

VETERINARSKI GLASNIK

VOL. 66

BROJ 3 - 4

STRANA 161 - 342

Beograd 2012.

3-4

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. 3-4 Str. 161-342 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 Jovičin, 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. 3 - 4 str. 161 - 342 Beograd, 2012.

SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

ORIGINALNI RADOVI – ORIGINAL PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

- Suvajdžić Ljiljana, Ašanin Jelena, Lako Bjanka, Potkonjak A., Sakač V., Čabarkapa Ivana, Stojaković Nataša: Isolation of *Arcanobacterium Haemolyticum* from Calves with Pneumonia and Proposal of a Diagnostic Protocol
Izolacija *Arcanobacterium haemolyticum* iz pluća teladi sa pneumonijom i preporuka dijagnostičkog protokola
Изоляция *Arcanobacterium haemolyticum* из лёгких телят с пневмонией и рекомендацию диагностического протокола 165
- Petrović Jelena, Pušić I., Apić Jelena, Milanov Dubravka, Grgić Ž., Đorđević Vesna, Matekalo-Sverak Vesna: Silvatična trihinelozna – uloga divljih životinja u ciklusu širenja trihineloze u Srbiji
Sylvatic Trichinosis – Role of Wild Animals in Cycle of Spread of Trichinosis In Serbia
Силватичный трихинеллёз - роль диких животных в цикле расширения трихинеллёза в Сербии 175
- Jezdimirović Milanka, Aleksić Nevenka, Trailović S., Ivanović S., Jezdimirović N.: Ispitivanje podnošljivosti produžene peroralne primene eugenola kod pacova
The Assessment of Tolerability of Prolonged Oral Eugenol Administration in Rats
Испытание сносности продолжительного перорального применения эугенола у крыс 185
- Ašanin Jelena, Aksentijević Ksenija, Žutić M., Katić Vera, Krnjaić D., Milić N., Ašanin Ružica, Mišić D.: Ispitivanje osetljivosti *Staphylococcus* vrsta na neke antibakterijske lekove primenom disk difuzione i mikrodilucione metode u bujonu
Investigation of Susceptibility of *Staphylococcus* Species to Some Antibacterial Drugs by Disk Diffusion and Broth Microdilution
Испытание чувствительности *Staphylococcus* видов на некоторые антибактериальные лекарства 199
- Spalević Ljiljana, Ivetić V., Jakić Dimić Dobrila, Maslić Strižak Danka, Potkonjak A., Pavlović N.: Uloga Harderove žlezde u imunom odgovoru pilića sa maternalnim imunitetom na vakcinu protiv virusnog infektivnog bronhitisa
Role of Harderian Gland in Immune Response of Chickens with Maternal Immunity to Vaccine Against Infectious Bronchitis Virus
Роль железы Хардера в иммунном ответе циплят с материнским иммунитетом на вакцину против вирусного инфекционного бхронхита 211

■ Janković Ljiljana, Radenković-Damnjanović Brana, Karabasil N., Mirilović M., Marić S.: Ispitivanje uticaja postupaka dezinfekcije na higijenu u zanatskoj klanici Investigations of Influence of Disinfection Procedures on Hygiene in Private Slaughterhouse Sylvatic Trichinosis – Role of Wild Animals in Cycle of Spread of Trichinosis In Serbia Испытание влияния поступков дезинфекции на гигиену в ремесленной скотобойне	219
■ Karabasil N., Dimitrijević Mirjana, Pavličević Nataša, Teodorović V., Lončina Jasna, Nedeljković Trailović Jelena, Baltić M. Ž.: Nalaz salmonela na površinama u stočnom depou i boksu za omamljivanje svinja Salmonella in Pig Lairage and in Stunning Box Результаты сальмонелл на поверхностях в скотоводческом депо и боксе для приманивания свиней	233
■ Janković Vesna, Petrović Ljiljana, Vesković Slavica, Karan Dragica, Radičević Tanja, Janković S., Stefanović S.: Ispitivanje prisustva rezidua veterinarskih lekova i kontaminanata okoline tokom proizvodnog ciklusa petrovačke kobasice, kao deo obavezanih parametara bezbednosti hrane Investigations of Residue of Veterinary Medicines and Environmental Contaminants During Production Cycle of Petrovska Klobasa as Part of Compulsory Parameters for Food Safety Испытание присутствия остатков ветеринарных лекарств и контаминантов окрестности в течение производственного цикла петровачкой колбасы как часть обязательных параметров безопасности пищи	243
PREGLEDNI RADOVI – REVIEW PAPERS – ОБЗОРНЫЕ РАБОТЫ	
■ Antonijević Biljana, Milovanović Vesna, Ćurčić Marijana, Janković S, Jačević Vesna, Vučinić Slavica: Mehanizmi toksičnog dejstva i interakcije polihlorovanih bifenila i polibromovanih difenil etara Toxicity Mechanisms and Interactions of Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Diphenylethers Механизмы токсического действия и интеракции полихлорированных бивенилов и полибромованных дифенил эфиров	259
■ Stevanović Jelka, Borozan Sunčica, Božić Tatjana, Jović S., Đekić Tatjana, Dimitrijević B.: Oksidativni stres Oxidative Stress Окислительный стресс	273
■ Marković Danica, Radovanović Anita, Kovačević-Filipović Milica, Francuski Jelena, Todorović Vera: Histološke karakteristike reakcije mekih tkiva na implantirani biokeramički materijal i procena biokompatibilnosti Histological Characteristics of Soft Tissue after Implanting Bioceramical Materials and Estimation of Biocompatibility Гистологические характеристики реакции мягких тканей на имплантированный биокерамический материал и оценка биосовместимости	285
■ Ilić Tamara, Savić Sara, Dimitrijević Sanda: Epizootiološko-epidemiološki značaj parazitskih infekcija divljih kanida Epizootiological-Epidemiological Importance of Parasitic Infections in Wild Canids Эпизоотологическо-эпидемиологическое значение паразитарных инфекций диких собак	299

PRIKAZ SLUČAJA – CASE REPORT – ПОКАЗ СЛУЧАЯ

■ Šefer D., Petrujić B., Marković Radmila, Grdović Svetlana, Radulović S., Jovanović D.: Hemijski sastav potpunih smeša za ishranu svinja analiziranih u periodu 2007–2009. godine Chemical Composition of Complete Fodder Mixes for Pig Diet During 2007-2009 Химический состав полных кормовых смесей для кормления свиней, анализи- рованных в аккредитованной лаборатории кафедры кормления и ботаники в периоде 2007-2009 года	311
■ Blagojević M., Aleksić Jelena: Forenzička analiza kostiju u <i>Regio antebrachii</i> srne (<i>Capreo- lus capreolus</i>) i ovce (<i>Ovis aries</i>) u cilju utvrđivanja pripadnosti životinjskoj vrsti Forensic Analysis of Bone in Regio Antebrachii of Deer (<i>Capreolus Capreolus</i>) and Sheep (<i>Ovis Aries</i>) in Order to Determine Origin of Animal Species Судебный анализ костей в <i>Pesio antebrachii</i> серны (самки) (<i>Capreolus capreo- lus</i>) и овцы (<i>Ovis aries</i>) с целью утверждения принадлежности животному виду.	325
DIPLOMIRANI STUDENTI - DOKTORI VETERINARSKE MEDICINE – GRADUATE STUDENTS - DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE - ДИПЛОМИРОВАННЫЕ СТУДЕНТИ - ДОК- ТОРЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ	333
UPUTSTVO AUTORIMA - NOTES FOR CONTRIBUTORS.	339

**ISOLATION OF ARCANOBACTERIUM HAEMOLYTICUM
FROM CALVES WITH PNEUMONIA AND PROPOSAL OF
A DIAGNOSTIC PROTOCOL***

**IZOLACIJA ARCANOBACTERIUM HAEMOLYTICUM IZ PLUĆA TELADI
SA PNEUMONIJOM I PREPORUKA DIJAGNOSTIČKOG PROTOKOLA**

**Ljiljana Suvajdžić, Jelena Ašanin, Bjanka Lako, A. Potkonjak, V. Sakač,
Ivana Čabarkapa, Nataša Stojaković****

The aims of this study are the isolation and identification of possible bacteriological agents in respiratory infections of calves and the optimization of a diagnostic protocol to identify Arcanobacterium haemolyticum. Lesions of lungs from calves with pneumonia were examined. Cultural, morphological and conventional biochemical testing were done. The investigation was complemented by the double CAMP test. Five strains of Arcanobacterium haemolyticum in pure culture were found.

The presence of Arcanobacterium haemolyticum in the lungs of calves with pneumonia was established and, consequently, more attention should be paid to this species in everyday laboratory work.

The cultural similarity of Arcanobacterium haemolyticum to common bacteria like beta-hemolytic Streptococcus spp. and Arcanobacterium pyogenes is probably responsible for rare reports on the isolation of Arcanobacterium haemolyticum in veterinary microbiology. Our results indicate that Arcanobacterium haemolyticum could be or is the etiological agent of pneumonia. Therefore, we suggest the diagnostic

* Rad primljen za štampu 16. 11. 2011. godine

** Ljiljana Suvajdzic, MD, MS, PhD, Specialist, Assistant Professor, University of Novi Sad, Medical Faculty, Department of Pharmacy, Novi Sad, Serbia; Jelena Asanin, MD, Research Associate, Innovation Center, Faculty of Technology & Metallurgy, University of Belgrade, Serbia; Bjanka Lako, MD, Blood Transfusion Institute of Serbia, Belgrade, Serbia; Aleksandar Potkonjak, DVM, MS, PhD, Assistant Professor, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine Novi Sad, Serbia; Vladimir Sakac, MD, MS, Specialist, Teaching Assistant, University of Novi Sad Medical Faculty, Novi Sad, Serbia; Ivana Cabarkapa, BS - Biologist, Specialist, Research Assistant, Institute of Food Technology, Novi Sad, Serbia; Natasa Stojakovic, MD, MS, Specialist, Teaching Assistant, University of Banja Luka, Medical Faculty, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

protocol available for routine work in most microbiological laboratories.

