на новоформированных фермах ради установления референтных стоимостей для стада.

Для оценки энергетического статуса коров в образчиках молока пользуются концентрация жиров, протеинов и мочевины, словно и их взаимное отношение.

Концентрации жиров и протеинов в молоке коров варьируют зависимо от расы, кормления, старости, фазы лактации и времени года. Содержание жиров в молоке ниже физиологических стоимостей ожидается в случаях неблагоприятного кормления коров в периоде около отёла или ацидоза рубца, а больше у кетозного состояния. Более высокое содержание протеинов в молоке ожидается у высокопротеинового а ниже у низкопротеинового кормления.

Физиологическая концентрация мочевины в молоке коров зависит от питательных факторов, сезона, старости коров, стадии лактации и телесной массы. Так, более старые коровы, коровы в отодвинутой лактации, и коровы в летнем периоде, имеют тенденцию к увеличенным стоимостям концентрации мочевины в молоке. От питательных факторов самый значительный отношение энергии и белков в рационе коров. Насколько содержание протеинов в молоке оптимальный или сверх рекомендованных стоимостей, но снабжение энергией более низкое, концентрация мочевины растёт сверх объёма физиологических стоимостей. Если паёк дефицитарный и в протеинах и энергии содержание мочевины в молоке спадает.

Дополнительно, в этой работе показана модель для оценки энергетического статуса коров анализом взаимного отношения некоторых составных частей молока (протеинов и жиров то есть мочевины и протеинов) в отдельных образчиках молока. На основе отношения протеинов и жиров в отдельных образчиках молока возможно определить энергетический статус единичного животного а на основе отношения мочевины и протеинов снабжение коров протеинами и энергией.

Ключевые слова: коров, энергетический статус, составные части молока

**SLINAVKA I ŠAP U TURSKOJ I ZEMLJAMA BLISKOG
ISTOKA – EPIZOOTIOLOŠKA SITUACIJA***
*FOOT AND MOUTH DISEASE IN TURKEY AND MIDDLE EASTERN
COUNTRIES – EPIZOOTIOLOGICAL SITUATION*

S. Stanojević, S. Stanojević, Z. Mićović, B. Plavšić**

Periodične pojave epizootija slinavke i šapa u zemljama Bliskog istoka i Afrike ozbiljna su zdravstvena pretnja evropskim državama, naročito zemljama Mediterana i Balkanskog poluostrova. Razlozi za često pojavljivanje ove bolesti u Africi i na teritoriji Bliskog istoka su višestruki i svi su posledica nedovoljne razvijenosti država u navedenim geografskim regijama. Tačnije rečeno, epizootije slinavke i šapa se teško kontrolišu u ovim regionima zbog ograničene mogućnosti delovanja veterinarskih službi, nedovoljno razvijenih dijagnostičkih kapaciteta za brzu i preciznu laboratorijsku dijagnostiku, slabe prosvećenosti seoskog stanovništva i tradicionalnog načina uzgoja preživara. Zbog intenzivnog prometa hrane životinjskog porekla, usluga i kretanja ljudi, kulturnih i turističkih veza između Bliskog istoka i zemalja Evrope, postoji stalna i realna opasnost od brzog i nekontrolisanog širenja slinavke i šapa na teritoriju Evrope. Stoga je prioritet epizootioloških službi većine evropskih zemalja stalno praćenje epizootiološke situacije na Bliskom istoku i u Africi.

Ključne reči: Bliski istok, Turska, vakcinacija, perzistentna infekcija

Epizootiološka situacija slinavke i šapa na Bliskom Istoku u periodu od 2005 do 2009. godine /

Epizootiological situation on FMD in Middle East for period 2005–2009

U periodu od 2005. do 2006. godine područje Bliskog istoka je bilo zahvaćeno dvema velikim epizootijama slinavke i šapa prouzrokovanim virusom

* Rad primljen za štampu 30. 05. 2011. godine

** Slavoljub Stanojević DVM, viši savetnik, Ministarstvo poljoprivrede, trgovine, šumarstva i vodoprivrede - Uprava za veterinu; Slobodan Stanojević, viši savetnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr sci Zoran Mićović, dr sci Budimir Plavšić, Ministarstvo poljoprivrede, trgovine, šumarstva i vodoprivrede - Uprava za veterinu, Beograd, Srbija

SIŠ, serotip A. Soj virusa označen kao „A Iran 05“ izolovan je u Iranu 2005. i 2006. godine. Pored ovog soja, u Egiptu je 2006. godine tokom epizootije slinavke i šapa izolovan i virus označen kao „afrički serotip A“. Soj virusa „A Iran 05“ se tokom 2006. godine iz Irana proširio na Tursku, uključujući i njen evropski deo, zatim u Saudijsku Arabiju, Jordan i Pakistan. U 2009. godini zabeleženi su slučajevi pojavljivanja ovog serotipa u Iraku, Bahreinu, Kuvajtu, Libiji i Libanu. Na osnovu molekularne tipizacije genoma izolovanih virusa, ustanovljena je identična genetska struktura između sojeva „A Iran 05“ i „A Irak 22“, što je ukazivalo na to da se isti soj virusa („A Iran 05“) proširio i na teritoriju Iraka. Od avgusta 2007. registrovana je cirkulacija nove podlinije ovog soja, koja nosi oznaku „A Iran 05ARD-07“, i registrovan je u Turskoj. Ovaj soj se antigenski značajno razlikuje od soja „A Irak 22“ i sa njim ne pokazuje unakrsno imunološko reagovanje što dodatno komplikuje planiranje i izvođenje programa vakcinacije u zaraženim područjima. Sa druge strane, ovaj soj je imunološki srodan soju „A Turska 2006“ (Anonymous, 2009).

Novi soj virusa slinavke i šapa serotip A, je u 2006. godini u Egiptu registrovan u 8 provincija. Ovaj novi identifikovani soj virusa SIŠ se genotipski razlikuje od svih sojeva identifikovanih na Bliskom istoku i na osnovu svojih genetskih karakteristika odgovara soju virusa koji je izolovan u istočnoj Africi (istočnoafrički soj). S obzirom na to da je isti ovaj soj ponovo identifikovan u februaru 2009. godine u Egiptu, očigledno je da se istočnoafrički soj virusa slinavke i šapa zadržao u prijemljivoj populaciji životinja u Egiptu i oblasti Mediterana (Anonymous, 2009).

U 2007. godini otkriveno je prisustvo virusa slinavke i šapa, serotip O, soj „PanAsia 2“ na teritorijama Irana, Jordana, Izraela, Palestine, Bahraina, Kuvajta, Ujedinjenih Arapskih Emirata, Turske, Libana i Egipta. Pretpostavlja se da se virus proširio verovatno iz Indije i Pakistana jer je identičan soj ovog virusa izolovan u ovim zemljama 2001. godine (OIE, 2009).

Ovakav biodiverzitet izolovanih virusa slinavke i šapa ukazuje na multicentrično širenje bolesti, prisustvo vrlo složenih i raznovrsnih puteva prenošenja i širenja uzročnika, odnosno postojanje raznovrsnih izvora infekcije. Ovakva epizootiološka situacija u državama Bliskog istoka i Afrike ukazuje na to da se bolest nekontrolisano pojavljuje i širi.

Antigenska različitost izolovanih virusa i njihov genetski biodiverzitet ukazuju na potrebu za detaljnijim i opsežnijim planiranjem i modeliranjem programa kontrole bolesti i programa vakcinacije, odnosno upotrebu različitih vakcina u skladu sa potrebama nastalim zbog prisustva različitih serotipova virusa na terenu. Početkom 2009. godine u nekoliko zemalja Bliskog istoka, uključujući i Tursku, dijagnostikovano je prisustvo virusa slinavke i šapa serotipa A pa je sve ukazivalo na to da se radi o endemskom prisustvu ovog serotipa. Međutim, zbog genetskih odstupanja koja su se dešavala na genomu virusa, javljale su se vrlo teške epizootije praćene visokim mortalitetom. Poslednja takva značajna genetska promena ovog serotipa desila se upravo sa virusom SIŠ, serotip A, soj „Iran

05“ koji se proširio kroz čitav region, od Turske do Pakistana. Samo je u januaru i februaru 2009. godine registrovano preko 130 slučajeva slinavke i šapa u različitim delovima centralnog i južnog Iraka prouzrokovanih tipom A, soj „Iran 05“ (Anonymous, 2009). Kao reakcija na ovakvo pogoršanje epizootiološke situacije usledila je akcija FAO/EUFMD Komisije i Evropske unije pa je u cilju zaustavljanja daljeg širenja infekcije pokrenuta kampanja masovne vakcinacije malih preživara i goveda u Iraku. Obezbeđeno je 500 000 doza trovalentne vakcine koja je sadržala sojeve virusa SIŠ serotipova A (Irak 22), O i Azija 1, (Europe Aid; FAO, 2009; Anonymous, 2009).

Tabela 1. Pojavljivanje slinavke i šapa u zemljama Bliskog istoka /
Table 1. Incidence of FMD in Middle Eastern countries

Država / State	Status u periodu od šest meseci / Status within six-month period							
	2005		2006		2007		2008	
	Jan-Jun <i>Jan-June</i>	Jul-Dec <i>July-Dec</i>	Jan-Jun <i>Jan-June</i>	Jul-Dec <i>July-Dec</i>	Jan-Jun <i>Jan-June</i>	Jul-Dec <i>July-Dec</i>	Jan-Jun <i>Jan-June</i>	Jul-Dec <i>July-Dec</i>
Afganistan / <i>Afghanistan</i>	+	+	+	+	+	+	?	?
Kraljevina Bahrein / <i>Kingdom of Bahrain</i>	+	+	+	+	+Z	+Z	?	?
Kipar / <i>Cyprus</i>	-	-	?	?	-	sCI	?	?
Republika Džibuti / <i>Republic of Djibouti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Egipat / <i>Egypt</i>	-	-	+	-	-	+	+	-
Iran / <i>Iran</i>	+	+	+	+	+	+	+	?
Irak / <i>Iraq</i>	?	?	?	?	?	?	?	?
Izrael / <i>Israel</i>	-	+	-	+	+	+	+	?
Jordan / <i>Jordan</i>	-	-	-	+	-	-	-	?
Kuvajt / <i>Kuwait</i>	-	-	+	+	+	+	+	?
Liban / <i>Lebanon</i>	sCI	sCI	sCI	sCI	+		+	?
Libija / <i>Libya</i>	-	-	-	-	-	-	-	?
Oman / <i>Oman</i>	+	+	+	+	+	+	+	?
Palestina / <i>Palestine</i>	-	-	+Z	+Z	?	?	?	?
Katar / <i>Qatar</i>				S	S	S	S	?
Saudijska Arabija / <i>Saudi Arabia</i>	+	+	+	+	+	+	+	?
Sudan / <i>Sudan</i>	-	S	S	+	+	-	+Z	?
Somalija / <i>Somalia</i>	?	?	?	?	?	?	?	?
Sirija / <i>Syria</i>	-	-	-	-	-	-	?	?
Turska / <i>Turkey</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
Ujedinjeni Arapski Emirati / <i>United Arab Emirates</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Jemen / <i>Yemen</i>	+	+	+	+	+	+	-	?

? – Nema dostupnih informacija / No available information

- – Bolest nije prijavljena u naznačenom periodu / Disease not reported in given period

- S – Sumnja na SIŠ / *Suspected FMD*
sCI – Potvrđena infekcija bez kliničkih simptoma / *Confirmed infection without clinical symptoms*
+ – Potvrđeni klinički slučajevi / *Confirmed clinical cases*
+Z – Potvrđena infekcija u pojedinim zonama / *Confirmed infection in specific zones*

Tabela 2. Geografski distribucija različitih serotipova virusa SIŠ u periodu 2008-2009.
(Bliski istok, severna i istočna Afrika) /
Table 2. Geographic distribution of different serotypes of FMD virus for period 2008-2009
(Middle East, North and East Africa)

Država / State	Serotip virusa SIŠ / Serotype of FMD virus
Afganistan / <i>Afghanistan</i>	nema informacija / <i>No information</i>
Pakistan / <i>Pakistan</i>	nema informacija / <i>No information</i>
Turkmenistan / <i>Turkmenistan</i>	nema informacija / <i>No information</i>
Kraljevina Bahrein / <i>Kingdom of Bahrain</i>	A
Kipar / <i>Cyprus</i>	nema informacija / <i>No information</i>
Republika Džibuti / <i>Republic of Djibouti</i>	nije prijavljen nijedan slučaj / <i>No reported cases</i>
Egipat / <i>Egypt</i>	SAT 1, O
Iran / <i>Iran</i>	A, O
Irak / <i>Iraq</i>	A
Izrael / <i>Israel</i>	A, O
Jordan / <i>Jordan</i>	nema informacija / <i>No information</i>
Kuvajt / <i>Kuwait</i>	A
Liban / <i>Lebanon</i>	A, O
Libija / <i>Libya</i>	A
Oman / <i>Oman</i>	klinički nalaz / <i>Clinical finding</i>
Palestina / <i>Palestine</i>	O
Katar / <i>Qatar</i>	klinički nalaz SIŠ / <i>Clinical finding of FMD</i>
Saudijska Arabija / <i>Saudi Arabia</i>	klinički nalaz / <i>Clinical finding</i>
Sudan / <i>Sudan</i>	nema informacija / <i>No information</i>
Somalija / <i>Somalia</i>	nema informacija / <i>No information</i>
Sirija / <i>Syria</i>	nema informacija / <i>No information</i>
Turska / <i>Turkey</i>	A,O
Ujedinjeni Arapski Emirati / <i>United Arab Emirates</i>	nema informacija / <i>No information</i>
Jemen / <i>Yemen</i>	nije prijavljen nijedan slučaj / <i>No reported cases</i>
Čad / <i>Chad</i>	klinički nalaz / <i>Clinical finding</i>
Nigerija / <i>Nigeria</i>	klinički nalaz / <i>Clinical finding</i>
Etiopija / <i>Ethiopia</i>	klinički nalaz / <i>Clinical finding</i>
Kenija / <i>Kenya</i>	SAT 2

Razlozi ovako uspešnog širenja virusa slinavke i šapa – serotipa A nisu sasvim poznati, ali su najverovatnije posledica uticaja više faktora, i posebno intenzivnog prometa životinja. Pored prisustva virusa SIŠ serotipa A, izolacija vi-

rusa SIŠ serotipa O u Libanu takođe ukazuje na značajno kretanje zaraze ka zapadu i ujedno predstavlja direktnu pretnju zemljama mediteranskog basena uključujući i zemlje Balkana (OIE, 2009).

Epizootička situacija slinavke i šapa u Turskoj u periodu od 2005 do 2010. godine / *Epizootiological situation for FMD in Turkey for period 2005-2010*

Zbog svoje blizine, geopolitičkog položaja i intenzivnog prometa robe, ljudi i usluga, Turska kao država u kojoj su slinavka i šap gotovo konstatno prisutne, predstavlja posebnu pretnju i izazov za zemlje Evropske unije i zemlje jugoistočnog Balkana. Turska je takođe vrlo značajna i u pogledu moguće pretnje od unošenja uzročnika slinavke i šapa u Republiku Srbiju zbog jakih ekonomskih, kulturnih i turističkih veza koje postoje između ove dve države.