Key words: Arcanobacterium haemolyticum, pneumonia, calves, double CAMP

Introduction / Uvod

In human medicine *Arcanobacterium haemolyticum* is commonly described in cases of infective pharyngitis, sometimes with a characteristic scarlatiniform rash (Carlson et al., 1994; Karpathios et al., 1992; Suvajdžić et al., 2006). Other less commonly reported infections include osteomyelitis, meningitis, brain abscess, cavitary pneumonia, endocarditis and sepsis (Puerto Alonso et al., 2002; Therriault et al., 2008). Bacteremia caused by *A. haemolyticum* is rare, but a few cases of bacteremia associated with soft-tissue infections in immunocompetent patients were reported (Tan et al., 2006).

However, the isolation of *A. haemolyticum* from animals appears to be rare. In animals, *A. haemolyticum* was isolated from bull's sperm (Richardson and Smith, 1968), sheep's lungs (Roberts, 1969) and goat's brain (Younan and Drescher, 1996). A single *A. haemolyticum* strain was isolated from a periodontal infection of a rabbit (Tyrrell et al., 2002). *A. haemolyticum* was isolated from piglet's lungs (Suvajdzic et al., 2002). *Arcanobacterium haemolyticum* strains obtained from infections of horses were characterized phenotypically and genotypically (Hassan et al., 2009).

According to the available literature, *A. haemolyticum* originating from calves' lungs has not been reported yet. Due to our findings, *A. haemolyticum* may have a possible etiological role as a cause of clinically manifest respiratory tract infections in calves.

Material and methods / Materijal i metode rada

Holstein-Friesian calves with clinically manifest pneumonia were euthanized during an outbreak in a herd and their lungs were examined. Affected calves were 2-3 months old. Homogenization of parts of the lungs with lesions was performed in a thioglycolate medium with silver sand (Oxoid) within two hours after sampling. The homogenate was inoculated on: agar with 10% sheep blood, 3 mm thick (SBA), endo agar (EA), nutrient agar (NA) and thioglycolate broth (TB). On SBA and NA inoculations were performed with and without streaks of *Staphylococcus aureus*. The streaked plates were incubated at 37 °C in aerobic and microaerophilic conditions and examined after 12, 18, 24, 36 and 48 h. The following aspects of suspect colonies were assessed: embedding, type of colony, colony characteristic including hemolysis diameter ratio, tinctorial status (Gram,

Neisser, Ziehl-Nielsen stains). The CAMP test (with *Rhodococcus equi* and *Staphylococcus aureus*) was performed on the same agar plate as described by Clarridge (Clarridge, 1989). The biochemical activity of the isolates was examined by conventional biochemical tests and commercial kits (API CORYNE, bioMérieux, France). Conventional biochemical tests included: oxidase, catalase, esculin, urea, lactose, xylose, maltose and gelatin. Bacitracin tests and growth in the presence of 0.33% cholic and 12-monoketocholic acid were also performed.

Results / Rezultati

Five strains of *A. haemolyticum* were isolated from 5 calves suffering from pneumonia. All five isolates formed visible S- form colonies on SBA and NA, but not on EA. Colony growth did not show dependence on staphylococcal or blood growth factors. The isolates grew better under microaerophilic than under aerobic conditions. After 12 hours of cultivation, a zone of complete hemolysis occurred without visible colony growth. Hemolysis showed non-distinctive edges and spread through the agar with a colony growth at the same time. After 24 hours of cultivation the hemolysis diameter was 2-5 times bigger than the colony diameter (Fig. 1), with colony size of 0.2 mm in microaerophilic conditions and 0.1 mm in aerobic conditions (using digital caliper).

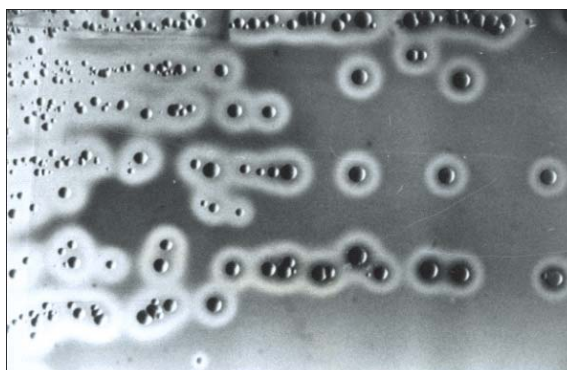


Figure 1. *Arcanobacterium haemolyticum*. Colonies on 10% sheep blood agar, after 24 hours, incubation at 37°C. Note that the hemolysis diameter is 2-5 times bigger than the colony diameter /

Slika 1. *Arcanobacterium haemolyticum*. Izgled kolonija na agaru sa dodatkom 10% ovčije krvi, nakon inkubacije na 37°C tokom 24 sata. Može se videti da je prečnik zone hemolize oko kolonija 2-5 puta veći od prečnika samih kolonija

The Gram stain from young colonies (before 18 h of cultivation) showed gram-positive, thin, gracile rods which occasionally developed a branch effect. After 18 h of cultivation, bacterial cells had a different morphology and were pleomorphic and polychromatic. After 24 h of cultivation rods were Gram-variable,

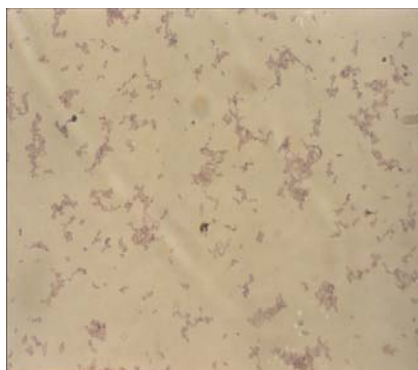


Figure 2. *Arcanobacterium haemolyticum*. Gram-stain smears made from solid media taken by scraping from depth of agar. Note that bacteria are gram-negative and coccoid in form /

Slika 2. Preparat po Gramu pripremljen od kolonija iz dubine agara. Može se videti da su bakterije gram – negativne i kokoidne

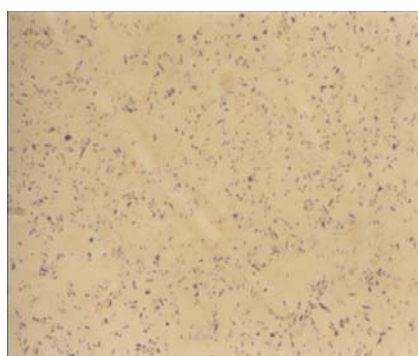


Figure 3. *Arcanobacterium haemolyticum*. Gram-stain smears from liquid media. Showing gram-variable, thin, gracile, curved rods with blunted ends /

Slika 3. *Arcanobacterium haemolyticum*. Preparat po Gramu pripremljen iz tečne kulture pokazuje gram-varijabilne, tanke, gracilne, zakrivljene štapiće sa tačkasto naglašenim polovima



Figure 4. Double CAMP test, Legend: 1. *Staphylococcus aureus*, 2. *Rhodococcus equi*, 3. *Corynebacterium* spp. β haemolytic, 4. *Streptococcus* non A non B group, 5. *Arcanobacterium haemolyticum*, 6. *Listeria ivanovii* CCM 5884, 7. *Corynebacterium* spp. γ hemolytic. Note: Isolate of *Arcanobacterium haemolyticum* restricted beta hemolysis of *Staphylococcus aureus* and caused synergistic hemolysis with the factor produced by *Rhodococcus equi*, presenting an „open umbrella“ pattern /

Slika 4. Dvostruki CAMP test, Legenda: 1. *Staphylococcus aureus*, 2. *Rhodococcus equi*, 3. *Corynebacterium* spp. β hemolitični, 4. *Streptococcus* non A non B grupa, 5. *Arcanobacterium haemolyticum*, 6. *Listeria ivanovii* CCM 5884, 7. *Corynebacterium* spp. γ hemolitični. Može se videti: *Arcanobacterium haemolyticum* sprečava beta hemolizu koju stvara *Staphylococcus aureus* i dovodi do sinergističke hemolize sa faktorom koji luči *Rhodococcus equi*, formirajući sliku otvorenog kišobrana

granulated with an impression of the existence of metachromatic granules and a domination of coccoid forms. No presence of metachromatic granules was detected by Neisser staining. Smears made from bacteria taken by scraping from the depth of the agar showed gram-negative coccoid cells (Fig. 2). Contrary to the solid media, smears made of bacteria from liquid media showed Gram-variable, thin, gracile, curved rods with blunted ends (Fig. 3).

The isolates restricted beta hemolysis of *Staphylococcus aureus* and caused synergistic hemolysis with the equi factor (phospholipase C) produced by *Rhodococcus equi*, presenting an „open umbrella“ pattern. The presence of the hot-cold effect was not observed around colonies, but it was well observed in synergistic hemolysis in the double CAMP test (Fig. 4).

Table 1. *Biochemical characteristics of isolates determined using commercial kit (API CORYNE, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) /*

Tabela 1. Biohemijske karakteristike izolata određene upotrebom komercijalnog kita (API CORYNE, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)

Biochemical Reaction / <i>Biohemijska reakcija</i>	Results of investigated strains / <i>Rezultati ispitivanja sojeva</i>	bioMérieux identification table % positive strains / <i>identifikaciona tabela % pozitivnih sojeva</i>
NItrate reduction	all 5 strains positive	4
PyraZinamidase	all 5 strains positive	98
Pyrrolidonyl Arylamidase	all 5 strains positive	70
Alkaline Phosphatase	all 5 strains positive	85
Beta GlucURonidase	all 5 strains negative	36
Beta Galactosidase	all 5 strains positive	89
Alpha GLUcosidase	all 5 strains positive	92
N-Acetyl- Glucosaminidase	all 5 strains positive	89
ESCulin (-glucosidase)	all 5 strains negative	0
UREase	all 5 strains negative	0
GELatin (hydrolysis)	all 5 strains negative	0
Oxidase	all 5 strains negative	0
GLUcose	all 5 strains positive	100
RIBose	all 5 strains positive	91
XYLose	all 5 strains negative	0
MANnitrol	all 5 strains negative	0
MALtose	all 5 strains positive	94
LACtose	all 5 strains positive	100
Sucrose	all 5 strains positive	44
GLYcoGen	all 5 strains negative	0
CATalase	all 5 strains negative	0

All five isolates, investigated by conventional biochemical tests, were oxidase, catalase, esculin, xylose and urea negative, but lactose and maltose positive. No isolates liquefied gelatin. All five isolates were resistant to bacitracin and grew in the presence of 0.33% cholic and 12-monoketocholic acid.