Ukupna površina teritorije Turske iznosi 780.580 km² na kojoj živi 71,5 miliona stanovnika. Turska ima oko 2 miliona stočarskih gazdinstava sa ukupnom populacijom od 10,5 miliona goveda i 48,7 miliona ovaca.

Dominantan način odgoja životinja u većem delu Turske je nomadsko stočarenje i ono se ne razlikuje od načina kako se životinje uzgajaju u većini zemalja Bliskog istoka. Primitivan, ekstenzivan način stočarenja podrazumeva i odgajanje - primitivnih rasa stoke. Životinje se tokom većeg dela sezone drže na zajedničkoj ispaši, kada se i dešava najveći broj kontakata obolelih i prijemčivih životinja. Tokom zime dolazi do smanjenja broja obolelih životinja i do smirivanja epizootije. Međutim, tokom proleća kada se životinje ponovo izvode na zajedničku ispašu uočava se nagli skok i povećanje broja novoinficiranih i obolelih životinja. Ukupno 76% svih registrovanih slučajeva slinavke i šapa su zabeleženi u proleće odnosno u periodu april – jun.

Posebnu opasnost za prenošenje slinavke i šapa u zahvaćenim regionima Turske predstavljaju ne samo obolele životinje već i mlade jedinke koje su primile samo jednu dozu vakcine, odnosno sve one životinje koje posle prve vakcinacije nisu dobile još jednu podsticajnu dozu vakcine. Kod ovih životinja klinička slika je često prikrivena ili bolest prolazi u blagoj formi pri čemu inficirane jedinke izlučuju virus u spoljašnu sredinu. Jedan od važnih ograničavajućih faktora uspešne kontrole bolesti jeste i relativno kratak imunitet koji nastaje nakon vakcinacije u odnosu na prirodnu infekciju.

Nije retka pojava da vakcinisane životinje, zbog genetskih varijacija i genetskih driftova koji nastaju tokom epizootija, iako imaju zadovoljavajući nivo zaštitnih antitela ostaju prijemčive za viruse koji slobodno cirkulišu u prirodi. Razlog ove pojave je imunološko nepoklapanje vakcinalnih sojeva i divljih sojeva prisutnih u prirodi.

Jedan od mogućih izvora infekcije mogu biti i prebolele životinje. Naime, poznato je da kod većine inficiranih životinja virus prestaje da se izlučuje iz organizma odmah nakon preboljenja. Međutim, dokazano je da se kod 50% prebolelih preživara sedamnaestog dana od dana pojavljivanja prvih simptoma

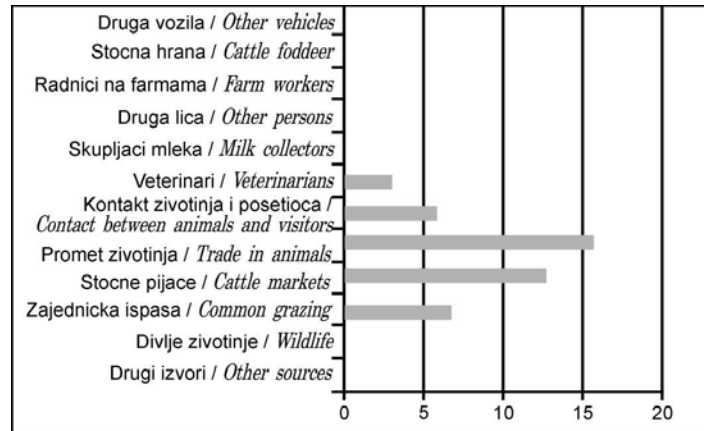
bolesti u krvi javlja ponovni porast titra - antitela protiv NSP (nestrukturini protein virusa slinavke i šapa) kao rezultat prisustva ovog virusa u kriptama faringelanih limfnih čvorova. Kod životinja kod kojih se virus i dalje zadržao u organizmu dolazi do njegovog umnožavanja, one su perzistentno inficirane i kao takve su izvor infekcije (period kliconoštva kod nešto više od 50% prebolelih goveda može trajati i do 3,5 godine, kod ovaca do 9 meseci i kod koza do 4 meseca). Iako je ova pojava u eksperimentalnim uslovima do sada dokazana samo kod afričkih bivola, opravdano je stanovište da je i ovo jedan od mogućih puteva prenošenja virusa slinavke i šapa u Turskoj i drugim zemljama gde je bolest endemskog karaktera (Julef i sar., 2008; Alexandersen i sar., 2002; Bartley i sar., 2002).

Vrlo značajan put prenošenja bolesti u Turskoj, pored zajedničke ispaše jeste i trgovina živom stokom, koja je u ovim krajevima vrlo intenzivna. Zbog nedovoljne kontrole prometa stoke, životinje obolele od slinavke i šapa moguće je naći čak i na pijacama pa i u klanicama. Kako je u većem delu Turske način odgoja životinja ekstenzivan, a bolest, zbog svog endemskog karaktera protiče najčešće sa blagim simptomima, stanovništvo nema pravu sliku o ekonomskom značaju ove bolesti i najčešće ne pridaje veliki značaj merama suzbijanja i kontrole. Iz tih razloga bolest se vrlo teško kontroliše. Životinje su često neobeležene, odnosno značajan broj mladih životinja ostaje neobeležen a veterinarska služba ne kontroliše promet i kretanje životinja uključujući i one čiji se promet odvija čak i na registrovanim mestima prodaje. Nije retka pojava ponovne infekcije i pojavljivanja bolesti kod prebolelih životinja izazvane serotipovima koji se imunološki ne poklapaju sa uzročnikom bolesti koji je izazvao primarnu infekciju.

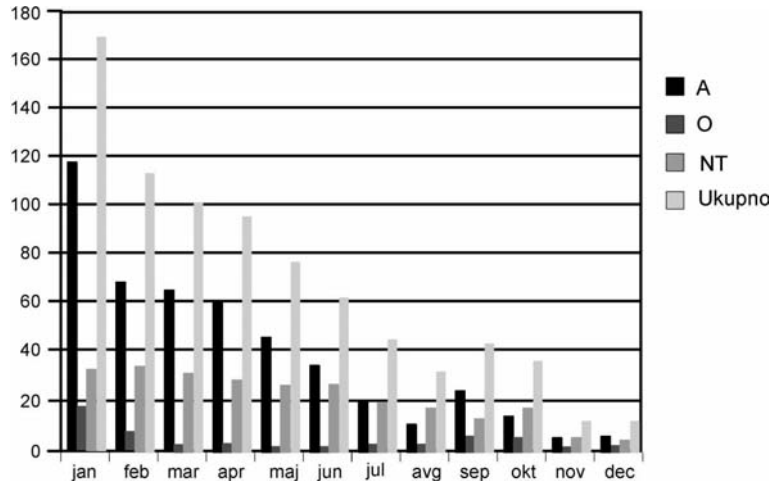
Epizootiološki se posebno ističe područje Anadolije. Slinavka i šap je već godinama endemski prisutna u Anadoliji, gde cirkulišu serotipovi O i A virusa slinavke i šapa. Virus SIŠ serotip Azija 1 poslednji put je u Turskoj izolovan u aprilu 2002. godine. U 2005. godini u najvećem broju slučajeva bio je izolovan virus SIŠ serotip O, soj „Manisa 1“. U novembru iste godine je registrovan novi soj serotipa A koji se genotipski razlikuje od sojeva „A Iran 96“ i „A Iran 99“, koji su prethodno bili otkriveni na teritoriji Turske. Ispitivanjem genoma izolovanih sojeva virusa u Svetskoj referentnoj laboratoriji za SIŠ (FAO/OIE/CRL Animal Health Institute-Pirbright Laboratory) utvrđeno je da se radi o izolatima koji genotipski odgovaraju sojevima poreklom iz Irana iz 2005. godine (antigensko poklapanje postoji i sa vakcinalnim sojem „A 22 Irak“). U 2006. godini registrovan je prodor virusa SIŠ serotipa O „Pan-Azija“, koji nije bio registrovan u ranijem periodu, tako da od 2006. godine na teritoriji Turske pored virusa SIŠ serotipa A, cirkulišu i dva soja serotipa O: domaći „O Manisa“ kao i „O Pan-Azija“ (FAO, 2009).

Ovakvi prodori novih serotipova kao i novih sojeva često mogu kompromitovati aktuelne programe vakcinacije. Primera radi, u 2006. godini kao vakcina izbora u Turskoj, korišćena je vakcina pripremljena od vakcinalnog soja „A 21 Irak“. Međutim, za ovu vakcinu je kasnije dokazano da nije obezbeđivala dobru imunološku zaštitu kod vakcinisanih životinja. Razlog za to je bilo prisustvo na terenu virusa SIŠ serotipa A koji je pretrpeo genetske promene (mutacije) i anti-

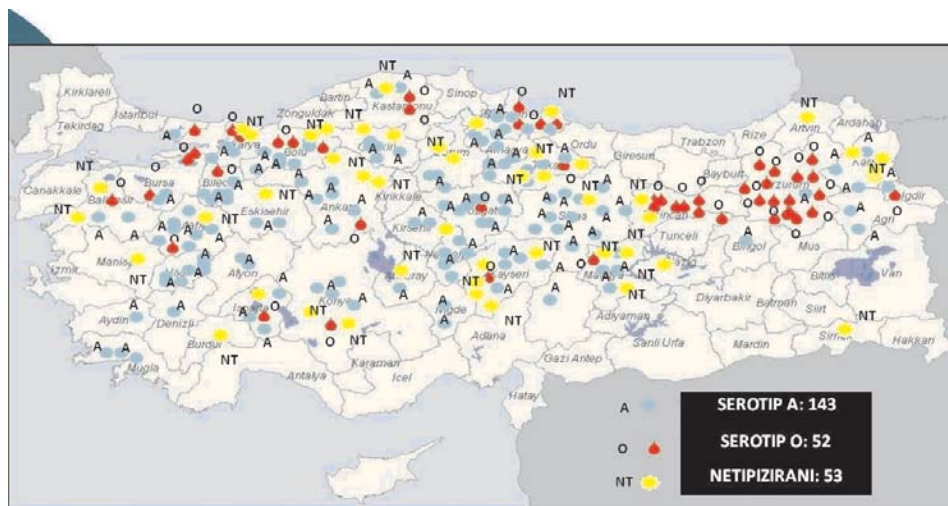
genski se značajno razlikovao od vakcinalnog soja virusa. To je, između ostalih, bio jedan od razloga pojavljivanja slinavke i šapa kod vakcinisanih životinja. Iz tih razloga je ta vakcina zamenjena vakcinom pripremljenom od soja „A TUR 2006“.



Grafikon 1. Najčešći putevi prenošenja virusa SIŠ u Turskoj (Support for FMD surveillance and control in Turkey from FAO, under EC/FAO Agreement on use of EUFMD Trust Fund (MTF/INT/003/EEC), Project report by M. Zafer Zog FAO National Consultant)/
Graph 1. Most frequent pathways for transfer of FMD virus in Turkey (Support for FMD surveillance and control in Turkey from FAO, under EC/FAO Agreement on use of EUFMD Trust Fund (MTF/INT/003/EEC), Project report by M. Zafer Zog FAO National Consultant)

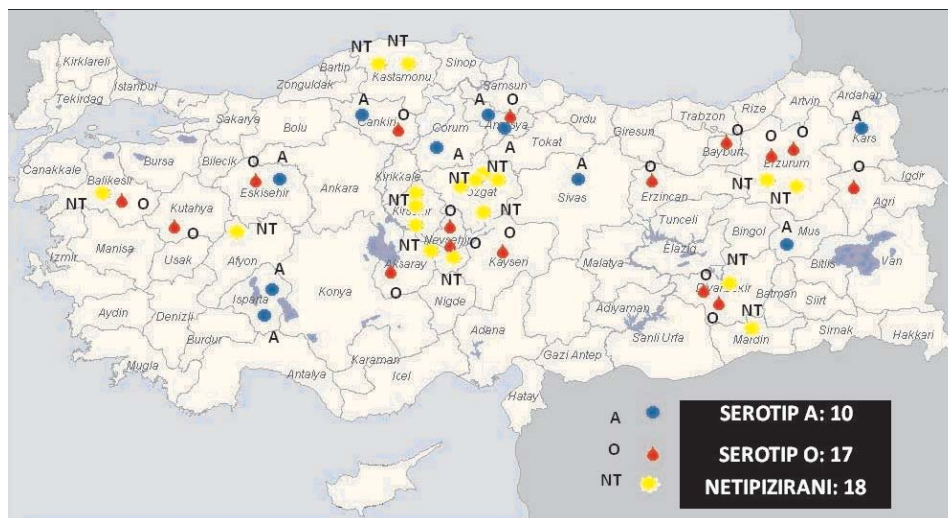


Grafikon 2. Ukupan broj slučajeva SIŠ u Turskoj – sortirano po mesecima u 2007. godini (38th General Session of the EuFMD – 28-30 April 2009. FAO, Rome, progress report for Turkey on FMD situation and control measures)/
Graph 2. Total number of FMD cases in Turkey according to months in 2007 (38th General Session of the EuFMD – 28-30 April 2009. FAO, Rome, progress report for Turkey on FMD situation and control measures)



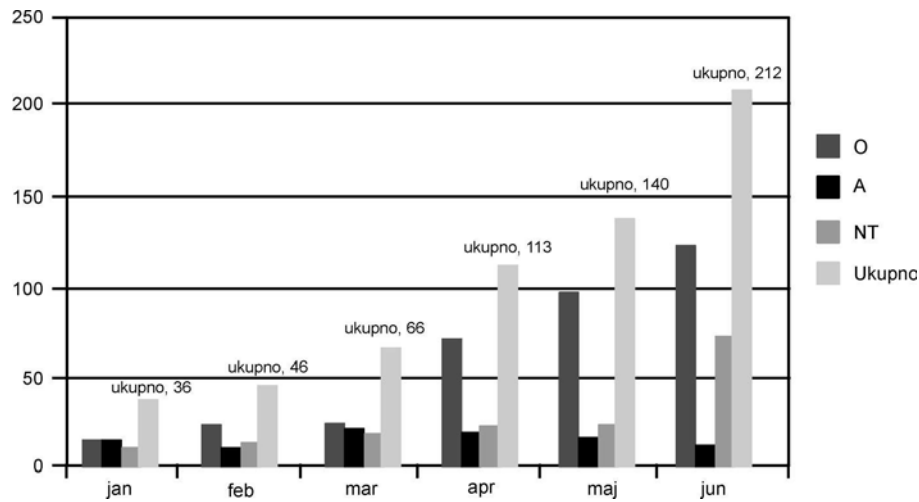
Grafikon 3. Distribucija slučajeva SIŠ u Turskoj u 2008. godini (38th General Session of the EuFMD – 28-30 April 2009. FAO, Rome, progress report for Turkey on FMD situation and control measures) /

Graph 3. Distribution of FMD cases in Turkey in 2008 (38th General Session of the EuFMD – 28-30 April 2009. FAO, Rome, progress report for Turkey on FMD situation and control measures)



Grafikon 4. Distribucija slučajeva SIŠ u Turskoj, April 2009. (38th General Session of the EuFMD – 28-30 April 2009. FAO, Rome, progress report for Turkey on FMD situation and control measures) /

Graph 4. Distribution of FMD cases in Turkey in April 2009 (38th General Session of the EuFMD – 28-30 April 2009. FAO, Rome, progress report for Turkey on FMD situation and control measures)



Grafikon 5. Distribucija slučajeva SIŠ u Turskoj po mesecima u 2010. godini (OIE WAHID interface, annual report 2010) / Graph 5. Distribution of FMD cases in Turkey according to months in 2010 (OIE WAHID interface, annual report 2010)

Zaključak / Conclusion

Glavni rizici povezani sa izbijanjem i širenjem SIŠ u zemljama Bliskog istoka su:

1. promet prijemčivih živih životinja iz oblasti koje nisu slobodne od SIŠ;
2. nekontrolisani prekogranični promet iz zemalja zapadne Azije do Turske;
3. programi vakcinacije često nisu u korelaciji sa sojevima virusa SIŠ prisutnim na terenu;
4. nedostatak rezervi vakcina za egzotične sojeve virusa SIŠ;
5. nedovoljno razvijeni ili potpuno odsustvo sistema za brzo otkrivanje i brzo reagovanje u slučaju pojavljivanja infekcije;
6. nedostatak laboratorijskih kapaciteta za mapiranje i sekvenciranje virusa;
7. nedovoljno organizovana veterinarska služba;
8. nedostatak odgovarajućih vanrednih nacionalnih planova za kontrolu i suzbijanje SIŠ i planova za upravljanje kriznim situacijama u slučaju pojavljivanja egzotičnih sojeva virusa;
9. nepostojanje odgovarajućih kontrolnih mera i programa identifikacije i obeležavanja životinja.