The results of identification obtained using the commercial kit (API CORYNE, bioMérieux) are summarized in Table 1. The results were read using the bioMérieux software program. All strains were identified as *A. haemolyticum* with the probability rate of 99.9% and T = 0.75. All five isolates had the activity of nitrate reductase.

Discussion / Diskusija

The isolates formed visible colonies slightly slower (24-36 h) and they were smaller (0.1-0.2 mm) than in other investigations. Maclean's discovery of *A. haemolyticum* was made from throat cultures on human blood agar, on which, at 24 h, colonies were 0.75 mm in diameter. After 48 h of incubation, colonies were about 1.5 mm in diameter (Maclean et al., 1946). Rabbit and human blood agar yielded the same colonial morphology of *A. haemolyticum*, but sheep blood yielded much smaller colonies that became hemolytic after 48 h of incubation (Hermann, 1961). In our opinion these differences were the consequence of primoinoculation in aerobic and microaerophilic conditions with 3% CO₂ on 10% blood agar in this investigation. All the isolates formed visible colonies faster on SBA than NA, and in microaerophilic than in aerobic conditions. The effect of the atmosphere on growth rate and colony size has already been noticed in subcultures grown under aerobic, anaerobic and microaerophilic conditions (Clarridge, 1989; Cummings et al., 1993). The colonies were embedded, of buttery consistency, easy to emulsify and to pick up (except from the depth of the agar). All the isolates formed complete hemolysis with non-distinctive edges on SBA. This is in full agreement with the results of other investigators (Clarridge, 1989; Coman et al., 1996; Cummings et al., 1993). The only difference between our isolates and those first described was that ours did not form a hot-cold hemolysis (Maclean et al., 1946). However, the presence of the hot-cold effect was well observed in synergistic hemolysis in the double CAMP test (Fig. 4). All five investigated isolates formed visible S- form colonies on SBA and NA and, to our knowledge, only two authors described the R form of this bacterial species (Carlson et al., 1994; Fell et al., 1977).

It is almost impossible to find investigators with different results regarding tinctorial characteristics of *A. haemolyticum*. Maclean described pin point gracile rods up to the 18th hour with a further tendency towards granular forms and "swelling", thus visually imitating species of the genus *Streptococcus*. Gram instability occurred after 24 h, as well (Maclean et al., 1946). The same author pointed out the tinctorial similarity with *Streptococcus* spp., *A. pyogenes*, *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis*. They retained the rod form in broth cultures,

whilst being markedly coccoid if scraped from the depth of an agar plate (Clarridge, 1989). All investigators that studied this microorganism, pointed out Gram instability and the impression of the existence of metachromatic granules (eliminated by adequate staining) and showed that pleomorphism and polychromasia disappeared after 24 h. They also warned about possible confusion with both Gram positive and Gram negative gracile rods (Clarridge, 1989), particularly with species and genera that are or can be culturally similar: *Streptococcus*, *Listeria*, *A. pyogenes*, *E. rhusiopathiae*. To our knowledge acid resistant isolates have not been described so far.

In our research we found the inhibition of hemolysis of *S. aureus* with *A. haemolyticum* (inversa CAMP). This phenomenon is diagnostically significant for this species (Coman et al., 1996; Lammler and Blobel, 1988). We also found synergistic hemolysis with *Rhodococcus equi* resembling an "open umbrella". This corresponded to findings on human isolates and our previous experience with animal isolates (Clarridge, 1989; Suvajdzic et al., 2002).

The results obtained by conventional biochemical tests were in agreement with literature data. Among the results obtained by a commercial kit and software program (API CORYNE, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), the only parameter that differed from the identification table was nitrate reductase activity (according to the bioMérieux identification table nitrate reduction should have been positive in only 4%). Our results about nitrate reductase activity are consistent with the reports of Collins and Cummins, 1986; and Clarridge, 1989. In the ninth edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology it can be found that most strains reduce nitrates (Holt et al., 1994). Some authors report opposite data regarding nitrate reduction of the species. Maclean's strains (Maclean et al., 1946) did not reduce nitrates supplemented with 20% serum. Krech and Hollis expected a negative reaction (Krech and Hollis, 1991).

Zaključak / Conclusion

In our opinion, we established the presence of this species in the lungs of calves with pneumonia and its role in the etiology of the disease. We consider that in everyday work more attention should be paid to *Arcanobacterium haemolyticum* when issuing findings. Microbiologists in human medicine can misidentify this microorganism as *Streptococcus* non-A non-B group. When the samples are of animal origin this species can be confused with *Arcanobacterium pyogenes* which is frequent and an expected organism in animal specimens. In our experience, the double CAMP test, oxidase, catalase, esculin, xylose, urea, lactose, maltose, bacitracin test and gelatin liquefaction are sufficient as a diagnostic minimum, therefore we suggest this protocol as the diagnostic routine. The recommended tests are inexpensive and available to every routine laboratory and completely correspond to the API CORYNE bioMérieux commercial kit.

ACKNOWLEDGEMENTS / *NAPOMENA*:

This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Project No 41012. /

Ovaj rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, Projekat Ev. Br. 41012.

References / Literatura

1. Carlson P, Lounatmaa K, Kontiainen S. Biotypes of *Arcanobacterium haemolyticum*. J Clin Microbiol 1994; 32: 1654-7.
2. Clarridge JE. The recognition and significance of *Arcanobacterium haemolyticum*. Clinical Microbiology 1989; Newsletter 11: 41-5.
3. Collins MD, Cummins CS. Genus *Arcanobacterium*. In: Sneath PHS, Mair NS, Sharpe ME, Holt J (editors) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore 1986; 1288.
4. Coman G, Panzaru C, Dahorea C. The isolation of *Arcanobacterium haemolyticum* from the pharyngeal exudate of children. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol 1996; 41:141-4.
5. Cummings LA, Wu WK, Larson AM, Gavin SE, Fine JS, Coyle MB. Effects of media, atmosphere, and incubation time on colonial morphology of *Arcanobacterium haemolyticum*. J Clin Microbiol 1993; 31: 3223-6.
6. Fell HW, Nagington J, Naylor GR, Olds RJ. *Corynebacterium haemolyticum* infections in Cambridgeshire. J Hyg (Lond) 1977; 79: 269-74.
7. Hassan AA, Ulbegi-Mohyla H, Kanbar T, Alber J, Lammler C, Abdulmawjood A, Zschock M, Weiss R. Phenotypic and genotypic characterization of *Arcanobacterium haemolyticum* isolates from infections of horses. J Clin Microbiol 2009; 47: 124-8.
8. Hermann GJ. The laboratory recognition of *Corynebacterium haemolyticum*. Am J Med Technol 1961; 27: 61-6.
9. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Williams JT. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins 1994.
10. Karpathios T, Drakonaki S, Zervoudaki A, Coupari G, Fretzayas A, Kremastinos J, Thomaidis T. *Arcanobacterium haemolyticum* in children with presumed streptococcal pharyngotonsillitis or scarlet fever. J Pediatr 1992;121: 735-7.
11. Krech T, Hollis DG. *Corynebacterium* and related organisms. in: Balows A, Hausler WJ, Herrmann K, Isenberg HD, Shadomy HJ (editors) *Manual of clinical microbiology*, Washington, DC: American Society for Microbiology / ASM 1991; 277-86.
12. Lammler C, Blobel H. Comparative studies on *Actinomyces pyogenes* and *Arcanobacterium haemolyticum*. Med Microbiol Immunol 1988; 177: 109-14.
13. Maclean PD, Liebow AA, Rosenberg AA. A hemolytic *Corynebacterium* resembling *Corynebacterium ovis* and *Corynebacterium pyogenes* in man. J Infect Dis 1946; 79: 69-90.
14. Puerto Alonso JL, Garcia-Martos P, Giron Gonzalez JA. Infections by *Arcanobacterium haemolyticum*: an emerging pathogen. An Med Interna 2002; 19:473-6.
15. Richardson A, Smith PJ. Herd fertility and *Corynebacterium haemolyticum* in bovine semen. Vet Rec 1968; 83: 156-7.
16. Roberts RJ. Isolation of *Corynebacterium haemolyticum* from a case of ovine pneumonia. Vet Rec 1969; 84: 490.

17. Suvajdžić LJ, Ašanin R, Knežević N, Kosarčić S. Characterization of *Arcanobacterium haemolyticum* isolates originating from pneumonic piglets, the first isolates from piglet lungs in Yugoslavia. *Acta Veterinaria* 2002; 52: 223-33.
18. Suvajdžić LD, Mrđa EA, Bogavac MA, Džambas LD. Urticaria caused by *Arcanobacterium haemolyticum*: Diagnostic and therapeutic failures, *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences* 2006; 111: 35-43.
19. Tan TY, Ng SY, Thomas H, Chan BK. *Arcanobacterium haemolyticum* bacteraemia and soft-tissue infections: case report and review of the literature. *J Infect* 2006; 53: 69-74.
20. Therriault BL, Daniels LM, Carter YL, Raasch RH. Severe sepsis caused by *Arcanobacterium haemolyticum*: a case report and review of the literature. *Ann Pharmacother* 2008; 42:1697-702.
21. Tyrrell KL, Citron DM, Jenkins JR, Goldstein EJ. Periodontal bacteria in rabbit mandibular and maxillary abscesses. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40: 1044-7.
22. Younan M, Drescher B. Zeckenbefall Als ausloeser einer eitrigen meningitis bei einer burenziegen. *Tieraertzl Umschau* 1996; 51: 356-61.