Epizootiološku situaciju na Bliskom istoku treba prihvatiti kao krajnje rizičnu u odnosu na zemlje Balkana i zemlje EU. Iz tih razloga EU je za 2010.

godinu odobrila 11 miliona evra za nabavku trovalentnih i dvovalentnih vakcina kao podršku za kampanju prolećne vakcinacije u Turskoj tokom 2010. godine (Anonimus, 2009).

Literatura / References

1. Anonymous, 38th General Session of the EuFMD – 28-30 April 2009. FAO, Rome, Report: The situation of FMD in Turkey.
2. Anonymous, 38th General Session of the EuFMD – 28-30 April 2009a. FAO, Rome, progress report for Turkey on FMD situation and control measures.
3. Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI. Aspects of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals -- the carrier problem. *Microbes Infect* 2002; 4: 1099-110.
4. Bartley LM, Donnelly CA, Anderson RM. Review of foot-and-mouth disease virus survival in animal excretions and on fomites. *Vet Rec* 2002; 151: 667-9.
5. Compilation of information from OIE (official notifications), or reports to EuFMD/FAO by countries or by the FAO/OIE/EC FMD reference Laboratory, Institute for Animal Health, Pirbright, UK1, Situation of FMD in the Middle-East, 2009.
6. Compilation of information from OIE (official notifications), or reports to EuFMD/FAO by countries or by the FAO/OIE/EC FMD reference Laboratory, Institute for Animal Health, Pirbright, UK2, Dr Adel Ben Youssef, Situation of FMD in the Middle-East, 1 april 2009.
7. Europe Aid/127757/D/SUP/TR: <http://www.dgmarket.com/tenders/np-notice.doč4257047>
8. Ferris NP, Nordengrahn A, Hutchings GH, Reid SM, King DP, Ebert K, Paton DJ, Kristerson T, Brocchi E, Grazioli S, Merza M. Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples, *J Virolog Meth* 2009; 155, 10-7.
9. Juleff N, Windsor M, Reid E, Seago J, Zhang Z *et al.* Foot-and-Mouth Disease Virus Persists in the Light Zone of Germinal Centres. *PLoS ONE* 3(10): e3434. doi:10.1371/journal.pone.0003434, 2008.
10. OIE Regional Representation For the Middle East: FMD Situation in the Middle East in 2008-2009 – 10 April 2009.
11. OIE WAHID interface, anual report 2010.
12. Support for FMD surveillance and control in Turkey from FAO, under EC/FAO Agreement on use of EUFMD Trust Fund (MTF/INT/003/EEC), Project report by M. Zafer Zog FAO National Consultant.

ENGLISH

FOOT AND MOUTH DISEASE IN TURKEY AND MIDDLE EASTERN COUNTRIES – EPIZOOTIOLOGICAL SITUATION

S. Stanojević, S. Stanojević, Z. Mićović, B. Plavšić

Periodic outbreaks of epizooties of foot-and-mouth disease in countries of the Middle East and Africa pose a serious health threat to European states, in particular coun-

tries of the Mediterranean region and the Balkan peninsula. There are multiple reasons for the frequent appearance of this disease in Africa and the territory of the Middle East, and they are all a consequence of the insufficient development of the states in these geographic regions. More precisely, epizooties of foot-and-mouth disease are difficult to control in these regions due to the limited possibilities for activities by veterinary services, insufficiently developed diagnostic capacities for speedy and precise laboratory diagnostics, the lack of more advanced knowledge among the village populations, and the traditional manner of breeding ruminants. As a result of intensive traffic in goods, services and people, the cultural and tourist links between the Middle East and European countries, there is a constant and real danger of a swift and uncontrolled spreading of foot-and-mouth disease to the territory of Europe. This is why it is a priority of epizootiological services of the majority of European countries constantly to monitor the epizootiological situation in the Middle East and in Africa.

Key words: Middle East, Turkey, vaccination, persistent infection

РУССКИЙ

МЫТ И ЯЩУР В ТУРЦИИ И СТРАНАХ БЛИЖНЕГО ВОСТОКА - ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ

С. Станоевич, Ст. Станоевич, З. Мичович, Б. Плавшич

Периодические явления эпизоотий мыта и ящура в странах Ближнего Востока и Африки серьёзная здравоохранительная угроза европейским государствам, особенно странам Средиземноморского района и Балканского полуострова. Причины для частого появления этой болезни в Африке и на территории Ближнего Востока многократные и все вследствие недостаточного развития государств в проведённых географических регионах. Точнее сказано, эпизоотии мыта и ящура тяжело контролируются в этих регионах из-за ограниченной возможности действия ветеринарных служб, недостаточно развитых диагностических способностей для быстрой и точной лабораторной диагностики, слабой просвещённости сельского населения и традиционного способа разведения жвачных животных. Из-за интенсивного оборота товара, услуг и людей, культурных и туристических связей между Ближним Востоком и странами Европы, существует постоянная и реальная опасность от быстрого и бесконтрольного расщирения мыта и ящура на территории Европы. Оттого приоритет эпизоотологических служб большинства европейских стран постоянная слежка эпизоотологической ситуации на Ближнем Востоке и в Африке.

Ключевые слова: Ближний Восток, Турция, вакцинация, персистентная инфекция

**UTICAJ HIGIJENSKO-SANITARNIH MERA U POGONU ZA
PROIZVODNJU MASLACA NA MIKROBIOLOŠKU
ISPRAVNOST FINALNOG PROIZVODA***
***EFFECTS OF HYGIENE-SANITARY MEASURES ON
MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FINISHED PRODUCT IN
BUTTER PRODUCTION PLANT***

N. Memiši, Marija Škrinjar, Slavica Vesković-Moračanin**

U ovom radu prikazani su rezultati ispitivanja uticaja higijensko-sanitarnih mera na kritičnim tačkama u tehnološkom procesu proizvodnje maslaca na njegov kvalitet i mikrobiološku ispravnost. U tu svrhu izvršena je kontrola higijenske ispravnosti mašine za bućkanje i pakovanje maslaca (od 125 g i „blok maslaca”), zatim opreme, ruku i odeće (radne kećelje) radnika koji neposredno rade na mašinama, metodom briseva. Procena parametara bezbednosti, kao i higijene samog proizvodnog procesa obavljena je u skladu sa Pravilnikom o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa („Sl. glasnik RS”, br. 72/2010).

Rezultati higijenske ispravnosti briseva uzetih sa mašine za pakovanje maslaca od 125 g, nakon sanitacije, pokazuju povećan broj mezofilnih bakterija (do 90 cfu/cm²), kao i prisustvo bakterija iz familije Enterobacteriaceae (4 cfu/cm²).

Rezultati briseva ruku radnika, na liniji slaganja maslaca, nakon procesa bućkanja, u ambalažni materijal, kao i na liniji pakovanja, pokazuju prisustvo aerobnih mezofilnih sporogenih bakterija (20 cfu/cm²), dok prisustvo patogenih mikroorganizama nije utvrđeno.

Uzorci maslaca pakovani u porcije od 125 g predstavljaju rizičnije oblike komercijalnog pakovanja u odnosu na maslac u bloku („blok maslac”), što je posledica raznih manipulativnih radnji i naknadne spoljne kontaminacije koja se dešava tokom proizvodnog procesa, ukoliko u pogonu nije obezbeđena kontinuirana proizvodnja. Takođe, utvrđeno

* Rad primljen za štampu 05. 09. 2011. godine

** Dr Nurgin Memiši, specijalista mikrobiologije hrane, naučni saradnik, AD „Mlekara” Subotica; dr Marija Škrinjar, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad; dr Slavica Vesković Moračanin, specijalista higijene namirnica, viši naučni saradnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Srbija

prisustvo pojedinih mikroorganizama (aerobni mezofilni mikroorganizmi, lipolitičke bakterije, kao i plesni) u upakovanom maslacu, tokom roka trajanja, u velikoj meri je rezultat spoljne kontaminacije i higijenskog stanja opreme.

Dobijeni rezultati istraživanja ukazuju na potrebu da se prilikom procesa proizvodnje maslaca mora obratiti posebna pažnja na ispunjenost higijensko-sanitarnih uslova tokom samog proizvodnog procesa, što pre svega podrazumeva adekvatno pranje i dezinfekciju opreme, odgovarajući temperaturni režim pasterizacije pavlake i sl., kao i besprekornu higijenu radnika uključenih u proizvodni proces.

Ključne reči: maslac, mikrobiološka ispravnost, higijena površina, održivost proizvoda

Uvod / Introduction

Sprečavanje oboljenja koja se prenose hranom, smanjenje kvara proizvoda i poboljšanje kvaliteta proizvoda tekući su trendovi u prehrambenoj industriji. Postoje brojne mogućnosti za kontaminaciju hrane od momenta njene proizvodnje do momenta konzumiranja. Hrana može da bude kontaminirana tokom proizvodnog procesa, za vreme njenog transporta, u objektima prodaje, kao i od strane potrošača u njihovim domovima. Prema tome, u eri u kojoj je naglasak stavljen na bezbednost hrane, u kojoj su pripreme i obim proizvodnje povećani, neophodno je posvetiti veću pažnju sanitarnim uslovima u lancu od primarne proizvodnje do konzumiranja. Neosporno je da ovaj trend predstavlja veliki izazov za prehrambenu industriju (Obradović, 2008). Higijenska ispravnost u pogonima prehrambene industrije od izuzetnog je tehnološkog, ekonomskog i zdravstvenog značaja. Pojedine linije, oprema, pribor i radne površine, pa i ambalaža, u prehrambenoj industriji često predstavljaju otvorene ili poluotvorene sisteme, u kojima je moguća spoljna kontaminacija mikroorganizmima (Rakić i Katić, 2009). Budući da su u tim mikropopulacijama, pored saprofita, zastupljeni i patogeni mikroorganizmi, neophodno je održavati stalnu higijenu pogona, što se postiže adekvatnim procesima pranja i dezinfekcije (Mercade-Prieto i sar., 2007). Pranje i dezinfekciju je potrebno posmatrati kao pripadajuće zajedničke delove higijene procesa (Wilson, 2005).

U većini evropskih zemalja zahtevi za higijenskim standardima u proizvodnji hrane su sve strožiji i rigorozniji (Wilson, 2005). Uprkos sve strožijim higijenskim standardima, ekonomski gubici proistekli usled kvara su ogromni. Tako npr. u Sjedinjenim Američkim Državama gde su higijenski standardi u proizvodnji hrane najstroži, godišnje ima 12,6 miliona slučajeva trovanja ljudi prouzrokovanih kontaminiranom hranom, što prouzrokuje štete od 8,4 milijardi dolara. Iz tih razloga se na pranje i dezinfekciju više ne može gledati kao na luksuz, već kao na nužnost (Obradović, 2008).

U većini slučajeva, mikroorganizmi – uzročnici kvara mleka i proizvoda od mleka, u većoj ili manjoj meri, uvek umanjuju njihov kvalitet, te su uzrok značajnih ekonomskih gubitaka. Smanjen kvalitet proizvoda posledica je prisustva različitih hemijskih i biohemijskih veza koje menjaju izgled, miris, teksturu, ukus i aromu proizvoda. Nastajanje tih veza rezultat je metaboličke razgradnje pojedinih sastojaka proizvoda nastalih usled aktivnosti mikroorganizma kvara ili delovanjem njihovih enzima (Randolph, 2006).

U proizvodnom pogonu mlekara, maslac se proizvodi od slatke pavlake u mašini za kontinuiranu proizvodnju. Tehnološki gledano, konstrukcija mašina je takva da se u kontinuiranom, zatvorenom sistemu odvijaju svi procesi (bućkanje, ispiranje i gnječenje) koji dovode do nastanka maslaca. S obzirom na složenost tehnološkog postupka proizvodnje maslaca, samo stalna kontrola proizvodnog procesa može garantovati nastanak kvalitetnog i bezbednog proizvoda.

Zbog svega nevedenog, cilj ovog rada je bio da se utvrdi uticaj higijensko-sanitarnih mera, kao i značaj kritičnih tačaka u tehnološkom procesu proizvodnje maslaca, a u cilju dobijanja kvalitetnog i bezbednog proizvoda.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Pranje opreme za bućkanje maslaca / Washing equipment for churning butter

U cilju stalne kontrole procesne higijene, kao i u cilju obezbeđenja nastanka bezbednog proizvoda, koji je definisan i zasnovan na elementima samokontrole sadržanim u HACCP planovima Mlekare, procena efekta sanitarnog pranja i procesa dezinfekcije, vrši se metodom briseva. Oprema koja se koristi tokom procesa bućkanja pavlake i proizvodnje maslaca, pre i nakon završetka



Slika 1. Mašina za kontinuiranu proizvodnju maslaca /
Figure 1. Machine for continuous production of butter

proizvodnog ciklusa rastavlja se i pere pomoću deterdženta koji se obavezno ispirira. Prema navedenim instrukcijama, u cilju uklanjanja tvrdokorne masnoće mlečnog kamenca, definisano je i pranje opreme sodom i kiselinom. Pored ručnog pranja, navedena opreme za bućkanje, kao i cevi i pumpa za transport pavlake od zrijača do mašine za bućkanje, peru se preko decentralizovanog CIP-a, koji se nalazi u pogonu za proizvodnju maslaca. Pre početka proizvodnje vrši se samo kratko pranje i dezinfekcija. Ovo kratko pranje podrazumeva upotrebu alkalnog sredstva koncentracije 1,5% – 2,0 %, na temperaturi od 65° – 70°C u trajanju 15 – 20 minuta, nakon čega sledi faza ispiranja vodom 10 minuta do neutralnog ispirka.

Delovi pakerica koje se koriste za pakovanje maslaca od 10 ili 125 g se, takođe, rastavljaju i peru ručno deterdžentom, posle čega sledi ispiranje i dezinfekcija rastvorom na bazi persirćetne kiseline u koncentraciji 0,05% – 0,2%.

Ispitivanje vode / Examination of water

Mlekara za potrebe proizvodnje troši velike količine vode, te za snabdevanje pogona tehnološkom vodom koristi vodu iz sopstvenog vodozahvata (bunara), koja se posebnim tehničko-tehnološkim rešenjima priprema i kondicionira kako bi po kvalitetu odgovarala nameni. U proizvodnom delu pogona gde se obavlja proces bućkanja maslaca, kao i delu pogona gde se vrši proces njegovog pakovanja, obavljeno je uzorkovanje vode u cilju ispitivanja njene fizičko-hemijske i mikrobiološke ispravnosti. Uzorci vode za mikrobiološku analizu uzeti su u čiste staklene boce, zapremine 250 i 1.000 ml u koje je dodat 5% rastvor natrijumtiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), radi redukcije hlora. Slavine na kontrolnim mestima u pogonu, sa kojih se koristi voda u procesima pranja, pre uzimanja uzoraka vode su obrisane vatom natopljenom 70% etil-alkoholom i izvršeno je njihovo spaljivanje. Nakon toga, ispuštena je voda nakon čega su uzeti uzorci. Navedena ispitivanja su obavljena u skladu sa Pravilnikom o higijenskoj ispravnosti vode za piće („Sl. list SRJ“ br. 42/1998) (u daljem tekstu Pravilnik 2) u laboratorijama Zavoda za javno zdravlje u Subotici. Ispitivanja su ponovljena tri puta.

Ispitivanje briseva uzetih sa površina koje dolaze u kontakt sa hranom tokom procesa proizvodnje i pakovanje maslaca / Examination of swabs taken from work surfaces and equipment for production and packing of butter

Neposredno pre početka procesa proizvodnje maslaca obavljena je kontrola higijenske ispravnosti mašine za bućkanje, mašine za pakovanje maslaca (slika 1), zatim opreme i radnih površina. U radu je korišćen metod za brzo dokazivanje ostataka organskih materija na površinama (metod brisa) zasnovan na ispitivanju količine prisutnog ATP na ispitivanoj površini, primenom aparata LIGHTNING MVP (Biocontrol, USA). Navedena metoda pogodna je za dokazivanje ostataka organske materije na površinama posle mehaničkog čišćenja i

pranja, a pre procesa dezinfekcije. Utvrđeno prisustvo proteina ili ugljenih hidrata na ispitivanim površinama pokazuje da pranje nije dobro obavljeno i da se postupak pranja mora ponoviti.

Za ovo ispitivanje, u radu je korišćen bris za jednokratnu upotrebu, a sam postupak je izveden u skladu sa procedurom propisanom od strane proizvođača testa. Rezultati su očitani nakon 10 sekundi i iskazani su u RLU. Dobijene vrednosti u intervalu od 0 do 2,5 RLU-a ukazuju na dobar higijenski status površina sa kojih je uzet bris, dok su vrednosti veće od 2,5 pokazatelji zaprljanosti površina.

Paralelno sa indirektnim i, istovremeno, brzim metodama ispitivanja, tokom oglada su uzimani brisevi u cilju bakteriološkog ispitivanja i procene higijenskog stanja navedenih površina. Uzimanje briseva sa površina koje dolaze u kontakt sa hranom, urađeno je u skladu sa standardom ISO 18593:2004.

Sterilni brisevi, u obliku drvenih, lako lomljivih štapića, na čijem se vrhu nalazila namotana vata, bili su zapakovani pojedinačno u epruvete. Neposredno pre upotrebe, vrh brisa je navlažen sterilnim fiziološkim rastvorom koji je sadržavao 1% peptona. Nakon odstranjivanja viška tečnosti (mehaničkim pristiskom uz zid epruvete) bris je uziman sa tačno ograničene ispitivane površine (100 cm²) okretanjem brisa sleva udesno i zdesna ulevo (pet puta), kao i uzdužnim pokretima (gore-dole) isti broj puta. Brisevi su uzimani sa tačno ograničene površine pomoću sterilnog metalnog šablona, čije su unutrašnje stranice bile 10 x 10 cm (ukupno 100 cm²). Uzeti brisevi su vraćani u epruvetu sa 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora sa 1% peptona, i u najkraćem vremenu transportovani su u laboratoriju na predviđena ispitivanja. Ispitivanja su obavljena u mikrobiološkoj laboratoriji Instituta za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu.

U cilju direktne procene higijenskog statusa ispitivanih površina određivan je ukupan broj a) mezofilnih bakterija (SRPS EN ISO 4833:2008); b) aerobnih mezofilnih bakterija (SRPS EN ISO 4833:2008); c) aerobnih mezofilnih spirogenih bakterija (metoda 3, Pravilnika sl. list br. 25/80); d) lipolitičkih bakterija (metoda 7, Pravilnika Sl. list br. 25/80); e) *Salmonella* spp. (SRPS EN ISO-6579:2002); f) *E.coli* (ISO 16649-1:2009); g) sulfitoredujućih klostridija (ISO 15213:2003); h) bakterija familije *Enterobacteriaceae* (SRPS EN ISO 21528-1:2009); i) koagulaza pozitivnih stafilokoka (ISO 6888-2:2008); j) *Listeria* spp. (ISO 11290-1:2004, uz primenu Api List – biohemijskog sistema (Biomerieux, France) za konačnu identifikaciju); i k) kvasaca i plesni (ISO 21527-1:2008). Ispitivanja su ponovljena tri puta.

Za vreme procesa proizvodnje maslaca, kontrolisana je, takođe, higijena radnog odela (kecelja), kao i higijenski status ruku radnika koji su radili na liniji za proizvodnju maslaca. Prema proceni HACCP tima, pozicija prihvatanja maslaca nakon izlaska iz mašine za bućkanje, pozicija pakovanja maslaca u kartonske kutije, kao i procesi manipulacije radnika sa ambalažom (lepljenje kutija, slaganje na palete i unošenje u hladnjaču), predstavljaju nužna mesta kontrole. Takođe, kontrolisana je higijena ruku radnika koji rade na poslovima pakovanja

maslaca u manje ambalažne jedinice od 125 g. Radnici na ovim radnim operacijama nosili su rukavice za jednokratnu upotrebu.

Način uzimanja briseva, kao i predviđena ispitivanja obavljana su na identičan način kao u prethodnom delu (ISO 18593:2004). Ispitivanja su ponovljena tri puta. Interpretacija dobijenih rezultata je bila zasnovana na napred navedenom standardu, kao i na elementima samokontrole propisanim u HACCP planovima Mlekare.

Ispitivanje roka upotrebe maslaca / Examination of shelf life of butter

Nakon završetka proizvodnje iz svake proizvodne šarže uzimani su uzorci maslaca upakovani u ambalažne jedinice od 125 g, kao i blok maslaca od 20 kg. Ovi uzorci čuvani su tokom procesa skladištenja na temperaturi hladnjače (+6° C) u cilju praćenja njihove održivosti tj. roka upotrebe. Počev od datuma proizvodnje na svakih 10 dana, pa sve do 60 dana njihovog roka trajanja, iz skladišnog prostora, uzimani su uzorci (iz svake proizvodne šarže po 5 uzoraka), kod kojih je obavljana mikrobiološka kontrola. Ispitivanja su obavljana u mikrobiološkoj laboratoriji Instituta za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu. Ispitivanja su ponovljena tri puta.

Rezultati ispitivanja / Results

Rezultati laboratorijskih ispitivanja pokazuju da mikrobiološki i fizičko-hemijski parametri ispitivanja vode koja se koristi u Mlekari tokom procesa proizvodnje maslaca, odgovaraju zahtevima Pravilnika 2 (tabele 1 i 2). Kada su u pitanju mikrobiološki parametri, utvrđeno je prisustvo manjeg broja aerobnih mezofilnih bakterija. Međutim, utvrđeni broj nije prelazio granicu predviđenu Pravilnikom (dozvoljeno do 10 ćelija u 1 ml), što govori da je voda koja se koristi tokom procesa proizvodnje mikrobiološki ispravna.

Takođe, rezultati fizičko-hemijskih ispitivanja vode ukazuju na njen zadovoljavajući kvalitet (tabela 2).

Rezultati ispitivanja briseva uzetih sa mašina za bućkanje i pakovanje maslaca u ambalaži od 125 g, obavljani klasičnim mikrobiološkim metodama i metodom ATP – bioluminiscencije, prikazani su u tabelama 3 i 4.

Dobijeni rezultati ispitivanja ukazuju na zadovoljavajući efekat sanitarnog pranja i procesa dezinfekcije koja se sprovodi na mašini za bućkanje, pošto na ispitivanim površinama nije utvrđeno prisustvo patogenih i drugih ispitivanih mikroorganizama. Apsolutna korelacija između klasične i ATP metode se ne uočava, ali se može konstatovati da na mestima gde su dobijene veće vrednosti ATP-a, dobijene su i više vrednosti ukupnog broja mezofilnih bakterija. Prema preporuci proizvođača uređaja, vrednosti ATP-a manje od 2,5 označavaju čiste površine, a vrednosti više od 2,5 i manje od 3,0 ukazuju na kritične vrednosti s aspekta higijene, te u toku narednog pranja treba obratiti više pažnje na ta mesta.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja mikrobioloških parametara vode koja se koristi tokom procesa proizvodnje maslaca /

Table 1. Results of the research of microbiological parameters of water used during the manufacturing process of butter

Mikroorganizmi / <i>Microorganism</i>	Rezultat / <i>Results*</i>
Broj aerobnih mezofilnih bakterija u 1 ml / <i>The number of aerobic mesophilic bacteria in 1 ml</i>	5
Sulfitoredujuće klostridije u 100 ml / <i>Sulphate-reducing clostridia in 100 ml</i>	0
<i>Proteus</i> u 100 ml / <i>Proteus in 100 ml</i>	0
Broj koliformnih bakterija u 100 ml / <i>Number of coliform bacteria in 100 ml</i>	0
Koliformne bakterije fekalnog porekla / <i>Origin of fecal coliform bacteria</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> u 100 ml / <i>Pseudomonas aeruginosa in 100 ml</i>	0
Streptokoke fekalnog porekla u 100 ml / <i>Faecal streptococci in 100 ml</i>	0

Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / *Shown results are mean value of three repetitions*
 0 – nije utvrđeno prisustvo / *not determined the presence*

Tabela 2. Rezultati ispitivanja fizičko-hemijskih parametara vode koja se koristi tokom procesa proizvodnje maslaca

Table 2. Results of the research of physical-chemical parameters of water used during the manufacturing process of butter

Fizičko-hemijski pokazatelji / <i>Physical and chemical indicators</i>	Rezultat* / <i>Results</i>	Referentna vrednost / <i>The reference value</i>
Slobodni rezidualni hlor / <i>Free residual chlorine, mg/l</i>	0,2	0,5
Mutnoća nefelometrijski / <i>Turbidity, NTU</i>	0,87	5,0
pH	7,40	6,8-8,5
Amonijak / <i>Ammonia, mg/l</i>	0,83	1
Hloridi / <i>Chlorides, mg/l</i>	6,57	200
Nitriti / <i>Nitrites, mg/l</i>	<0,001	0,03
Nitrati / <i>Nitrates, mg/l</i>	0,20	50
Gvožđe / <i>Iron, mg/l</i>	0,13	0,3
Arsen / <i>Arsenic, mg/l</i>	0,007	0,01
Mangan / <i>Manganese, mg/l</i>	0,016	0,05

*Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / *Shown results are mean value of three repetitions*

Rezultati ispitivanja, prikazani u tabeli 3 ukazuju na to da je mikrobiološki status briseva uzetih sa pojedinih delova mašine za bućkanje bio zadovoljavajući na većini kontrolnih tačaka, izuzev mesta pod rednim brojem 6. i 8, kod kojih je utvrđen povećan broj mezofilnih bakterija. Na tim mestima je uočen sličan efekat i primenom brzog testa, gde su utvrđene granične vrednosti bile na nivou od 2,5.

Tabela 3. Rezultati ispitivanja briseva uzetih sa različitih kontaktnih površina mašine za bućkanja maslaca /
Table 3. Results of the research swabs taken from contact surfaces of different machines churning butter

Mikroorganizmi / Microorganism	Ukupan broj mikroorganizama/cm ² * / The total number of microorganism/cm ²										
	1**	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ukupan broj mezofilnih bakterija / The total number of mesophilic bacteria	Ø	10	Ø	30	Ø	10	0	80	Ø	Ø	10
Aerobne mezofilne bakterije/ Aerobic mesophilic bacteria	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	95	10	70	Ø	Ø	30
Aerobne mezofilne sporogene bakterije / Aerobic mesophilic spore bacteria	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	10	Ø	20
Salmonella spp.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Escherichia coli	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Sulfitoredukujuće klostridije / Sulphate-reducing clostridia	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Koagulaza pozitivne stafilokoke / Coagulase-positive staphylococci	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Listeria spp.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Enterobacteriaceae	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Kvasci / Yeast	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Plesni / Molds	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Brzi test, ATP / Rapid test, ATP	2,1	2,2	2,1	1,8	2,0	2,5	1,9	2,5	2,3	1,9	2,2

*Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / Shown results are mean value of three repetitions

Ø – nije utvrđeno prisustvo / Not determined the presence

**Mesta uzorkovanja / Place of sampling: 1 - Izlaz iz buka / Exit from the buk; 2 - Cilindar 2 / Cylinder 2; 3 - Lopatice 2 / Scoops 2; 4 - Cev za dovod pavlake dole / Inlet pipe for cream down; 5 - Cev za dovod pavlake gore / Inlet pipe for cream upwards; 6 - Cev za dovod pavlake sredina / Inlet pipe for cream middle; 7 - Cilindar 1 / Cylinder 1; 8 - Lopatice 1 / Scoops 1; 9 - Slavina zrijača / Tap of; 10 - Unutrašnja folija za rinfuz maslac 1 / Inside membrane for butter 1; 11 - Unutrašnja folija za rinfuz maslac 2 / Inside membrane for butter 2

Tabela 4. Rezultati ispitivanja briseva uzetih sa različitih kontaktnih površina mašina za pakovanje 125 g maslaca /
Table 4. Results of the research swabs taken from contact surfaces of different machines for packing 125-g butter

Mikroorganizmi / Microorganism	Ukupan broj mikroorganizama /cm ² * / The total number of microorganism / cm ²										
	1**	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ukupan broj mezofilnih bakterija / The total number of mesophilic bacteria	20	0	10	10	20	50	0	10	0	0	0
Aerobne mezofilne bakterije / Aerobic mesophilic bacteria	20	10	70	50	0	90	10	0	10	20	0
Aerobne mezofilne sporogene bakterije / Aerobic mesophilic spore bacteria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salmonella spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Escherichia coli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sulfitoredujuće klostridije / Sulphate-reducing clostridia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Koagulaza pozitivne stafilocoke / Coagulase-positive staphylococci	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Listeria spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enterobacteriaceae	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
Kvasci / Yeast	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Plesni / Molds	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brzi test, ATP / Rapid test, ATP	2,2	2,1	1,8	2,4	2,2	1,9	2,0	1,8	2,2	1,9	2,2

*Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / Shown results are mean value of three repetitions

0 – nije utvrđeno prisustvo/not determined the presence

** Mesta uzorkovanja / Place of sampling: 1 - Puž / Snail; 2 - Dozator / Dispenser; 3 - Valjak / Roller; 4 - Korito za prijem maslaca - zadnji deo / Container for receiving butter - the back of; 5 - Korito za prijem maslaca - prednji deo / Container for receiving butter - the front part; 6 - Izlaz maslaca - tunel / The output of butter - Tunnel; 7 - Kalup za foliju 1 / The mold for the foil 1; 8 - Nož za sečenje folije / Knife for cutting foil; 9 - Kalup za foliju / The mold for the foil 2; 10 - Nož za sečenje maslaca / Knife for cutting butter; 11 - Folija za maslac / Foil for butter

Nešto lošija situacija je bila kod uzoraka briseva uzetih sa mašine za pakovanje maslaca od 125 g, gde je, pored povećanog broja mezofilnih bakterija, utvrđeno i prisustvo bakterija familije *Enterobacteriaceae* (4 cfu/cm²). Ispitivana površina (korito za prijem maslaca na mašini za pakovanje 125 g maslaca), jeste neravna, sa dosta izbočina i krivina, što može predstavljati jedan od glavnih razloga zbog čega se proces pranja i dezinfekcije ne odvija uvek na zadovoljavajućem nivou. S toga se na takve površine mora obratiti posebna pažnja prilikom procesa pranja, jer ukoliko su navedene površine higijenski neispravne, može doći do kontaminacije maslaca za vreme pakovanja, a time i do njegove mikrobiološke neispravnosti.