SRPSKI

IZOLACIJA *ARCANOBACTERIUM HAEMOLYTICUM* IZ PLUĆA TELADI SA PNEUMONIJOM I PREPORUKA DIJAGNOSTIČKOG PROTOKOLA

Ljiljana Suvajdžić, Jelena Ašanin, Bjanka Lako, A. Potkonjak, V. Sakač, Ivana Čabarkapa, Nataša Stojaković

Cilj ovog rada bila je izolacija *Arcanobacterium haemolyticum* kao potencijalnog uzročnika respiratorne infekcije teladi sa preporukom dijagnostičke procedure prilikom njegove identifikacije u laboratorijama koje se bave rutinskom dijagnostikom. Bakteriološki su ispitani izmenjeni delovi pluća teladi sa znacima pneumonije, zatim su izolatima ispitane kulturelne, morfološke i tinktorijalne osobine. U daljoj dijagnostici su korišćeni klasični biohemijski testovi i dvostruki CAMP test. Dijagnoza je potvrđena komercijalnim kitovima ApiCoryne (bioMérieux, France), a dobijeni rezultati su očitavani softverskim programom istog proizvođača. Kako je *Arcanobacterium haemolyticum* izolovan u čistoj kulturi kod svih žrtvovanih životinja, mišljenja smo da je on mogući uzročnik pneumonije teladi koja se razvila tokom života. Takođe smo mišljenja da u rutinskom radu zbog njegove kulturelne sličnosti sa češće prisutnim i zato očekivanim bakterijskim rodovima i vrstama, kao što su *Arcanobacterium pyogenes* u uzorcima poreklom od životinja i *Streptococcus* vrsta u kliničkim uzorcima poreklom od ljudi, dolazi do propusta i u humanoj i u veterinarskoj bakteriološkoj dijagnostici. Rezultati dobijeni primenom klasičnih biohemijskih ispitivanja koja su dopunjena dvostrukim CAMP testom nisu se razlikovali od rezultata dobijenih primenom bioMérieux, kitova, koji nisu dostupni većini rutinskih laboratorija, kako zbog cene potrošnog materijala, tako i zbog zahtevnijeg izvođenja i očitavanja rezultata. Pristupačnost i jednostavnost izvođenja, kao i tačnost dobijenih rezultata, podržavaju primenu dijagnostičku proceduru, kao metodu izbora u dokazivanju ove bakterijske vrste.

Ključne reči: *Arcanobacterium haemolyticum*, pneumonija, telad, dvostruki CAMP

РУССКИЙ

ИЗОЛЯЦИЯ *ARCANOBACTERIUM HAEMOLYTICUM* ИЗ ЛЁГКИХ ТЕЛЯТ С ПНЕВМОНИЕЙ И РЕКОМЕНДАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРОТОКОЛА

Лиляна Сувайджич, Елена Ашанин, Бянка Лако, А. Потконяк, В. Сакач, Ивана Чабаркапа, Наташа Стоякович

Цель этой работы была изоляция *Arcanobacterium haemolyticum* как потенциального возбудителя респираторной инфекции телят с рекомендацией диагностической процедуры при его идентификации в лабораториях, занимаемые рутинной диагностикой. Бактериологически испытаны изменённые части лёгких телят с признаками пневмонии, затем изолятами испытанные диагностике использованы классические биохимические тесты и двукратный CAMP тест. Диагноз подтверждён коммерческими китами *ApiCoryne* (bioMérieux, France - Франция), а полученные результаты, отчитанные софтверной программой такого же производителя. Как *Arcanobacterium haemolyticum* изолирован в чистой культуре у всех жертвованных животных, мы думаем, что он возможный возбудитель пневмонии телят, развившая в течение жизни. Также мы думаем, что в рутинной работе из-за его культурального сходства с чаще присутствующим и потому ожидаемым бактериальным родам и видам, как *Arcanobacterium pyogenes* в образчиках происхождением от животных и *Streptococcus* видов в клинических образчиках происхождением от людей, приходит до пропуска и в гуманной и в ветеринарной бактериологической диагностике. Результаты, полученные применением классических биохимических испытаний, дополненные двойным CAMP тестом не различались от результатов, полученных применением bioMérieux, китов, которые не доступны большинству рутинных лабораторий, как из-за цены потребляемого материала, так и из-за более требовательного исполнения и отчитание результатов. Доступность и несложность исполнения, словно и точность полученных результатов, поддерживают применённую диагностическую процедуру, как метод выбора в доказывании этого бактериального вида.

Ключевые слова: *Arcanobacterium haemolyticum*, пневмония, телята, двойной CAMP тест

**SILVATIČNA TRIHINELOZA – ULOGA DIVLJIH ŽIVOTINJA
U CIKLUSU ŠIRENJA TRIHINELOZE U SRBIJI***
*SYLVATIC TRICHINOSIS – ROLE OF WILD ANIMALS IN CYCLE
OF SPREAD OF TRICHINOSIS IN SERBIA*

Jelena Petrović, I. Pušić, Jelena Apić, Dubravka Milanov, Ž. Grgić,
Vesna Đorđević, Vesna Matekalo-Sverak**

Trihinelozu je parazitska zoonoza koju izazivaju larve parazita iz roda Trichinella. Srbija spada u zemlje u kojima je T. spiralis pored domaćih životinja, prisutna kod sinantropnih i silvatičnih životinja. U radu su prikazani rezultati ispitivanja raširenosti trihineloze kod pojedinih vrsta silvatičnih i sinantropnih životinja, sa ciljem utvrđivanja uloge divljih životinja u prirodnom ciklusu trihineloze u našoj zemlji. Ukupno je ispitano 155 uzoraka divljih svinja, lisica, šakala i pacova. Uzorci su ispitani metodom veštačke digestije uz pomoć magnetne mešalice prema Commission Regulation (EC) No 2075/2005. Determinacija izolovanih mišićnih larvi obavljena je metodom lančane reakcije polimeraze (PCR). Ispitivanjima je ustanovljena relativno visoka prevalenca trihineloze kod lisica (5%) i šakala (8,33%) na teritoriji Vojvodine. Stepenn infestacije kod karnivora u Srbiji (10-30 larvi/10g) je mnogo veći u odnosu na zemlje u kojim nema trihineloze domaćih životinja. Prevalenca trihineloze divljih svinja nije velika, 0,82%, međutim kod njih je utvrđen vrlo visok stepenn infestacije (1100 larvi/g). Prema našim rezultatima prevalenca trihineloze i stepenn infestacije pacova prikupljenih sa farmi na kojim postoji trihinelozu svinja je izuzetno veliki, prevalenca je veća od 80% sa stepenom infestacije od 900 larvi/g. Izolovane mišićne larve determinisane su kao pripadnici vrste T. spiralis. Na rasprostranjenost trihinele u velikoj meri utiču loši socioekonomski uslovi, nedovoljna edukacija uzgajivača, odsustvo ili slaba veterinarska kontrola, nepravilno uklanjanje leševa životinja. Trihinelozu domaćih svinja je raširena u Srbiji i predstavlja značajan rizik za zdravlje ljudi. Prikazani

* Rad primljen za štampu 02. 02. 2012. godine

** Dr sc. vet. med. Jelena Petrović, naučni saradnik, mr sc. vet. med. Ivan Pušić istraživač-saradnik, Jelena Apić, DVM, istraživač-saradnik, dr sc. vet. med. Dubravka Milanov, naučni saradnik, dr sc. vet. med. Živoslav Grgić, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad; dr sc. vet. med. Vesna Đorđević, naučni saradnik, dr sc. vet. med. Vesna Matekalo-Sverak, naučni savetnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

podaci ukazuju na to da je u mere kojima se redukuje trihinelozna u populaciji domaćih životinja neophodno uključiti i one za sprečavanje širenja trihineloze sa domaćih svinja na silvatične životinje.

Ključne reči: trihinela, silvatične i sinantropne životinje

Uvod / Introduction

Trihinelozna je parazitska zoonozna koju izazivaju larve parazita iz roda *Trichinella*. Rodu *Trichinella* pripada nekoliko vrsta: *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae*, *T. nelsoni*, *T. murrelli* (Nagano i sar., 1999; Murell i sar., 2000). *T. spiralis* se načešće nalazi kod domaćih i divljih svinja, u odnosu na ostale vrste trihinela najpatogenija je za čoveka i veoma je rasprostranjena u celom svetu. *T. britovi* je prisutna kod divljih životinja, druga je po rasprostranjenosti kod ljudi, a zastupljena je u Evropi, Aziji, severnoj i zapadnoj Africi. U Srbiji je prvi put potvrđena 2011. godine od strane Cvetković i sar. Prisutna je i kod naših suseda, u Bugarskoj, Rumuniji, Hrvatskoj, Italiji i Makedoniji (Pozio, 2007; Cvetković i sar., 2011).

U Srbiji se trihinelozna endemski javlja u Sremu, dolini Dunava, Drine i Kolubare (Đorđević, 1989; Čuperilović i sar., 1989). Domaće svinje su glavni izvor trihineloze za ljude. Oboljenje nastaje nakon konzumiranja nedovoljno termalno obrađenog mesa u kome se nalaze žive larve. U periodu od 1995. do 2004. godine, prosečna godišnja prevalenca trihineloze kod domaćih svinja u endemskim regionima iznosila je 0,42%. U istom periodu trihinelozna je dijagnostikovana kod 432 obolele osobe (Tešić i sar., 2011). Srbija spada u zemlje u kojima je *T. spiralis* pored domaćih životinja, zastupljena i kod sinantropnih i silvatičnih životinja (Pozio, 2007). Sinantropne životinje su divlje životinje koje žive u blizini čoveka i imaju koristi od toga. To su pacovi, razne vrste glodara, golubovi, vrapci (Pozio, 2007). Istraživanja trihineloze koja su do sada rađena u Srbiji obično su za krajnji cilj imala smanjenje rizika od prenosa trihinela na ljude i redukovanje ekonomske štete, dok je silvatična trihinelozna relativno malo proučavana.

Zakonom je propisan i pregled mesa divljih svinja i medveda i redovno se obavlja pre svake sezone lova. Međutim, podaci o raširenosti trihineloze kod ostalih vrsta divljih životinja vrlo su oskudni (Brglez, 1988). Cilj rada je upoznavanje sa silvatičnom trihinelozom u Srbiji. U radu su prikazani rezultati ispitivanja raširenosti trihineloze kod pojedinih vrsta silvatičnih i sinantropnih životinja, sa ciljem utvrđivanja uloge divljih životinja u prirodnom ciklusu trihineloze u našoj zemlji.

Materijal i metode rada / Material and methods

Materijal za ova ispitivanja sakupljen je u lovištima na području Vojvodine u periodu od početka oktobra do kraja decembra 2011.god. Ukupno je izloženo 109 divljih svinja, 20 lisica i 12 šakala. Pregledan je uzorak tkiva dija-

fragme svih divljih životinja (ukupno 141 uzorak). U istom periodu prikupljeno je 14 pacova na farmi svinja na kojoj je ustanovljena trihinelozu i pregledani su uzorci muskulature svakog od njih. Prisustvo larvi *Trichinella* vrsta u svim uzorcima ispitano je metodom veštačke digestije prema Commission Regulation (EC) No 2075/2005. Od slobodnih mišićnih larvi trihinela dobijenih iz uzoraka tkiva dve lisice i jednog šakala metodom veštačke digestije, izolovan je DNK standardnim fenol-hloroform metodom ekstrakcije uz upotrebu proteinaze K (Sambrook i sar., 1989). Determinacija izolovanih mišićnih larvi izvršena je metodom lančane reakcije polimeraze PCR (Appleyard i sar., 1999). U reakciji su upotrebljena četiri seta prajmera koji omogućavaju diferencijaciju vrste i genotipa unutar genusa *Trichinella* (Zarlenga and Dame, 1992).

Rezultati / Results

Obdukcionim pregledom je ustanovljeno da su sve pregledane lisice roda crvena lisica (*Vulpes vulpes*), dok su svi pregledani šakali iz roda zlatni ili obični šakal (*Canis aureus*). Rezultati izloženi u tabelama 1, 2 i 3 prikazani su po opštinama, s tim da je Fruška gora kao specifičan habitat divljih životinja prikazana izdvojeno. Kod tri uzorka je utvrđeno prisustvo *Trichinella* spp., divlja svinja, šakal i lisica. Mišićne larve izolovane iz muskulature lisica i šakala determinisane su kao pripadnici vrste *T. spiralis*.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja prisustva trihinela kod uzoraka izlovljene divljači sa teritorije Vojvodine – divlje svinje /

Table 1. Results of examinations of the presence of trichinella in samples of captured wild animals from the territory of Vojvodine – wild boar

Vrsta divlje životinje / <i>Species of wild animal</i>	Opština / <i>Municipality</i>	Broj uzoraka / <i>Number of samples</i>	Pozitivno / <i>Positive</i>	Broj larvi u g / <i>Number of larvae in g</i>
Divlja svinja / <i>Wild boar</i> <i>Sus scrofa</i>	Bač	11	0	–
	B. Palanka	18	1	1100 larvi/larvae /g
	Bečej	9	0	–
	Pećinci	35	0	–
	Ruma	13	0	–
	Šid	1	0	–
	Fruška gora	22	0	–
Ukupno / <i>Total</i>	7	109	1	–

Ispitivanjem pacova sa farme pozitivne na trihinelozu kod 85,71% uzoraka je ustanovljen visok stepen zastupljenosti trihinele (tabela 4).

Tabela 2. Rezultati ispitivanja prisustva trihinela kod uzoraka izlovljene divljači sa teritorije Vojvodine – lisice /

Table 2. Results of examinations of the presence of trichinella in samples of captured wild animals from the territory of Vojvodine – foxes

Vrsta divlje životinje / Species of wild animal	Opština / Municipality	Broj uzoraka / Number of samples	Pozitivno / Positive	Broj larvi u g / Number of larvae in g
Crvena lisica / Red fox <i>Vulpes vulpes</i>	Novi Sad	3	0	–
	Bač	3	0	–
	Bačka Palanka	6	0	–
	Temerin	1	0	–
	Ruma	2	1	1 larva/larvae /g
	Šid	2	0	–
	Zrenjanin	1	0	–
	Kikinda	2	0	–
Ukupno / Total	8	20	1	–

Tabela 3. Rezultati ispitivanja prisustva trihinela kod uzoraka izlovljene divljači sa teritorije Vojvodine – šakali /

Table 3. Results of examinations of the presence of trichinella in samples of captured wild animals from the territory of Vojvodine-jackals

Vrsta divlje životinje / Species of wild animal	Opština / Municipality	Broj uzoraka / Number of samples	Pozitivno / Positive	Broj larvi u g / Number of larvae in g
Zlatni šakal / Golden jackal <i>Canis aureus</i>	Bač	3	0	–
	S. Mitrovica	1	0	–
	Pećinci	3	0	–
	Ruma	1	0	–
	Šid	1	0	–
	Fruška gora	3	1	3 larve/larvae /g
Ukupno / Total	6	12	1	–

Tabela 4. Rezultati ispitivanja prisustva trihinela kod uzoraka sinantropnih životinja /

Table 4. Results of examinations of the presence of trichinella in samples of synantropic animals

Vrsta sinantropne životinje / Species of synantropic animals	Opština / Municipality	Broj uzoraka / Number of samples	Pozitivno	Broj larvi u g / Number of larvae in g
Pacov / Rat <i>Rattus rattus</i>	Šid	14	12	900-1400 larve/larvae /g
Ukupno / Total	1	14	12	-

Diskusija / Discussion

U epizootiologiji trihineloze mogu se razmatrati dva osnovna načina održavanja i prenošenja parazita u prirodi. Jedan se odnosi na ciklus kod domaćih životinja, a drugi na silvatični ciklus. Otvoreno je pitanje koliko je silvatični ciklus nezavisan od ciklusa kod domaćih životinja i koliko su divlje životinje značajan izvor trihineloze za domaće životinje. Naravno, ne može se umanjiti ni direktan uticaj konzumiranja mesa divljači na pojavu trihineloze kod ljudi.

Osnovni pokazatelji silvatičnog ciklusa su prevalenca trihineloze kod različitih vrsta divljih životinja, stepen infestacije i vrsta trihinela. U silvatičnom ciklusu, prenošenje parazita pre svega se odigrava među karnivorima (lisice, vukovi, šakali), a u manjoj meri i među omnivorima (divlje svinje, medvedi i pacovi). Prirodni habitat i njegove karakteristike od odlučujućeg su uticaja na vrstu i ciklus *Trichinella* spp. u prirodi. Na teritoriji Srbije, kod divljih životinja su ustanovljene *T. spiralis* i *T. britovi* (Cvetković i sar., 2011). Opšte je prihvaćeno da je *T. spiralis* lako izaziva infestacije kod svinja i čoveka, dok *T. britovi* ima manji značaj i u pogledu infestacije za svinje i u pogledu patogenosti za čoveka (Enemark i sar., 2000). Klimatske prilike u Srbiji pogoduju opstanku i razvoju *T. spiralis* dok je prevalenca ove vrste trihinela u hladnim i tropskim krajevima veoma mala. U područjima sa visokom prevalencom trihinela kod divljih životinja, u organizmu jedne životinje mogu se naći dve vrste trihinela. Verovatno je da su takve jedinke tokom života više puta bile infestirane. U Španiji i Finskoj su kod istih jedinki utvrđene *T. spiralis* i *T. britovi*, u Finskoj i Švedskoj *T. nativa* i *T. spiralis*, u Estoniji i Poljskoj *T. nativa* i *T. britovi* (Murell i sar., 2000).

Glavni rezervoari *T. britovi* u Srbiji su crvena lisica, šakal, rakun, vuk i medved. Kod divljih svinja daleko se češće nalazi *T. spiralis* (Cvetković i sar., 2011). Nezavisno od etiološkog agensa i geografskog regiona, glavni rezervoar silvatičnih trihinela su karnivori koji imaju kanibalističko i strvinarsko ponašanje (Campbell, 1983). Do sada je crvena lisica bila glavni rezervoar silvatičnih trihinela kod nas, međutim mora se ukazati na sve značajniju ulogu šakala. Prisustvo šakala u Srbiji evidentno je od pre dvadesetak godina. Preko Karpata i sliva Dunava šakal je prvo naselio oblasti istočne Srbije da bi se zatim proširo do Beograda i dalje na teritoriju Vojvodine. Danas je populacija šakala veoma brojna, oni naseljavaju različite terene, mogu se naći na nižim planinama i otvorenim ravničarskim lovištima. Šakali se obično ulove prilikom lova na divlje svinje i drugu divljač. Povećanje brojnosti populacije šakala je dovelo do smanjenja broja srneće divljači i lisica. U našim ispitivanjima, obdukcionim pregledom je ustanovljeno da su izlovljene lisice na teritoriji Vojvodine iz roda crvena lisica (*Vulpes vulpes*), a šakali iz roda zlatni ili obični šakal (*Canis aureus*).

Prisustvo *Trichinella* spp. utvrđeno je kod jedne divlje svinje (1100 larvi/1 g), jednog šakala (3 larve/g) i jedne lisice (1 larva/1 g). Rezultati ukazuju na relativno visoku raširenost *Trichinella* spp. kod lisica (5%) i šakala (8,33%) na teritoriji Vojvodine. U zemljama kod kojih je trihinelozna domaćih životinja iskorenjena,

kao što je Danska, prevalenca silvatične trihineloze je vrlo niska (0,001%) (Ene-mark i sar., 2000). Takođe, stepen infestacije kod karnivora u Srbiji je mnogo veći u odnosu na Dansku (1 larva/10g). Prema našim ispitivanjima je kod karnivora u Srbiji ustanovljeno prisustvo *T. spiralis*. Prisustvo ove vrste trihinela kod divljih životinja je striktno vezano za prisustvo trihineloze kod domaćih životinja. Na rasprostranjenost *T. spiralis* direktno utiče prostorna bliskost habitata u kojim žive divlje i domaće životinje, odnosno *T. spiralis* se vrlo retko može naći kod divljih životinja koje žive daleko od naselja i farmi.

Ispitivanjem muskulature pacova prikupljenih tokom mera za suzbijanje i iskorenjivanje trihineloze sa jedne farme svinja u 85,71% uzoraka ustanovljeno je prisustvo *Trichinella* spp. Uloga pacova u epizootiologiji trihineloze je predmet diskusije u naučnim krugovima. Dok neki autori smatraju pacove glavnim rezervoarom trihinela, drugi podržavaju stav da su oni samo slučajni domaćini. *Trichinella* spp. se može naći samo kod pacova na farmama na kojima već postoji trihinelozna svinja ili na smetlištima gde se odbacuju ostaci trihineloznih svinja. Nema izveštaja o prisustvu trihinela kod pacova u oblastima u kojim nema silvatične ili trihineloze domaćih životinja. Danas se smatra da je trihinelozna pacova glavni marker infestacije kod svinja, a da su glavni rezervoar infekcije za obe vrste životinja neadekvatno uklonjeni ostaci trihineloznih svinja (Pozio i Zarlenga, 2005). Prema rezultatima naših ispitivanja, stepen infestacije pacova prikupljenih sa farmi na kojima postoji trihinelozna kod svinja izuzetno je visok (više od 900 larvi/g). S obzirom na to da se *T. britovi* retko može naći kod pacova, smatra se da oni nemaju bitnu ulogu u epizootiologiji trihineloze izazvane ovom vrstom, a samim tim i silvatične trihineloze (Murell i sar., 2000). Murell i sar. (1987) su dokazali da lisice, pacovi i druge sinantropne životinje predstavljaju vezu između silvatične i trihineloze domaćih životinja kada je u pitanju *T. spiralis*.