Tabela 5. Rezultati ispitivanja briseva uzetih sa radne odeće i ruku radnika tokom procesa proizvodnje maslaca /
Table 5. Results of the research swabs taken from the work clothes and hands of workers during the manufacturing process of butter

Mikroorganizmi / <i>Microorganism</i>	Ukupan broj mikroorganizama*/cm ² / <i>The total number of microorganism/cm²</i>					
	1**	2	3	4	5	6
Ukupan broj mezofilnih bakterija / <i>The total number of mesophilic bacteria</i>	10	10	0	40	10	20
Aerobne mezofilne bakterije / <i>Aerobic mesophilic bacteria</i>	0	0	40	60	30	0
Aerobne mezofilne sporogene bakterije / <i>Aerobic mesophilic spore bacteria</i>	20	10	0	0	0	20
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0
Sulfitoredujuće klostridije / <i>Sulphate-reducing clostridia</i>	0	0	0	0	0	0
Koagulaza pozit.stafilokoke / <i>Coagulase-positive staphylococci</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Listeria</i> spp.	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	0	0	0	0	0	0
Kvasci / <i>Yeast</i>	0	0	0	0	0	0
Plesni / <i>Molds</i>	0	0	0	0	0	0
Brzi test, ATP / <i>Rapid test, ATP</i>	2,0	2,2	2,1	1,8	2,0	2,0

*Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / *Shown results are mean value of three repetitions*

0 – nije utvrđeno prisustvo / *not determined the presence*

**Mesta uzorkovanja / *Place of sampling*: 1- Ruka radnika na bućkanju maslaca tj., rukavica / *Hand of workers on churning butter, ie., gloves*; 2 - Keclja radnika na bućkanju maslaca / *Apron of workers on churning butter*; 3 i 4 - Ruke radnika na pakovanju 125 g maslaca / *The hands of workers on the packaging 125 g butter*; 5 i 6 - Keclje radnika na pakovanju 125 g maslaca / *Apron of workers on the packaging 125 g butter*.

Rezultati ispitivanja higijenske ispravnosti briseva ruku i odeće radnika (gumene kecelje) za vreme procesa bućkanja i pakovanja maslaca prikazani su u tabeli 5. Rezultati klasičnog mikrobiološkog načina ispitivanja briseva pokazuju da se ukupan broj mezofilnih bakterija kretao od 10 do 40 cfu/cm². Rezultati briseva ruku radnika, koji su učestvovali u procesu slaganja maslaca u celofan, kao i na pakovanju maslaca u kartonske kutije, pokazuju izvesno prisustvo aerobnih mezofilnih sporogenih bakterija (20 cfu/cm²), dok prisustvo patogenih mikroorganizama nije utvrđeno.

Maslac koji je namenjen tržištu, tj. prodaji, pakuje se od blok-maslaca. Naime, nakon pakovanja i skladištenja u hladnjači na temperaturi do 8°C blok-maslac se dalje koristi za pakovanje maslaca u manje ambalažne jedinice, ukoliko zadovoljava sve mikrobiološke i hemijske standarde. Trajnost maslaca (u domaćinstvu) predviđena je na oko dve nedelje, ukoliko se čuva pri temperaturi koja ne dopušta brzo razmnožavanje mikroorganizama i ako je zaklonjen od uticaja svetlosti (Stojanović i Katić, 1998). Za odloženu upotrebu blok-maslac se čuva u zamrznutom stanju na temperaturi ispod -18°C u velikim paketima, dobro zaklonjen od uticaja svetla. Rezultati ispitivanja mikrobiološke ispravnosti maslaca u različitim pakovanjima (blok maslac od 20 kg i maslac pakovan u jedinice od 125 g), za vreme njegovog skladištenja na temperaturi od 6°C, prikazani su u tabelama 6 i 7.

Tabela 6. Rezultati ispitivanja mikrobioloških parametara uzoraka blok-maslaca ispitivanih tokom procesa skladištenja

Table 6. Results of the research of samples of microbiological parameters block of butter investigated during the storage – shelf life products

Mikroorganizmi / <i>Microorganism</i>	Vreme skladištenja (dani)* / <i>Storage time (days)</i>						
	1.	10.	20.	30.	40.	50.	60.
Aerobni mezofilni mikroorganiz. u 1g / <i>The total number of microorganisms in 1 g</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2500	8000
Lipolitičke bakterije u 1g / <i>Lipolytic bacteria in 1 g</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	9	98
<i>Salmonella</i> spp. u 25g / <i>in 25 g</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
<i>Escherichia coli</i> u 0,1g / <i>in 0.1 g</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Sulfitoredujuće klostridije u 0,1 g / <i>Sulphate-reducing clostridia in 0.1 g</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Koagulaza poz. stafilokoke u 0,1 g / <i>Coagulase positive staphylococci in 0,1 g</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
<i>Listeria</i> spp. u 25 g / <i>in 25 g</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
<i>Enterobacteriaceae</i> u 1g / <i>in 1 g</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2	6
Kvasci u 1 g / <i>Yeast in 1 g</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Plesni u 1 g / <i>Molds in 1 g</i>	Ø	Ø	Ø	Ø	3	11	22

*Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / *Shown results are mean value of three repetitions*
Ø – nije utvrđeno prisustvo / *not determined the presence*

Rezultati ispitivanja mikrobioloških parametara uzoraka maslaca, tokom procesa skladištenja na temperaturama od 6° C (lager test), pokazuju visok mikrobiološki kvalitet (tabele 6 i 7). U analiziranim uzorcima maslaca nije utvrđeno prisustvo patogenih bakterija niti bakterija kvara, što ukazuje na dobru proizvodnu i higijensku praksu koja se primenjuje tokom procesa proizvodnje. Rezultat toga je nastanak zdravstveno-bezbednog proizvoda.

S druge strane, u uzorcima maslaca od 125 g (tabela 7) utvrđen je veoma mali broj lipolitičkih bakterija u periodu između 30. i 40. dana skladištenja (2-11 cfu/g), dok kod uzoraka blok-maslaca, u navedenom periodu ispitivanja, nije utvrđeno prisustvo lipolitičkih bakterija. Do znatnog povećanja, kako ukupnog broja mikroorganizama, tako i lipolitičkih bakterija, dolazilo je u periodu nakon 40. dana skladištenja i on je najizraženiji u uzorcima maslaca od 125 g. Primera radi, ukupan broj mikroorganizama kretao se od 80 cfu/g do 12×10^3 cfu/g, što je bilo u direktnoj korelaciji sa utvrđenim brojem mezofilnih bakterija kao i bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* (do 4 cfu/cm²), koji su utvrđeni u uzorcima briseva uzetih sa površine mašine za pakovanje 125 g maslaca.

Tabela 7. Rezultati ispitivanja mikrobioloških parametara uzoraka 125 g maslaca ispitivanih tokom procesa skladištenja

Table 7. Results of the research of microbiological parameters of the samples 125-g butter examined during the storage – shelf life products

Mikroorganizmi / <i>Microorganism</i>	Vreme skladištenja (dani)* / <i>Storage time (days)</i>						
	1.	10.	20.	30.	40.	50.	60.
Aerobni mezofilni mikroorganiz. u 1g / <i>The total number of microorganisms in 1 g</i>	ø	ø	ø	2	80	4000	12000
Lipolitičke bakterije u 1g / <i>Lipolytic bacteria in 1 g</i>	ø	ø	ø	2	11	28	73
<i>Salmonella</i> spp. u 25g / <i>in 25 g</i>	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
<i>Escherichia coli</i> u 0,1g / <i>in 0.1 g</i>	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
Sulfitoredujuće klostridije u 0,1 g / <i>Sulphate-reducing clostridia in 0.1 g</i>	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
Koagulaza poz. stafilokoke u 0,1 g / <i>Coagulase positive staphylococci in 0.1 g</i>	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø
<i>Listeria</i> spp. u 25 g / <i>in 25 g</i>	ø	ø	ø	1	1	8	12
<i>Enterobacteriaceae</i> u 1g / <i>in 1 g</i>	ø	ø	ø	ø	ø	2	6
Kvasci u 1 g / <i>Yeast in 1 g</i>	ø	ø	ø	ø	ø	1	2
Plesni u 1 g / <i>Molds in 1 g</i>	ø	ø	ø	4	15	52	89

*Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / *Shown results are mean value of three repetitions*

ø – nije utvrđeno prisustvo / *not determined the presence*

Mikrobiološkim ispitivanjem uzoraka maslaca tokom procesa skladištenja nije utvrđeno prisustvo patogenih bakterija. Povećani broj aerobnih me-

zofilnih bakterija u skladištenih 125 g maslaca u odnosu na blok-maslac posledica je, pre svega, mnogobrojnih manipulativnih radnji koje se obavljaju pre i tokom procesa pakovanja. Ovi postupci imaju za posledicu povećanje broja mikroorganizama, kao i prisustvo pojedinih grupa mikroorganizama, za razliku od blok-maslaca koji se posle procesa bućkanja odmah skladišti u hladnjači na temperaturi do 6° C. Najveći broj kolonija plesni (89 cfu/g) utvrđen je kod maslaca u pakovanju od 125 g, 60. dana skladištenja, dok je kod uzoraka blok-maslaca taj broj bio manji i iznosio je 22 cfu/g. Ovakav mikološki profil upakovanog maslaca, u velikoj meri, rezultat je prisustva mikroorganizama u neposrednoj okolini, spoljnoj sredini, kako na mašinama za pakovanje, ruku radnika i dr., tako i u prostorijama za pakovanje, što dovodi do njihove direktne inkorporacije u finalni proizvod.

Diskusija / Discussion

Kontaminacija mleka patogenim mikroorganizmima nastaje, primarno, iz inficirane mlečne žlezde, ali i sekundarno, kontaktom sa površinama tokom procesa muže, obrade i prerade mleka. S druge strane, mikroorganizmi u proizvode od mleka mogu dospeti kao rezultat rekontaminacije sa opreme koja se neadekvatno održava čemu, naročito, pogoduje povećana vlažnost u pogonima za preradu mleka.

U ispitivanim uzorcima briseva nije utvrđeno prisustvo bakterija iz roda *Listeria*. Dobijeni rezultati su veoma značajni sa zdravstvenog aspekta, s obzirom na činjenicu da je ovaj mikroorganizam uzročnik ozbiljnog oboljenja ljudi koji se prenosi hranom, kao i da je široko rasprostranjen u prirodi, naročito na opremi koja se koristi u industriji mleka (Voysey, 2007). Inače, oprema se smatra jednim od ozbiljnih izvora sekundarne kontaminacije namirnica ovom bakterijom (Milanov i sar., 2009). Perzistencija se, između ostalog, dovodi u vezu sa sposobnošću ovih mikroorganizama da formiraju biofilme, sami ili u zajednici sa drugim bakterijskim vrstama koje su uobičajeno prisutne na mestima proizvodnje hrane (Moretto i Langsrud, 2004). Poznato je da biofilmovi predstavljaju dugotrajne izvore kontaminacije namirnica, jer uklopljene bakterije postaju znatno otpornije na efekat dezinfekcionih sredstava (Dequeiroz i Day, 2007). Svi materijali koji se uobičajeno koriste u prehrambenoj industriji, kao što su nerđajući čelik, aluminijum, staklo, fluorisani polimeri i dr., mogu biti supstrati za razvoj bakterijskih polimera.

Pravi efekti pranja i dezinfekcije opreme i mašina koje se koriste u proizvodnim pogonima industrije mleka, kao i ukupne higijene proizvodnog procesa, procenjuju se na osnovu mikrobiološke ispravnosti poluproizvoda, a naročito finalnih, gotovih, upakovanih proizvoda.

U Švedskoj je publikovano nekoliko standarda i uputstava o prihvatljivom nivou kontaminacije površina mikroorganizmima (Swedish Code of Statute SLVSFS, 1998). Na osnovu tih standarda propisano je da je nivo kontaminacije

površine prihvatljiv ako je dokazano manje od 1 cfu/cm². Nadalje, površina se smatra čistom ako je utvrđeno 1–3 cfu/cm² i prihvata se kao upozorenje, a ukoliko se utvrdi više od 3 cfu/cm², ocenjuje se kao nivo kontaminacije koji nije prihvatljiv za čistu površinu. U Evropskoj uniji nacionalne preporuke su da se kontaktne površine ocenjuju kao prihvatljive, ukoliko se ukupan broj bakterija kreće 0–10 cfu/cm², a broj *Enterobacteriaceae* 0–1 cfu/cm². Površine na kojima je ukupan broj bakterija i broj *Enterobacteriaceae* iznad tih vrednosti ocenjuju se kao neprihvatljive. Prema uputstvu nadležnih organa u SAD, takođe, se smatra da su adekvatno oprane i dezinfikovane površine one kod kojih ukupan broj mikroorganizama po kvadratnom decimetru površine nije veći od 1000, što je ekvivalentno 10 cfu/cm².

U istraživanjima pojedinih autora (Wit, 1985), kada je u pitanju higijena ruku osoblja koje radi u mlekarskoj industriji u Holandiji, u 19% slučajeva izolovana je *E. coli*, dok je kod 54% ispitanih radnika utvrđeno prisustvo *Staphylococcus aureus* kao najčešći kontaminant ruku. Takođe, logaritamska srednja vrednost prisutnih aerobnih mezofilnih bakterija i *Enterobacteriaceae* iznosila je 5,97 cfu/cm² i 1,98 cfu/cm², aproksimalno. U svetlu primene HACCP principa, u mlekarama treba da postoje detaljno razvijene i uvedene procedure koje osiguravaju efikasnost procesa pranja odeće i lične higijene radnika (John, 2000; Obradović, 2008). Zasnivano na proceni rizika, sve mlekare koje imaju uvedene standarde (ISO 9001, HACCP i dr.) treba da imaju dokumentovana i prosleđena uputstva, kako svojim zaposlenima, tako i ugovaračima i posetiocima, koja se odnose na nošenje i primenu zaštitne odeće u specifičnim radnim prostorima (Ronald, 2003).