Trihinelozna domaćih životinja uglavnom je posledica grešaka u uzgoju, odnosno lošeg menadžmenta. Putevi prenošenja *Trichinella* spp. kod domaćih svinja su kanibalizam, ingestija sinantropnih i silvatičnih životinja, kao i fecesa svinja koje su inficirane 1-2 dana ranije. Silvatične vrste trihinela se mogu naći kod domaćih životinja, ali ovakve infestacije predstavljaju završetak silvatičnog ciklusa, jer se silvatični genotipovi trihinela ne mogu održavati u ciklusu domaćih životinja. Međutim, *T. spiralis* se može vratiti preko silvatičnih životinja na domaće. Ovakve situacije su posledica nepravilnog menadžmenta na farmama svinja, pri čemu divlje svinje imaju važnu ulogu u širenju infestacije. Prema rezultatima ovog ispitivanja, prevalenca trihineloze kod divljih svinja nije velika (0,82%), ali je utvrđen veoma visok stepen infestacije (1100 larvi/g). Prema Cvetković i sar. (2011), upravo se kod divljih svinja najčešće nalazi *T. spiralis*, a za nju su visoko prijemčive i domaće svinje i ljudi.

Ukoliko je prevalenca silvatične trihineloze u određenom geografskom području visoka, onda postoji značajan rizik za širenje infestacije na domaće svinje koje se napasaju u silvatičnim habitatima. Važan izvor infestacije domaćih svinja predstavlja i hranjenje ostacima divljih životinja. Epizootiološke

studije povezuju nalaz *T. britovi* kod domaćih svinja sa istim greškama u menadžmentu (Enemark i sar., 2000). Na širenje trihineloze u velikoj meri utiču loši socioekonomski uslovi, nedovoljna edukacija uzgajivača, odsustvo ili slaba veterinarska kontrola, nepravilno uklanjanje leševa životinja. Trihinelozna domaćih svinja je raširena u Srbiji i predstavlja značajan rizik za zdravlje ljudi (Đorđević i sar., 2003). Prikazani podaci ukazuju na to da je u mere kojima se redukuje trihinelozna u populaciji domaćih životinja neophodno uključiti i mere za sprečavanje širenja trihineloze sa domaćih svinja na silvatične životinje.

Literatura / References

1. Appleyard GD, Zarlenga DS, Pozio E, Gajadher AA. Differentiation of *Trichinella* Genotypes by polymerase Chain Reaction Using Sequence-Specific Primers. J Parasitol 1999; 85(3): 556-9.
2. Brglez J. The incidence of trichinellosis in some wild animals in Yugoslavia. In Proceedings of the Seventh International Conference of Trichinellosis. Alicante, Spain. 2-6.10.1988: 412-5.
3. Cambell WC. Epidemiology I. Modes of transmission. In: Cambeill W.C. *Trichinella* and *Trichinosis*. Plenum Press, New York, 1983: 425-44.
4. Commission Regulation (EC) No 2075/2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat.
5. Cvetković J, Teodorović V, Gianluca M, Vasilev D, Vasilev S, Ćirović D, Sofronić-Milosavljević LJ. First report of *Trichinella britovi* in Serbia. Acta Parasitologica 2011; 56(2): 232-5.
6. Čuperilović K, Lalić R, Ivanosvska D, Sofronić LJ, Đorđević M i sar. Epizootiology and prevalence of swine trichinellosis in an endemic locus in Yugoslavia. Acta Vet 1989; 39: 235-40.
7. Enemark H, Bjorn H, Henriksen S, Nielsen B. Screening for infection of *Trichinella* in red fox (*Vulpes vulpes*) in Denmark. Vet Parasitology 2000; 88(3-4): 229-37.
8. Đorđević M. Raširenost trihineloze svinja u nekim epizootskim područjima SR Srbije i poređenje pouzdanosti nekih direktnih metoda. Doktorska disertacija. Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija, 1989.
9. Đorđević M, Bačić M, Petričević M, Čuperilović K, Malakauskas A, Kapel C, Murrell K. Social, political and economic factors responsible for the reemergence of trichinellosis in Serbia: a case study. J Parasitology 2003; 89: 226-31.
10. Murell K, Stringfellow F, Dame J, Leiby D, Duffy C, Schad G. *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem. II Evidence for natural transmission of *Trichinella spiralis* from domestic swine to wildlife. J Parasitology 1987; 73:103-9.
11. Murrell K, Lichtenfels R, Zarlenga D, Pozio E. The systematics of the genus *Trichinella* with key to species. Vet Parasitol 2000; 93(3-4): 293-307.
12. Nagano I, Matsuo W, Pozio E, Takahashi Y. Identification of *Trichinella* genotypes by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. Int J Parasitol 1999; 29: 1113-20.
13. Pozio E, Zarlenga D. Recent advances on the taxonomy, systematic and epidemiology of *Trichinella*. Int J Parasitol 2005; 35(11-12): 1191-204.

14. Pozio E. World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet Parasitol* 2007; 149: 3-21.
15. Sambrook I, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning A laboratory manual* 2nd. ed. Cold Spring Harbour. New York. Appendix E, 1989, 3p.
16. Tešić M, Baltić M, Božić D, Stojiljković Lj, Plavšić B, Tajdić N, Mirilović M, Rajković M. Effects of the application of trichinellosis control program in an endemic area in Serbia. *Acta Veterinaria* 2011; 61(1): 77-87.
17. Zarlenga DS, Dame JB. The identification and characterisation of a break within the large subunit ribosomal RNA of *T. spiralis*. Comparison of gap sequences within the genus *Trichinella* and *Biochemical parasitology* 1992; 51: 281-9.

ENGLISH

SYLVATIC TRICHINOSIS – ROLE OF WILD ANIMALS IN CYCLE OF SPREAD OF TRICHINOSIS IN SERBIA

Jelena Petrović, I. Pušić, Jelena Apić, Dubravka Milanov, Ž. Grgić, Vesna Đorđević, Vesna Matekalo-Šverak

Trichinosis is a parasitic zoonosis that is caused by parasitic larvae of the genus *Trichinella*. Serbia is among the countries in which *T. spiralis* is present, in addition to domestic animals, also in synanthropic and sylvatic animals. This paper presents the results of investigations of the spread of trichinosis among certain species of sylvatic and synanthropic animals, with the aim to establish the role of wild animals in the natural cycle of trichinosis in this country. A total of 155 samples of wild boar, foxes, jackals, and rats were analysed. The samples were investigated through the artificial digestion method using a magnetic stirrer in keeping with Commission Regulation (EC) No 2075/2005. The isolated muscle larvae were determined using the method of polymerase chain reaction (PCR). The investigations established a relatively high prevalence of trichinosis in foxes (5%) and jackals (8.33%) in the territory of Vojvodina. The degree of infestation among carnivora in Serbia (10-30 larvae/10g) is much higher than in countries where there is no trichinosis among domestic animals. The prevalence of trichinosis among wild boar is not high, 0.82%, but a very high degree of infestation was established in these animals (1100 larvae/g). According to our results, the prevalence of trichinosis and the degree of infestation in rats collected from pig farms with established trichinosis is extremely high, the prevalence is higher than 80% with a degree of infestation of 900 larvae/g. The isolated muscle larvae were determined as belonging to the species *T. spiralis*. The spread of trichinosis is affected to a large degree by poor socioeconomic conditions, inadequate education of breeders, the absence of or unsatisfactory veterinary control, irregular animal carcass removal. Trichinosis of domestic swine is widespread in Serbia and it poses a significant risk to human health. The presented data indicate that it is necessary to include measures for preventing the spread of trichinosis from domestic swine to sylvatic animals among the measures that are being implemented to cut down trichinosis among domestic animals.

Key words: trichinella, sylvatic and synanthropic animals

РУССКИЙ

**СИЛВАТИЧНЫЙ ТРИХИНЕЛЛЁЗ
РОЛЬ ДИКИХ ЖИВОТНЫХ В ЦИКЛЕ РАСШИРЕНИЯ ТРИХИНЕЛЛЁЗА В СЕРБИИ**

**Елена Петрович, И. Пушич, Елена Апиц, Дубравка Миланов, Ж. Гргич,
Весна Джорджевич, Весна Матекало-Шверак**

Трихинеллёз паразитарный зооноз, вызывающий личинки паразита из рода *Trichinella*. Сербия относится к странам в которых *T. spiralis* возле домашних животных, присутствующая у синантропных и силватичных животных. В работе показаны результаты расширенности траихинеллёза у некоторых видов силватичных и синантропных животных, с целью утверждения роли диких животных в природном цикле трихинеллёза в нашей стране. Совокупно испытано 155 образчиков кабанов, лисиц, шакалов и крыс. Образчики испытаны методом искусственной дигестии при помощи магнетной мешалки согласно Commission Regulation (EC) NO 2075/2005. Детерминация изолированных мышечных личинок совершена методом цепной реакции полимеразы (ЦРП). Совершенными испытаниями установлена относительно высокая превалентность трихинеллёза у лисиц (5%) и шакалов (8,33% на территории Воеводины. Степень инвазии у мясных в Сербии (10-30 личинок/10 г) много более большая в отношении стран в которых нет трихинеллёза домашних животных. Превалентность трихинеллёза диких свиней не большая 0,82% между тем у них утверждена очень большая степень инфекации (1100 личинок/г). Согласно нашим результатам превалентность трихинеллёза и степень инфекации крыс собранных с ферм на которых существует трихинеллёз свиней исключительно большая, превалентность больше 80% с степенью инфекации от 900 личинок/г. Изолированные мышечные личинки детерминированы как принадлежащие виду *T. spiralis*. На расширение трихинеллы в большой мере влияют плохие социальноэкономические условия, недостаточное образование людей, разводящих животных, отсутствие или слабый ветеринарный контроль, неправильное устранение трупов животных. Трихинеллёз домашних свиней расширен в Сербии и представляет собой значительный риск для здоровья людей. Показаны данные указывают, что в меры, которыми редуцируется трихинеллёз в популяции домашних животных необходимо включить и меры для предупреждения расширения трихинеллёза с домашних свиней на силватичные животные.