Poznato je da, tokom perioda skladištenja maslaca, a u zavisnosti od brojnih unutrašnjih i spoljašnjih faktora, dolazi do razmnožavanja mikroorganizama. Najčešće, mikroorganizmi se razmnožavaju po površini maslaca, mada se mogu razmnožavati i u njegovoj unutrašnjosti. *Pseudomonas putrefaciens* može rasti na površini maslaca na temperaturi od 4° do 7°C i nakon 7 – 10 dana prouzrokovati miris karakterističan za trulež (Munsch-Alatossava i sar., 2005). Razmnožavanje mikroorganizama u maslacu omogućava voda, u kojoj se nalaze mlečni šećer, organske kiseline, neorganske materije i druga jedinjenja koje mikroorganizmi mogu upotrebiti kao hranu (ICMSF, 2005). Prilikom ispitivanja mikrobioloških procesa u maslacu, različitih proizvođača, tokom perioda skladištenja pri temperaturama hlađenja, Simonović (1986) navodi da se ukupan broj mikroorganizama i lipolitičkih bakterija uvećava, već, posle 15 dana, dok je porast broja bakterija izražen nakon 22. dana, i to $5,6 \times 10^5$ za ukupan broj mikroorganizama i 40–60 kolonija lipolitičkih bakterija u 1 g maslaca. Broj lipolitičkih bakterija je posle 30 dana skladištenja na temperaturi od 4° C bio uvećan na 400–600 cfu/g. Isti autor navodi da broj lipolitičkih bakterija uporedno raste sa povećanjem ukupnog broja mikroorganizama.

Ispitujući efekat različitih temperatura skladištenja (-12°, 2°, 8° i 12°C) kao i prisustvo soli na mikrobiološke promene kod 5 različitih tipova maslaca,

Jensen i sar., (1983) navode da niže temperature skladištenja i prisustvo soli imaju značajan uticaj na redukciju ukupnog broja mikroorganizama, coli bakterija i kvasaca u odnosu na njihov broj utvrđen u maslacu skladištenom na višim temperaturama.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata dobijenih u toku ovih ispitivanja, a koji se odnose na utvrđivanje uticaja higijensko-sanitarnih mera, kao i kritičnih tačaka u tehnološkom procesu proizvodnje maslaca, na kvalitet i mikrobiološku ispravnost gotovog proizvoda, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Rezultati higijenske ispravnosti briseva uzetih sa mašine za pakovanje maslaca od 125 g, nakon sanitacije, pokazuju povećan broj mezofilnih bakterija (do 90 cfu/cm²), kao i prisustvo bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* (4 cfu/cm²).

- Na bisevima ruku radnika koji su učestvovali u procesima slaganja maslaca u ambalažni materijal, kao i na poziciji pakovanja maslaca, utvrđeno je prisustvo aerobnih mezofilnih sporogenih bakterija (20 cfu/cm²). U ispitivanim uzorcima briseva uzetih sa površine ruku i odeće radnika nije utvrđeno prisustvo patogenih mikroorganizama.

- Uzorci maslaca pakovani u porcije od 125 g predstavljaju rizičnije oblike komercijalnih pakovanja u odnosu na blok maslac, što je posledica raznih manipulativnih radnji koje se obavljaju pre i za vreme procesa pakovanja. Takođe, utvrđeno prisustvo pojedinih mikroorganizama u upakovanom maslacu nakon određenog perioda roka upotrebe (aerobni mezofilni mikroorganizmi, lipolitičke bakterije kao i plesni) u velikoj meri potiče od prisustva datih mikroorganizama u spoljnoj sredini (oprema, radne površine, ambijent), što ima direktnog uticaja na njihovu inkorporaciju u sam proizvod.

Dobijeni rezultati istraživanja ukazuju na potrebu da se prilikom procesa proizvodnje maslaca mora obratiti posebna pažnja na ispunjenost higijensko-sanitarnih uslova tokom samog proizvodnog procesa, što pre svega podrazumeva adekvatno pranje i dezinfekciju opreme, odgovarajući temperaturni režim pasterizacije pavlake i sl., kao i besprekornu higijenu radnika uključenih u proizvodni proces.

ZAHVALNICA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rezultati ovog rada su deo Projekta III, br. 46009: „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji stočne hrane sa ciljem proizvodnje visokokvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na globalnom tržištu“, finansiran od strane Ministarstva za nauku Republike Srbije. /

The results in this work are part of Project III, No. 46009: "Promotion and development of hygiene and technological procedures in cattle feed production aimed at the production of high quality and safe products competitive on the global market", financed by the Ministry for Science of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Delacroix-Buchnet A. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; 70: 5644-50.
2. Desmarcheller P, Fegan N. *Escherichia coli*. Encyclopedia of Dairy Science, Vol. 4. Edited by Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P. Academic Press, 2002: 948-54.
3. Dequeiroz GA, Day DF. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 794-802.
4. EC Directive 92/46. A Guide to the Dairy Products (Hygiene) Regulations for Dairy Product Processors. The Regulations implements the EC Directives on milk hygiene. The Ministry of Agriculture, Fisheries & Food (MAFF).
5. Frank JF, Hassan AN. Microorganisms associated with milk. Encyclopedia of Dairy Science, Vol. 3, Edited by Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., Academic Press, 2002: 1786-95.
6. ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs, 2004
7. ISO 11290-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* Part 2: Enumeration method, 2004.
8. ISO 15213. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions, 2003.
9. ISO 6888-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium, 2008.
10. ISO 16649-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide, 2009.
11. ISO 21527-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -- Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95, 2008
12. ICMSF. Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities (Microorganisms in Foods). 2nd Ed. March, 2005.
13. Jensen H, Denmark H, Mogensen G. Effect of storage temperature on microbiological changes in different types of butter. *Milchwissenschaft* 1983; 38(8): 482-4.
14. John M. Hand hygiene: Washing and disinfection. *J Can Dent Assoc* 2000; 66: 546-7.
15. Mercadé-Prieto R, Paterson, WR, Wilson DI. The science of cleaning of dairy fouling layers, Fouling and Cleaning of Heat Exchangers VII, Tomar., 2007.
16. Milanov D, Ašanin R, Vidić B, Katić V, Plavša N. Examination of the capabilities of attachment and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *Biotechnology in Animal Husbandry* 2009; 25(5-6): 1255-65.
17. Moretro T, Langsrud, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 2004; 1: 107-21.
18. Munsch-Alatossava P, Alatossava T. Phenotypic characterization of raw milk associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol Res* 2005; 161: 334-46.

19. Obradović D. Osnovni principi sanitacije pogona-preduslov za HACCP. Prehrambena industrija 2008; 19(1-2): 10-1.
20. Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće. „Sl. list SRJ“ br. 42/1998.
21. Pravilnik o metodama vršenja mikrobioloških analiza i superanaliza životnih namirnica. „Sl. list SFRJ“, br. 25/80.
22. Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa („Sl. glasnik RS“, br. 72/2010).
23. Randolph H. Identifying spoilage bacteria and potential shelf- life problems. Dairy Food, Find Article, 2006; 1-3.
24. Rakić-Martinez M, Katić V. Ispitivanje mogućnosti primene preparata na bazi hlordioksida za dezinfekciju u pogonima za preradu mleka. Vet. glasnik 2009; 63(1-2): 87-101.
25. Simonović J. Mikrobiološki procesi u maslacu tokom čuvanja pri temperatirama hlađenja i smrzavanja. Specijalistički rad. Veterinarski fakultet, Beograd, 1986.
26. SRPS EN ISO 4833:2008 - Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama - Tehnika brojanja kolonija na 30° C, 2008.
27. SRPS EN ISO 6579. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp., 2002.
28. SRPS EN ISO 21528-1:2009 - Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae* - Deo 1: Otkrivanje i određivanje broja MPN tehnikom sa predobogaćenjem, 2009.
29. Swedish Code of Statute SLVSFS, No.10, 1998.
30. Voysey PA, Anslow PA, Lavender B, Bridgwater KJ, Watson L. Investigate the impact of butter production on growth of *L. Monocytogenes*. CCFRA, B12007, Final Report. London, 2007.
31. Wit JC. The importance of hand hygiene in contamination of foods. Antonie van Leeuwenhoek 1985; 51: 523-7.
32. Wilson DI. Challenges in cleaning: recent developments and future prospects. Heat Transfer Engineering 2005; 26(1): 51-9.

ENGLISH

EFFECTS OF HYGIENE-SANITARY MEASURES ON MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FINISHED PRODUCT IN BUTTER PRODUCTION PLANT

N. Memiši, Marija Škrinjar, Slavica Vesković Moračanin

This work presents the results of investigations of the effects of hygiene-sanitary measures at critical points in the technological process of butter production on its quality and microbiological safety. With this object in mind, hygiene safety was checked using the swab method at the machine for churning and packing butter (125 g packages and bulk butter), the equipment, hands and clothing (work aprons) of employees directly engaged on the machines. The evaluation of the safety parameters, as well as of the hygiene of the production process itself, was carried out in keeping with the Regulations on general and special conditions of food hygiene at any stage of production, processing and trade (RS Official Gazette, No.72/2010).

The results of the hygiene safety of swabs taken from the 125g-butter packing machine, after sanitation, showed an increased number of mesophilic bacteria (up to 90 cfu/cm²), as well as the presence of bacteria from the Family *Enterobacteriaceae* (4 cfu/cm²).

The results of swabs taken from the hands of workers engaged on the line for wrapping the butter following the churning process and on the packing line reveal the presence of aerobic mesophilic sporogenic bacteria (20 cfu/cm²), while the presence of pathogenic microorganisms was not established.

Butter samples packed into 125g portions present more risky forms of commercial packaging than bulk butter, which is a consequence of various handling activities and additional outside contamination that takes place during the production process if continuous production in the plant has not been ensured. Moreover, the established presence of certain microorganisms (aerobic mesophilic microorganisms, lipolytic bacteria, as well as fungi) in packed butter during its shelf life, is largely a result of outside contamination and the hygienic condition of the equipment.

The obtained results of the investigations indicate the need for special attention to be paid during the butter production process on meeting the hygiene-sanitary conditions during the production process itself, which primarily implies adequate washing and disinfecting of the equipment, the required temperature regimen for the pasteurization of the cream and similar activities, as well as the immaculate hygiene of the workers engaged in the production process.

Key words: butter, microbiological safety, surface hygiene, product sustainability

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОВ ГИГИЕНИЧЕСКО-САНИТАРНЫХ МЕР В ЦЕХЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МАСЛА НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ИСПРАВНОСТЬ ФИНАЛЬНОГО ПРОДУКТА

Н. Мемиши, Мария Шкриняр, Славица Вескович Морачанин

В этой работе показаны результаты испытания влияния гигиеническо-санитарных мер на критических точках в технологическом процессе производства масла на его качество и микробиологическую исправность. С этой целью совершен контроль гигиенической исправности машины для сбивания и упаковки масла (от 125 г и "блок масла") затем оборудования, рук и одежды (рабочие фартуки) рабочих, которые непосредственно работают на машинах, методом мазков. Оценка параметров безопасности, словно и гигиены самого производственного процесса совершена в соответствии с Инструкцией о общих и отдельных условиях гигиены корма в которой-либо фазе производства, переработки и оборота ("Сл. гласник РС, Но 72/2010).

Результаты гигиенической исправности мазков, взятых с машины для упаковки масла от 125 г. после санации, показывают увеличенное число мезофильных бактерий (до 90 цфу/см²), словно и присутствие бактерий из семейства *Enterobacteriaceae* (4 цфу/см²).

Результаты мазков рук рабочих, на линии складывания масла, после процесса сбивания, в упаковочный материал, словно и на линии упаковки, показы-

вают присутствие аэробных мезофильных спорогенных бактерий (20 цфу/см^2), пока присутствие патогенных микроорганизмов не утверждено.

Образчики масла упакованы в 125-граммовые порции представляют собой более рискованные формы коммерческой упаковки в отношении масла в блоке ("блок масло"), что вследствие разных манипулятивных действий и дополнительные внешние контаминации, случаемая в течение производственного процесса, насколько в цехе не обеспечено непрерывное производство. Также, утверждено присутствие некоторых микроорганизмов (аэробные мезофильные микроорганизмы, липолитические бактерии, плесень и плесни) в упакованном масле, в течение срока продолжительности, в большой мере результат внешней контаминации и гигиенического состояния оборудования.

Полученные результаты исследования указывают на нужду, что при возможности процесса производства масла должно быть обратить отдельное внимание на выполнённость гигиеническо-санитарных условий в течение самого производственного процесса, что прежде всего подразумевает адекватную стирку и дезинфекцию оборудования, соответствующий температурный режим пастеризации сливок и т.п. словно и безупречную гигиену рабочих, включенных в производственный процесс.

Ключевые слова: масло, микробиологическая исправность, гигиена поверхностей, соержанность продуктов

UTICAJ SEZONE NA POJAVU PIOMETRE KOD KUJA* *SEASONAL EFFECTS ON APPEARANCE OF PYOMETRA IN BITCHES*

I. Stančić, O. Stevančević, Jelena Stančić, I. Apić**

Piometra je jedno od najčešćih i vrlo ozbiljnih oboljenja reproduktivnog sistema kuje. Javlja se oko 30 do 60 dana posle zadnjeg estrusa, kod kuja koje nisu gravidne. Kuje starije od 5 godina imaju značajno veću predispoziciju za obolevanje od mlađih kuja. Postoje i razlike između pojedinih rasa, u starosti kuja kod pojave piometre. Cilj ovog rada je bio da se ustanovi da li postoji i uticaj godišnje sezone na učestalost manifestacije piometre kod kuja na području Vojvodine. Ispitana je pojava piometre kod ukupno 318 kuja, tokom dve godine, u različitim godišnjim sezonama. Ustanovljeno je da statistički značajno veći broj kuja ($p < 0,05$) oboleva tokom sezone septembar–novembar (31%) i decembar-februar (28%) u odnosu na sezonu mart-maj (19%) i juni–avgust (22%). Dobijeni podaci mogu poslužiti za bolju preventivu i blagovremenu dijagnostiku piometre kod kuja.

Ključne reči: piometra, učestalost, sezona, kuja.

Uvod / Introduction

Prema rezultatima istraživanja brojnih autora koje je sumirao Foster (2007), ali i na osnovu praktičnih iskustava, različita oboljenja reproduktivnog sistema i poremećaji reprodukcije, predstavljaju jedan od najčešćih razloga za intervenciju u kliničkoj veterinarskoj praksi.

Piometra (purulentni diestralni endometritis) je vrlo često i ozbiljno oboljenje reproduktivnog sistema kuje. Tako, Egenvall i sar. (2001) navode da je u Švedskoj tokom 1995. i 1996. godine, od ukupno 200.000 evidentiranih kuja, od piometre obolelo i bilo lečeno 23%, donosno 24% kuja. Prema novodima ovih, kao i drugih autora, piometra je oboljenje koje, pored veterinarsko-medicinskog, ima i veliki zootehnološki, naučno-istraživački, ekonomski i humanitarni značaj.

* Rad primljen za štampu 24. 12. 2010. godine

** Dr sci. vet. med. Ivan Stančić, docent, M. Sc. vet. med. Ognjen Stevančević, asistent, Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija; M. Sc. vet. med. Jelena Stančić, istraživač pripravnik, Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad, Srbija; M. Sc. vet. med. Igor Apić, profesor, Poljoprivredna škola, Futog, Srbija

Zbog toga, postoji veliki broj razloga za permanentno istraživanje, lečenje i prevenciju ovog oboljenja, među kojima se ističu sledeći: (1) u nekim slučajevima, teško je klinički razlikovati piometru od cistične hiperplazije endometrijuma (Hagman i sar., 2006) i gravidnosti (Gaves, 2003), (2) piometra apsolutno utiče na reproduktivni potencijal kuje, što za posledicu ima trajni sterilitet (Kushwaha i sar., 2007), (3) piometra, vrlo često, dovodi do ozbiljnih poremećaja funkcije i drugih organskih sistema, kao što su disfunkcija bubrega (Heiene i sar., 2007) i septički šok (Okano i sar. 1998), koji su najčešći razlozi letalnog ishoda ovog oboljenja, (4) nije potpuno jasno da li postoji genetska predispozicija za pojavu ovog oboljenja kod različitih rasa ili kod pojedinih individua unutar iste rase (Smith, 2006), (5) važan uticaj na učestalost pojave piometre ima i starost kuje, kao i njen reproduktivni status (Niskanen i sar., 1998; Fukuda, 2001; Smith, 2007), (5) Ekonomski značaj ovog oboljenja se ogleda u velikim troškovima lečenja i hospitalizacije životinja (Sevelius i sar., 1990; Egenvall i sar., 2001) i (6) dobro poznavanje patologije ovog oboljenja je potrebno i zbog adekvatne edukacija vlasnika pasa, kako bi oni, u okviru svojih mogućnosti, delovali preventivno tj. otklonili uzroke, koji mogu dovesti do pojave piometre (Miljković, 2000).

Izuzetan značaj piometre kod kuja, posebno za kliničku veterinarsku praksu, ilustruje i činjenica da postoji veliki broj naučno-istraživačkih i stručnih radova, pretežno inostranih autora, koji obrađuju različite aspekte ovog ozbiljnog oboljenja. Latentnost ovog oboljenja, zajedno sa oboljenjima u okviru diferencijalne dijagnoze kao npr. *Diabetes insipidus*, bubrežna insuficijencija, ascites, vulvo-vaginitis i dr. komplikuju dijagnostiku ovog oboljenja. Prvi simptomi ovog oboljenja govore u prilog pojave polidipsije kod kuja i upravo to može biti prvi alarm vlasnicima i veterinarima – pojačana potreba za vodom koja se javila baš u periodu godine koji nije topao. Kasniji simptomi, kao npr. otok abdomena, otežan hod, vaginalni iscedak i dr., već mogu jasnije ukazati na pojavu ovog oboljenja i uključiti primenu pomoćnih dijagnostičkih mera kao što su hematološka ispitivanja (leukocitoza) ili upotreba UZ dijagnostike zarad vizuelizacije prisutne patologije uterusa. Uticaj godišnje sezone, kao faktora etiopatogeneze piometre kod kuja nije u dovoljnoj meri objašnjen, a mogao bi doprineti efikasnijoj preventivi i pravovremenoj dijagnostici ovog značajnog reproduktivnog oboljenja kod kuja.

S tim u vezi, cilj ovog rada je bio da se prikažu rezultati naših istraživanja u vezi sa distribucijom pojave piometre kod kuja, na području Vojvodine, u zavisnosti od godišnje sezone.

Materijal i metode / *Material and methods*

Analizirani su podaci od ukupno 318 kuja, kod kojih su dijagnostikovani klinički znaci piometre, i to kod 115 kuja u veterinarskoj stanici „Novi Sad“, 103 kuje u veterinarskoj ambulani „Panvet“ u Subotici i 100 kuja u veterinarskoj stanici „Veterinar“ u Subotici, tokom dve godine. Dobijeni podaci su klasifikovani

prema pojedinim mesecima i godišnjim sezonama, kada je izvršena dijagnoza piometre.

Svi podaci su obrađeni i testirani kompjuterskim programom „Statistika, 7.1.“.

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Distribucija dijagnostikovane piometre, kod kuja tokom pojedinih meseci, unutar dve godine ispitivanja, prikazana je u tabeli 1 i na grafikonu 1.

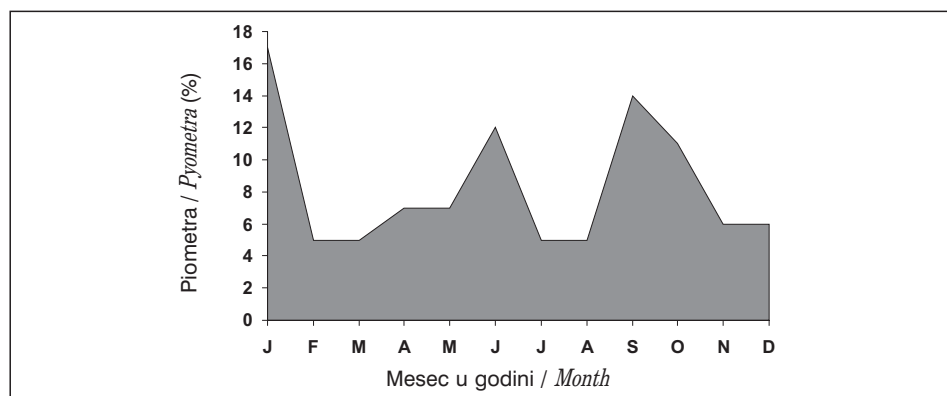
Tabela 1. Distribucija dijagnostikovane piometre u pojedinim mesecima godine /
Table 1. Distribution of diagnosed pyometra according to months

Kuje sa piometrom / Bitches with pyometra	Meseci u godini / Month												Ukupno / Total
	Jan. / Jan.	Feb. / Feb.	Mart / March	April / April	Maj / May	Juni / June	Juli / July	Avg. / Aug.	Sept. / Sept.	Okt. / Oct.	Nov. / Nov.	Dec. / Dec.	
N	54	16	16	22	22	38	16	16	45	35	19	19	318
%	17 ^a	5 ^b	5 ^b	7 ^b	7 ^b	12 ^a	5 ^b	5 ^b	14 ^a	11 ^a	6 ^b	6 ^b	100,0

^{a,b} Vrednosti sa različitim slovima se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$) /

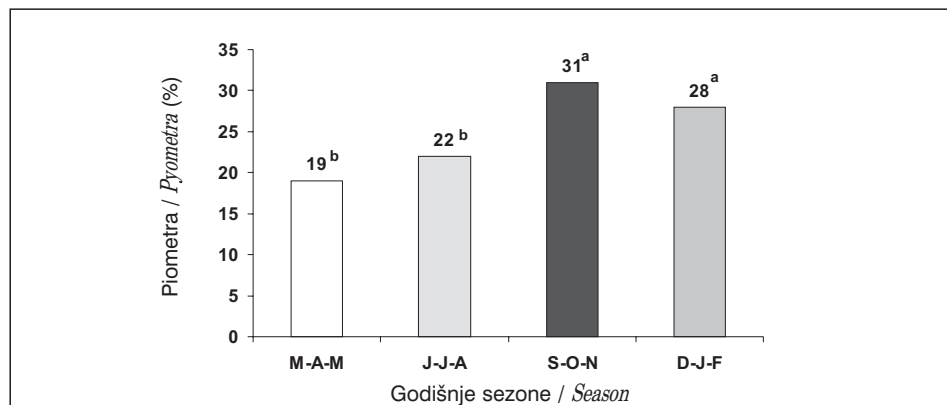
^{a,b} Values with different letters differ statistically significantly ($p < 0.05$)

Od ukupnog broja ispitivanih kuja, statistički značajno veći procent ($p < 0,05$) dijagnostikovanih piometri je ustanovljen kod kuja tokom januara (17%), juna (12%), septembra (14%) i oktobra (11%). U ostalim mesecima, ova vrednost je bila oko duplo manja i kretala se između 5% i 7% (tabela 1).



Grafikon 1. Distribucija dijagnostikovane piometre u pojedinim mesecima godine /
Graph 1. Distribution of diagnosed pyometra according to months

Posmatrajući po sezonama, tj. tromesečjima, učestalost piometre se stalno povećava od perioda mart – april (19%), do perioda septembar – novembar (31%), da bi se ova vrednost u periodu decembar – februar ponovo malo smanjila na 28% (grafikon 2). Iz prikazanih rezultata se vidi da je pojava piometre statistički značajno veća ($p < 0,05$) u periodu septembar – novembar i decembar – februar, u odnosu na period mart – maj i juni – avgust.



Grafikon 2. Distribucija dijagnostikovane piometre tokom pojedinih godišnjih sezona / Graph 2. Distribution of diagnosed pyometra according to seasons

Piometra je gnojna upala endometrijuma zbog koje mnoge genetski vredne kuje mogu ostati trajno sterilne (Jackson, 2007). Međutim, pravovremenom terapijom i adekvatnom negom posle terapije, dobar broj kuja može biti, ponovo, reproduktivno aktivan (Gaves, 2003). Ovo oboljenje se najčešće javlja kod starijih kuja koje se nisu nikada štenile (Blendinger i sar., 1991; Fukuda, 2001; Smith, 2007), ali se može javiti i kod mladih kuja kao posledica komplikacije kod carskog reza i prirodnog partusa, obično infektivne etiologije. Pored ove činjenice, danas se zna da je to, u osnovi, poremećaj endokrine etiologije, koji može ali i ne mora biti sekundarno praćen bakterijskom infekcijom i koji može izazvati ozbiljne poremećaje metabolizma, kao i funkcije nekih organskih sistema, posebno bubrega (Dawsom, 2006; Smith, 2007). Piometra, ne retko, može imati i letalan ishod, zbog čega je to veoma ozbiljno oboljenje u veterinarskoj praksi (Selinger, 2001).

Klinički simptomi piometre se, obično, javljaju 4 do 8 nedelja posle zadnjeg estrusa, ali se, izuzetno, mogu javiti i neposredno posle kraja estrusa ili 12 i više nedelja posle estrusa (Selinger, 2001). Intaktne (nulipare) kuje, koje se nikada nisu štenile, kao i kuje starije od 5 godina, imaju visoku predispoziciju za pojavu piometre (Chastain i sar., 1999). Tako, Fukuda (2001) navodi da se piometra najčešće javlja kod kuja starih 8 do 11 godina (prosečno 9 godina).

U veterinarskoj literaturi nema jedinstvenog mišljenja o naslednim predispozicijama za pojavu piometre kod pasa. Tako Gaves (2003) navodi da nema naslednog faktora za pojavu piometre, mada neki odgajivači i veterinar izjavljuju da zapažaju povećanu incidencu piometre kod nekih linija kuja, unutar iste rase. Neki drugi autori (Smith, 2006), međutim, navode da postoji povećan rizik od pojave piometre kod nekih rasa, kao što su: zlatni retriever, minijaturni šnauzer, irski terijer, rotvailer i neke druge. Egenvall i sar. (2001) navode da se frekvencija pojave piometre, kod kuja starih do 10 godina kreće između 10% i 54%, zavisno od rase. Rezultati nekih naših istraživanja (Staničić i sar., 2009) pokazuju da rasa kuja ima uticaja na njihovu starost kod pojave piometre. Tako su male rase (pekinezer, koker španiel i jazavičar) obolevale od piometre sa prosečno 10 godina, dok su kuje velikih rasa (nemački ovčar, rotvailer i šarplaninac) obolevale od piometre sa prosečno 7 godina starosti.

U literaturi ima relativno malo podataka o uticaju godišnje sezone na pojavu piometre kod kuja. Ipak, istraživanja koja su izveli Laurusevičius i sar. (2009) pokazuju da se najveći broj kuja sa piometrom javlja u jesenjim mesecima i to oko 45 dana posle zadnjeg estrusa. Ortega-Pacheco i sar. (2007), takođe, nalaze uticaj sezone na manifestaciju estrusa i pojavu piometre posle zadnjeg estrusa, što povezuju sa uticajem različitog trajanja dnevnog fotoperioda i različitom ambijentalnom temperaturom u pojedinim godišnjim sezonama (Ortega-Pacheco, 2006). Slično našim rezultatima, Tottona i sar. (2010) nalaze da se piometra kod kuja dijagnostikuje najčešće tokom perioda oktobar- januar, odnosno oko 30 do 50 dana posle manifestacije zadnjeg estrusa. Naši, kao i rezultati drugih autora mogu se povezati sa činjenicom da tokom dugotrajnog diestrusa kuje visoka koncentracija progesterona u telesnoj cirkulaciji inhibira odbrambeni mehanizam uterusa (infiltraciju polimorfonuklearnim leukocitima) (Roseboom i sar., 1998). Ovo ima za posledicu otok endometriuma i pojačanu sekretornu aktivnost endometrijalnih žlezda, odnosno nakupljanje većih količina sekreta u lumenu uterusa. Sekretacija endometrijalnih žlezda pospešuje razvoj bakterija, posebno zbog inhibicije mehanizma imune odbrane uterusa, kao i zbog toga što sekret uterusa, sa jedne strane, sam po sebi, ima inflamatorni uticaj, dok, sa druge strane, predstavlja idealni supstrat za razvoj bakterija (Romagnoli, 2002). Ako se infekcija intenzivira sa formiranjem gnoja u lumenu uterusa postoji piometra (Selinger, 2001).

Zaključak / Conclusion

Obzirom na oskudan broj literaturnih podataka na temu uticaja sezone na pojavu piometre kao oboljenja reproduktivnog trakta u kuja i sa jasnim zaključkom da uticaj sezone na manifestaciju estrusa i pojavu piometre posle zadnjeg estrusa upravo jeste povezan sa uticajem različitog trajanja dnevnog fotoperioda i različitom ambijentalnom temperaturom u pojedinim godišnjim sezonama. Na osnovu ovih činjenica i ispitivanjem uticaja godišnje sezone na pojavu

piometre kod kuja može se zaključiti da postoji razlika u frekvenciji pojave piometre kod kuja u zavisnosti od godišnje sezone. Ustanovljeno je da se piometra dijagnostikuje značajno češće tokom perioda septembar – novembar (31%) i decembar – februar (28%), a ređe tokom perioda mart – maj (19%) i juni – avgust (22%).