Ключевые слова: трихинелла, силватичные и синантропные животные

**ISPITIVANJE PODNOŠLJIVOSTI PRODUŽENE PERORALNE
PRIMENE EUGENOLA KOD PACOVA******THE ASSESSMENT OF TOLERABILITY OF PROLONGED ORAL
EUGENOL ADMINISTRATION IN RATS***

Milanka Jezdimirović, Nevenka Aleksić, S. Trailović, S. Ivanović,
N. Jezdimirović**

Ispitivana je potencijalna toksičnost, odnosno opšta podnošljivost eugenola posle dvonedeljne i četvoronedeljne kontinuirane p.o. primene. Ogled je izveden na 72 mužjaka pacova soja vistar. Četiri grupe pacova tretirane su različitim dozama eugenola (10 mg/kg tm/dan, 50 mg/kg, 200 mg/kg i 400 mg/kg tm/dan), peta grupa dobijala je vehikulum (0,5 % metil-celuloza, propilen-glikol i voda), a šesta je bila kontrolna grupa. Odgovarajuće doze eugenola i vehikuluma aplikovane su gastričnom sondom u volumenu od 1 ml/100 g telesne mase. Opšta podnošljivost eugenola procenjivana je na osnovu dnevnog unosa vode i hrane, telesne mase, opšteg zdravstvenog stanja, ponašanja i letaliteta tokom ogleda.

U ispitivanim dozama eugenol primenjivan p.o. tokom dve ili četiri nedelje ne utiče značajno na unos hrane, vode i telesnu masu pacova. Doza od 400 mg/kg/dan dovela je do neželjenih reakcija (uznemirenost i hiperestezija) koje su prvi put zapažene 21. dana i trajale su do kraja ogleda.

Ustanovljena je niska subakutna toksičnost eugenola posle p.o. primene kod pacova. Doze eugenola od 200 i 400 mg/kg tm/dan imaju nizak toksični potencijal i bezbedne su za primenu kod ove vrste životinja.

Ključne reči: eugenol, toksičnost, pacov, unos hrane i vode

* Rad primljen za štampu 07. 10. 2011. godine

** Dr sc. med. vet. Milanka Jezdimirović, red. profesor, dr sc. med. vet. Nevenka Aleksić, red. profesor, dr sc. med. vet. Saša Trailović, vanr., profesor, mr sc. med. vet. Saša Ivanović, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; Nemanja Jezdimirović, dipl. vet., Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

Uvod / Introduction

Savremeni pristup kontroli zdravlja životinja zasnovan je, između ostalog, na ograničenoj primeni antibakterijskih i antiparazitskih lekova. Osim unapređenja dobrobiti životinja, ovim se postižu još dva cilja: dobija se hrana za ljude bez rezidua lekova i smanjuje se kontaminacija životne sredine lekovima i njihovim metabolitima koje eliminišu tretirane životinje.

Upotreba ekstrakta biljaka, esencijalnih ulja i bioaktivnih molekula može da smanji incidenciju bakterijskih, gljivičnih, parazitskih i virusnih infekcija kod životinja, ali i da obezbedi veće proizvodne rezultate i bolji kvalitet mesa i mleka. Veliki broj biljaka i njihovih bioaktivnih jedinjenja može se koristiti kao zoaditivi jer povećavaju konzumiranje, svarljivost i konverziju hrane kod životinja. Mnoge vrste biljaka ili njihovih ekstrakata upotrebljenih u ishrani životinja omogućavaju optimalan masnokiselinski sastav animalnih proizvoda, što je od suštinskog značaja za unapređenje zdravlje ljudi (Grdovic i sar., 2010).

Određene začinske i lekovite biljke, kao što su cimet, karanfilić i slačica, imaju snažnu antibakterijsku aktivnost i efikasnost. Ona je nešto slabija kod kumina, origana, žalfije, majčine dušice i ruzmarina, a sasvim slaba kod bibera i đumbira. Ove biljke i njihova eterična ulja deluju na brojne vrste mikroorganizama, kontaminenata hrane namenjene ljudima i životinjama (Beuchat, 1994; Nakatani, 1994; Smith-Palmer i sar., 1998; Hara-Kudo i sar., 2004; Škrinjar i Nemet, 2009).

Dokazana je antimikrobna aktivnost aktivnih komponenti esencijalnih ulja začinskih i lekovitih biljaka: eugenola iz karanfilića, timola iz majčine dušice i origana, karvakrola iz origana, vanilina iz vanile, alicina iz belog luka, cinamaldehida iz cimeta i alil-izotiocijanata iz senfa (Lopez-Malo i sar., 2006). Do sada su opisana brojna farmakološka dejstva eugenola i srodnih jedinjenja (metil-eugenol, izo-eugenol). Za veterinarsku praksu značaj imaju antibakterijsko (Ratajac, 2005; Chaieb i sar., 2007; Seed i Tariq, 2008), antigljivično (Chami i sar., 2004, 2004a; Choi, 2005) i antiparazitsko (Asha i sar., 2001; Pessoa i sar., 2002; Yang i sar., 2003; Kim i sar., 2003; Jezdimirović i sar., 2006; Jezdimirović i sar., 2010; Aleksić i sar., 2011) dejstvo.

S obzirom na široku mogućnost primene eugenola u veterinarskoj medicini, kako za prevenciju tako i za lečenje bolesti različite etiologije, ovo ispitivanje izvedeno je sa ciljem da se ustanovi njegova subakutna peroralna toksičnost, odnosno bezbednost primene kod pacova. Utvrđivanje doza eugenola koje prouzrokuju neželjene i toksične efekte omogućava sagledavanje toksikološkog profila ovog zoaditiva i potencijalnog leka.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Ispitivanje opšte podnošljivosti, odnosno toksikološkog profila eugenola, izvedeno je na ukupno 72 pacova muškog pola soja vister, uzrasta oko dva meseca i prosečne telesne mase $227,02 \pm 26,37$ g.

Adaptacija životinja pre početka eksperimenta trajala je sedam dana, posle čega su metodom slučajnog izbora podeljene u šest jednakih grupa. Četiri grupe tretirane su različitim dozama eugenola, peta je dobijala vehikulum, a šesta nije bila tretirana.

Pacovi su bili smešteni u kavezima od pleksiglasa (po šest životinja u svakom kavezu), u prostoriji sa prirodnim svetlošću, temperaturom 18° - 24° C i relativnom vlažnošću vazduha 50-70 %. Hranjeni su peletiranom hranom za pacove (Veterinarski zavod Subotica a.d, Subotica). Hrana i voda bile su im na raspolaganju bez ograničenja.

Tokom oglada sa životinjama je postupano u skladu sa etičkim principima Pravilnika o radu sa životinjama na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu (2008).

Eugenol je aplikovan u dozama od 10 mg/kg telesne mase (I grupa), 50 mg/kg tm (II grupa), 200 mg/kg tm (III grupa) i 400 mg/kg tm (IV grupa), peroralno, svakodnevno, tokom četiri nedelje. Etanolni 50 % rastvor eugenola (Essentico, Kula) razblaživan je metil-celulozom (sa udelom mase od 0,5 %), propilen-glikolom (20 %) i vodom do rastvora koji u volumenu od 100 ml sadrži 100 mg, 500 mg, 2000 mg i 4000 mg eugenola. Volumen odgovarajućeg rastvora eugenola i vehikuluma aplikovani su gastričnom sondom u količini od 1 ml/100 g telesne mase pacova.

Kontrolna grupa pacova dobijala je vehikulum, koji se sastoji od metil-celuloze, etanola, propilen-glikola i prečišćene vode, u dozi od 1 ml/100 g telesne mase. Kontrolna grupa pacova nije tretirana niti jednom supstancom.

U cilju provere opšte podnošljivosti i peroralne subakutne toksičnosti eugenola ispitan je njegov uticaj na:

- dnevni unos vode i hrane,
- telesnu masu pacova,
- opšte zdravstveno stanje, ponašanje i letalitet pacova.

Unos hrane i vode meren je svaki drugi dan, a telesna masa pacova svaki dan neposredno pre aplikacije eugenola, odnosno vehikuluma.

Telesna masa pacova merena je elektronskom vagom VLC B1 (Radwag, Poljska).

Rezultati su obrađeni primenom mera varijacije (srednja vrednost, standardna devijacija, standardna greška aritmetičke sredine). Za testiranje statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti ispitivanih parametara između grupa pacova primenjena je analiza varijanse i Tukey test. Za promenu unosa hrane i vode i telesne mase u funkciji vremena određeni su koeficijenti korelacije. Statistička obrada podataka urađena je primenom Excell 2007 (MS Office 2007, Microsoft Corporation).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Uticaj eugenola na unos hrane kod pacova /

The influence of eugenol on food intake in rats

Prosečan unos hrane, izražen na 100 g telesne mase, smanjivao se u svim grupama pacova tokom ispitivanja (tabela 1).