Literatura / References

1. Blendinger K, Bostedt H. The age and stage of estrus in bitches with pyometra. Statistical inquiry and interpretive study of the understanding of variability. Tierarth Prax 1991;19(3): 307-10.
2. Chastain CB, Panciera D, Waters C. Association between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. Small Animal Endocrinology 1999; 9: 8-14.
3. Dawson C. Pyometra. Suite 101, ent. cur. http://petcare.suite101.com/print_article.cfm/pyometra. 2006;Pp.1-2.
4. Egenvall A, Hagman R, Bonnett NB, Hendhammar A, Olson P, Lagerstedt A-S. Breed Risk of Pyometra in Insured Dogs in Sweden. J Vet Intern Med 2001;15: 530-8.
5. Fucuda S. Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. Exp Anim 2001; 50(4): 325-9.
6. Gaves KT. Pyometra. 2003; <http://www.papillonclub.or/Education/pyometra.htm>
7. Hagman R, Kindahl H, Fransson AB, Bergström A, Ström Holst B, Lagersted S-A. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F_{2α} metabolite analysis. Theriogenology 2006; 66: 198-206.
8. Heiene R, Kristiansen V, Teige J, Jansen HJ. Renal histomorphology in dogs with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of kidney disease. Acta Vet Scand 2007; 49: 13-22.
9. Jackson D. What You Must Know About Pyometra in Your Female Dog. 2007; <http://www.general-pet.com/plugins/print/>. Pp.1-2.
10. Kushwaha BR, Shankar U, Kumar P, Kumar M. Pyometra in canines: an Appraisal. 2007; http://www.poulvet.com/dog/articles/pyometra_articles.php
11. Laurusevičius AS, Šiugždaite J, Žilinska, H. The influence of bacterial and environmental factors in the etiology of pyometra in bitches. Veterinarija ir Zootechnika 2009; 68: 46-51.
12. Miljković V. Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje domaćih životinja. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, 2000.
13. Niskanen M, Thrusfield MV. Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in Finnish dogs. Vet Rec 1998; 143(18): 493-8.
14. Okano S, Tagawa M, Tajase K. Relationship of the Blood Endotoxin Concentration and Prognosis in Dog with Pyometra. J Vet Med Sci 1998; 60(11): 1265-7.
15. Ortega-Pacheco A. Reproduction of Dogs in the Tropics with Special Reference to the Population Structures, Reproductive Patterns and Pathologies, and a Non-surgical Castration Alternative (PhD thesis). Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 2006.

16. Ortega-Pacheco A, Segura-Correa JC, Jimenez-Coello M, Linde Forsberg C. Reproductive patterns and reproductive pathologies of stray bitches in the tropics. *Theriogenology* 2007; 67(2): 382-90.
17. Romagnoli S. Canine Pyometra: Pathogenesis, Therapy and Clinical Cases. 27th WSAVA Congress, 3. - 6. October, 2002, Granada, Spain, 12-6.
18. Roseboom JK, Troedsson THM, Crabo GB. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. *J Reprod Fert*, 1998; 114: 195-9.
19. Selinger J. Pyometra in the bitch. 2001; <http://www.uoguelph.ca/pyometra.html>. Pp.1-3.
20. Sevelius E, Tidholm A, Thoren-Tolling K. Pyometra in dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1990; 26: 33-8.
21. Smith M. Pyometra & Infections of the Uterus. *Pet Education. Com.* 2007; http://www.peteducation.com/article_print
22. Smith OF. Canine pyometra. *Theriogenology*, 2006; 66: 610-2.
23. Stančić I, Stevančević M, Lako B, Jovičin M. Uticaj rase na starosnu dob u kojoj se najčešće javlja piometra kod kuja. *Veterinarski glasnik (Beograd)* 2009; 62(3-4): 233-40.
24. Tottona CS, Wandeler IA, Gartley JC, Kachhawahac S, Sumand M, Ribble SC, Rosattef CR, McEwen AS. Assessing reproductive patterns and disorders in free-ranging dogs in Jodhpur, India to optimize a population control program. *Theriogenology* 2010; 74(7): 1115-20.

ENGLISH

SEASONAL EFFECTS ON APPEARANCE OF PYOMETRA IN BITCHES

I. Stančić, O. Stevančević, Jelena Stančić, I. Apić

Pyometra is one of the most frequent and very grave diseases of the reproductive system in bitches. It occurs around 30 to 60 days following the latest oestrus in bitches that are not pregnant. Bitches older than 5 years have a significantly higher predisposition for this disease than younger bitches. There are also differences between certain breeds in the age at which this disease is manifested in a bitch. The objective of this work was to establish whether the seasons of the year also affect the incidence of pyometra in bitches in the territory of Vojvodina. The occurrence of pyometra was examined in a total of 318 bitches over a course of two years and during the different seasons of the year. It was established that a statistically significantly higher number of bitches ($P < 0.05$) fall ill with this disease during the seasons September-November (31%) and December-February (28%) than during the seasons March-May (19%) and June-August (22%). The obtained data can serve to secure better prevention and timely diagnoses of pyometra in bitches.

Key words: pyometra, incidence, season, bitch

ВОЗДЕЙСТВИЕ СЕЗОНА НА ЯВЛЕНИЕ ПИОМЕТРЫ У СУК

И. Станчич, О. Стеванчевич, Елена Станчич, И. Апиц

Пиометра одно из самых частых и очень серьёзных заболеваний репродуктивной системы суки. Является около 30 до 60 дней после заднего эструса у сук, которые не беременные. Суки старше 5 лет имеют значительно более большую предрасположенность для заболевания более молодых сук. Существуют и различия среди некоторых рас, в старости сук у явления пиометры. Цель этой работы была установить существует ли и воздействие годового сезона на частоту манифестации пиометры у сук на районе Воеводины. Нами испытано явление пиометры у совокупно 318 сук, в течение два года, в различных годовых сезонах. Нами установлено, что статистически значительно более большое число сук ($p < 0,05$) заболевает в течение сезона сентябрь-ноябрь (31%) и декабрь-февраль (28%) в отношении сезона март-май (19%) и июнь-август (22%). Полученные данные могут послужить для лучшей превентивы и своевременной диагностики пиометры у сук.

Ключевые слова: пиометра, частота, сезон, сука

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE U BEOGRADU 2011-2012. GODINE

Vasiljević J. Marko

Rođen 20. 07. 1986. u Šapcu
Diplomirao 27. 02. 2012.
Stalno mesto boravka Slepčević
Procerska 46

Radujko M. Marija

Rođena 15. 01. 1982. u Kninu,
R. Hrvatska
Diplomirala 14. 02. 2012.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Omladinskih brigada 39/12

Todorović N. Slobodan

Rođen 26. 02. 1981. u Aleksincu
Diplomirao 13. 02. 2012.
Stalno mesto boravka Žitkovac
Ratka Jovića 46/6

Blagojević N. Srđan

Rođen 26. 08. 1980. u Požarevcu
Diplomirao 31. 01. 2012.
Stalno mesto boravka Požarevac
P. P. odred 175

Miladinović Z. Miodrag

Rođen 07. 12. 1983. u Aleksincu
Diplomirao 02. 02. 2012.
Stalno mesto boravka Žitkovac
Selo Moravac, BB

Mandić D. Aleksandar

Rođen 28. 08. 1982. u Beogradu
Diplomirao 25. 10. 2011.
Stalno mesto boravka
Vespučijeva 25/17

Čobanović Đ. Nikola

Rođen 05. 05. 1986. u Beogradu
Diplomirao 27. 12. 2011.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Aleksinačkih rudara 53/19

Milanović M. Mirjana

Rođena 28. 04. 1985 u Beogradu
Diplomirala 23. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Beograd
Slanački put 97-0

Đurđević N. Goran

Rođen 30. 01. 1971. u Smed. Palanci
Diplomirao 29. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Golobok

Stojiljković D. Radoš

Rođen 30. 03. 1986. u Leskovcu
Diplomirao 26. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Leskovac
Beogradska 32

Drinčević M. Aleksandar

Rođen 15. 08. 1986. u Valjevu
Diplomirao 27. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Lukavac
Divci

Glogovac B. Danijela

Rođena 29. 03. 1979. Beograd
Diplomirala 27. 12. 2011.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Gandijeva 204

Jelinek Z. Sanja

Rođena 26. 10. 1982. u Šapcu
Diplomirala 26. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Šabac
Vojvode Mišića 69

Veselić D. Aleksandar

Rođen 05. 10. 1983. u Kraljevu
Diplomirao 26. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Podunavci
Selo Vraneši 15

Dokić R. Ivan

Rođen 22. 08. 1980. u Beogradu
Diplomirao 21. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Beograd
Branka Krsmanovića 11a

Petrović D. Milica

Rođena 26. 06. 1985. u Loznici
Diplomirala 22. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Ljubovija
Sokogradska bb

Srijemac M. Slaven

Rođen 12. 10. 1983. u Slavonskom
Brodu, R. Hrvatska
Diplomirao 21. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Banja Luka
Cara Dušana 6

Poznanović B. Radoslava

Rođena 26. 12. 1984. u Osijeku,
R. Hrvatska
Diplomirala 21. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Uzdin
M. Eminesku 94

Gotovac M. Mladen

Rođen 31. 10. 1981. u Tesliću,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 20. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Teslić
Jovana Dučića H 30/3

Milinović J. Ivan

Rođen 08. 03. 1984. u Valjevu
Diplomirao 20. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Mionica
Selo Sanković

Dimić B. Nikola

Rođen 18. 08. 1981. u Bačkoj Topoli
Diplomirao 14. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Bačka Topola
Lička 2

Pavlović Ž. Katarina

Rođena 19. 03. 1981. u Loznici
Diplomirala 16. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Loznica
Voćnjak bb

Bojović B. Dejan

Rođen 24. 05. 1979. u Žablaku,
Crna Gora
Diplomirao 12. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Njegovuza

Denić Z. Vladimir

Rođen 23. 05. 1985. u Leskovcu
Diplomirao 08. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Leskovac
Gornje Sinkovce

Lažetić R. Vladimir

Rođen 03. 02. 1987. u Beogradu
Diplomirao 08. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Beograd
Hadži Milentijeva 6

Vacić S. Biljana

Rođena 08. 06. 1986. u Valjevu
Diplomirala 08. 12. 2011.
Stalno mesto boravka S. Sićevo

Lazić M. Dušan

Rođen 20. 12. 1983. u Šapcu
Diplomirao 25. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Šabac
Miloša Obilića 59

Kaluđerović I. Saša

Rođen 30. 01. 1971. u N. Sadu
Diplomirao 28. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Veternik
Isidore Sekulić 15

Grujić P. Dušan

Rođen 15. 04. 1979. u Smederevu
Diplomirao 21. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Smederevo
Svete Mladenovića 4

Jakovljević M. Nenad

Rođen 08. 07. 1982. u Šapcu
Diplomirao 28. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Vladimirci
Mehovine, Valjevski put bb

Vlajković D. Zorica

Rođena 03. 10. 1981. u Valjevu
Diplomirala 25. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Ub
Sestara Rebavki 5/17

Stefanović M. Dejan

Rođen 19. 10. 1981. u Jagodini

Diplomirao 25. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Jagodina
Jovana Popovića 24

Vasić M. Lazar

Rođen 17. 11. 1983. u Jagodini
Diplomirao 25. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Jagodina
Kneza Milete s4/18

Nikolić M. Veljko

Rođen 29. 06. 1980. u Požegi
Diplomirao 23. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Arilje
Naselje Pogled bb

Mihailović S. Ana

Rođena 09. 01. 1980. u Šapcu
Diplomirala 23. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Šabac
Kralja Milana 19

Petković Ž Dragan

Rođen 04. 02. 1977. u Loznici
Diplomirao 23. 11. 2011.

Ilić Z. Miloš

Rođen 21. 08. 1983. u Nišu
Diplomirao 22. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Gornji Matejevac, Prosvetina 9

Grbović S. Jelena

Rođena 18. 09. 1985. u Priboju
Diplomirala 09. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Priboj
Sastavci

Kovačević B. Đorđe

Rođen 06. 05. 1978. u Kraljevu
Diplomirao 22. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Kraljevo
Vojvode Stepe 6/15

Martinović M. Ivan

Rođen 02. 07. 1981. u Lazarevcu
Diplomirao 22. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Lazarevac
Vojvode Stepe 94

Zdravković Z. Predrag

Rođen 07. 05. 1981. u Jagodini
Diplomirao 21. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Jagodina
Kneza Milete 21

Nedeljković Č Tanja

Rođena 06. 09. 1982. u Vitenu,
Nemačka
Diplomirala 28. 10. 2011.
Stalno mesto boravka Kraljevo
Milakovac 208

Arsenović T. Milan

Rođen 21. 10. 1977. u Hamburgu,
Nemačka
Diplomirao 16. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Bijeljina, BiH
Vladimira Gaćinovića 46

Pribičević B. Dalibor

Rođen 12. 11. 1973. u Vinkovcima
R. Hrvatska
Diplomirao 15. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Beograd
Zaplanjska 73/33

Horvat N. Denis

Rođen 19. 05. 1977. u Doboju, BiH
Diplomirao 15. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Subotica
Svetozara Markovića 1

Majkić P. Mira

Rođena 23. 08. 1984. u Rumi
Diplomirala 07. 11. 2011.

Stalno mesto boravka N. Beograd
Jurija Gagarina 104/78

Janevski B. Jasmina

Rođena 22. 09. 1969. u Vrbasu
Diplomirala 19. 09. 2011.
Stalno mesto boravka Savino Selo
B. Deletića 45

Trajković Ž. Mikica

Rođen 10. 04. 1984. u Leskovcu
Diplomirao 28. 10. 2011.
Stalno mesto boravka Leskovac
Selo Navalin

Lazić M. Aleksandar

Rođen 02. 08. 1980. u Šapcu
Diplomirao 27. 10. 2011.
Stalno mesto boravka Šabac
Kralja Milutina 4

Danon G. Gorana

Rođena 09. 05. 1980. u Beogradu
Diplomirao 25. 10. 2011.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Bulevar umetnosti 3/97

Stepanović D. Miloš

Rođen 01. 11. 1984. u Čačku
Diplomirao 26. 10. 2011.
Stalno mesto boravka Požega
Selo Pilatovići

Joksimović J. Berislav

Rođen 29. 10. 1977. u Novom Sadu
Diplomirao 19. 10. 2011.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Bulevar Zorana Đinđića 177

Spasenović J. Vladimir

Rođen 29. 03. 1982. u Loznici
Diplomirao 21. 10. 2011.
Stalno mesto boravka Donja Borina

Mihajlović M. Goran

Rođen 07. 02. 1983. u Nišu
Diplomirao 10. 10. 2011.
Stalno mesto boravka Svrlijig
Hadžićeva 84

Antolović M. Ana

Rođena 29. 08. 1983. u Beogradu
Diplomirala 25. 10. 2011.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Milutina Milanovića 140/29

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 A₄, 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 A₄ u dva primerka, zajedno sa elektronskom verzijom. Stranice numerisati redom u okviru donje margine (sa desne strane) počev od naslovne strane. Podaci o korišćenoj literaturi u tekstu označavaju se u zagradi prezimenom autora, iza kojeg se stavlja zarez i godina. Ukoliko 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, 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, H₂O, B₁₂, CD₈). U radu se mogu koristiti određene skraćenice, ali samo kada je to neophodno (npr. kod dugačkih imena hemijskih jedinjenja) ili kada se takve skraćenice već nalaze u literaturi, odnosno kao takve su već prepoznatljive (npr. DNK). Za svaku skraćenicu, koja se prvi put javlja u tekstu treba navesti i pun naziv. Skraćenice nikako ne koristiti u naslovu, a u kratkom sadržaju ih takođe treba izbegavati. Decimalne brojeve pisati sa zarezom. 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 table. 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 poleđini 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. 4th 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 abstrakt u Zborniku radova:

Ćupić V, Trailović D, Dobrić S, Velež 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 veterinarima 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