Tabela 1. *Prosečan dnevni unos hrane kod kontrolnih pacova i tretiranih eugenolom (g/100 g tm)*

Table 1. *The average daily food intake in control rats and those treated with eugenol (g/100 g bm)*

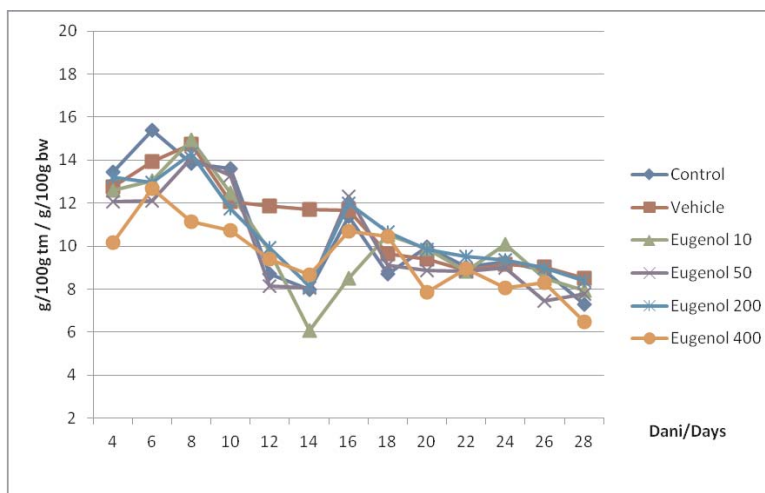
Tretman/Treatment	Dani / Days				
	1	7	14	21	28
Apsolutna kontrola / <i>Absolute control</i>	13,44	14, 43	7,98	9,50	7,29
Vehikulum / <i>Vehicle</i>	12,75	14,32	11,71	9,15	8,50
Eugenol 10 mg/kg	12,58	14,00	6,09	9,36	7,95
50 mg/kg	12,05	13,11	8,07	8,85	7,77
200 mg/kg	13,19	13,62	8,13	9,68	8,38
400 mg/kg	10,16	11,91	8,68	8,40	6,48

Eugenol primenjivan u različitim dozama nije statistički značajno uticao na količinu unete hrane: prosečan dnevni unos kretao se u rasponu od 6,48 do 14,43 g/100 g telesne mase.

Prosečan dnevni unos hrane kod kontrolnih pacova u ovom ogledu ne razlikuje se bitno od podataka koje su dobili Harkness i Wagner (1989) (od 10 do 14,2 g hrane/100 g tm/dan) tokom jednogodišnjeg ispitivanja. Takođe, naš nalaz je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju na to da najviša ispitivana doza eugenola, koja je tri do sedam puta manja od akutne peroralne LD 50 za pacova, kao ni niže testirane doze, ne utiču značajno na prosečan unos hrane kod ove vrste životinja (<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je09.pdf>; <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je10.htm>).

Prosečan unos hrane kod kontrolnih pacova (AK, K) i pacova tretiranih eugenolom tokom četiri nedelje nije se značajno razlikovao (slika 1).

Najmanji prosečan unos hrane tokom ogleda zabeležen je kod pacova tretiranih najvišom dozom eugenola: od 10,16 g/100 g tm (1. dan) do 6,48 g/100 g tm (28. dan) (tabela 1, slika 1). Vrlo je verovatno da je ova pojava posledica kontinuiranog lokalnog nadražajnog dejstva eugenola na sluznicu želuca, odnosno razvoja gastritisa praćenog povećanom sekrecijom gastričnih žlezda (hiperaciditet, pojačana aktivnost tripsina) (EMEA, 1998). Slične promene u želucu pacova prouzrokovao je metil-eugenol primenjivan p.o. tokom trideset dana u doznom rasponu od 37 do 150 mg/kg/dan (Abdo i sar., 2001).



Slika 1. Prosečan unos hrane kod kontrolnih pacova i tretiranih eugenolom /
Figure 1. The average food intake in control rats and those treated with eugenol

Smanjenje dnevnog unosa hrane zabeleženo u poslednjoj nedelji oglada u direktnoj je vezi sa smanjenim dnevnim unosom vode, što je već ranije bilo zapaženo (Crampton i Lloyd, 1954).

Koeficijent korelacije između prosečnog unosa hrane po jedinici telesne mase pacova i vremena proteklog od početka oglada bio je visok u svim grupama ($p < 0,01$). U kontroli iznosio je $r = -0,80$, u grupi tretiranoj vehikulumom $r = -0,92$, u grupi tretiranoj eugenolom u dozi od 10 mg/kg $r = -0,67$, dozom od 50 mg/kg $r = -0,74$, 200 mg/kg $r = -0,79$ i $r = -0,81$ u grupi pacova tretiranoj eugenolom u dozi od 400 mg/kg.

Uticaj eugenola na unos vode kod pacova / *The influence of eugenol on water intake in rats*

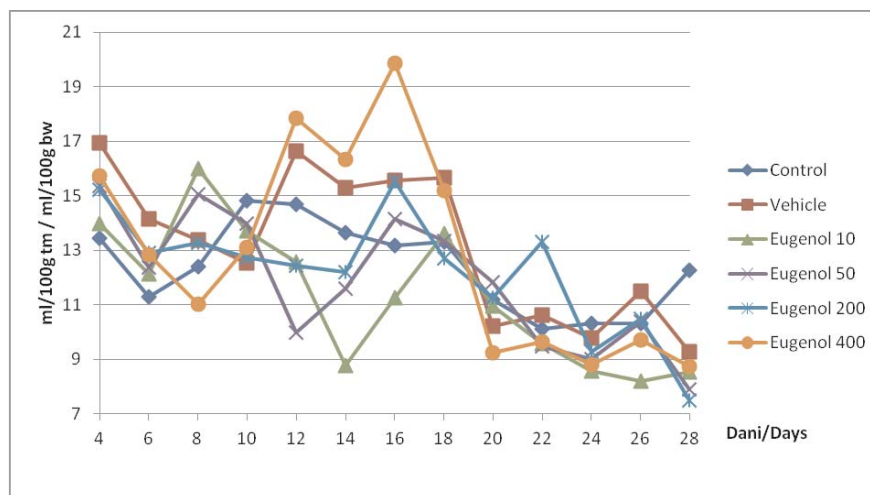
Prosečan unos vode u kontrolnoj i svim oglednim grupama pacova nije se statistički značajno razlikovao tokom trajanja oglada (tabela 2 i slika 2).

U kontrolnoj grupi pacova prosečan unos vode kretao se od 9,45 do 14,37 ml/100 g tm, u kontrolnoj grupi sa vehikulumom od 9,23 do 15,30 ml/100 g tm. U grupi pacova koja je dobijala eugenol u dozi od 10 mg/kg tm prosečan unos vode iznosio je od 8,54 do 14,63 ml/100 g tm, u grupi koja je dobijala dozu od 50 mg/kg tm od 7,91 do 14,06 ml/100 g tm, u grupi tretiranoj eugenolom u dozi od 200 mg/kg tm od 7,49 do 15,49 ml/100 g tm, a u grupi tretiranoj najvišom dozom eugenola, 400 mg/kg tm, prosečan unos vode kretao se od 8,73 do 16,33 ml/100 g tm tokom perioda ispitivanja (tabela 2).

U periodu od 12. do 18. dana ogleda prosečan unos vode kod pacova tretiranih najvišom dozom eugenola znatno se povećao u odnosu na sve ostale grupe. Dvanaestog dana iznosio je 17,83 ml/100 g tm, 14. dana 16,33 ml, 16. dana 19,86 ml i 18. dana 15,20 ml/100 g tm. Posle ovog perioda prosečan unos vode značajno se smanjivao do kraja ispitivanja. Slično smanjenje zabeleženo je od 20. dana do kraja ogleda i u grupi pacova tretiranoj eugenolom u dozi od 200 mg/kg, 50 mg/kg i 10 mg/kg tm (tabela 2, slika 2).

Tabela 2. Prosečan unos vode (ml/100 g tm) kod kontrolnih pacova i tretiranih eugenolom
Table 2. The average water intake (ml/100 g BM) in control and rats treated with eugenol

Tretman / Treatment	Dani / Days				
	1	7	14	21	28
Kontrola / Control	14,37	11,93	13,64	9,45	12,26
Vehikulum / Vehicle	14,12	13,08	15,30	12,28	9,23
Eugenol 10 mg/kg	14,63	13,71	8,75	10,66	8,54
Eugenol 50 mg/kg	13,62	14,06	11,59	10,26	7,91
Eugenol 200 mg/kg	15,49	13,76	12,20	10,41	7,49
Eugenol 400 mg/kg	13,40	11,86	16,33	10,66	8,73



Slika 2. Prosečan unos vode kod kontrolnih pacova i tretiranih eugenolom /
Figure 2. The average water intake in control rats and those treated with eugenol

Smanjen unosa vode nije zavisio od veličine doze eugenola, te se ne može pripisati njegovom toksičnom dejstvu. Prosečan dnevni unos vode u ovom

ispitivanju nije se bitno razlikovao od ranije objavljenih podataka za odrasle pacove soja vistar (Harkness i Wagner, 1989; Hau i Van Hoosier, 2002).

Koeficijent korelacije između prosečne količine unete vode po jedinici telesne mase pacova i vremena proteklog od početka oglada bio je umeren do visok u svim grupama ($p < 0,05$). U kontrolnoj grupi iznosio je $r = -0,53$, u grupi tretiranoj vehikulom $r = -0,78$, u grupi tretiranoj eugenolom u dozi od 10 mg/kg $r = -0,76$, dozama od 50 i 200 mg/kg $r = -0,78$ i $r = -0,56$ u grupi pacova tretiranoj dozom eugenola od 400 mg/kg.

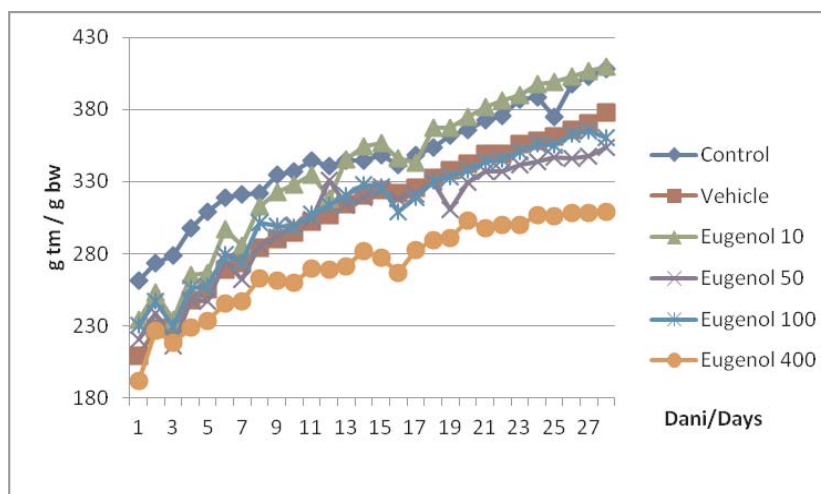
Uticaj eugenola na telesnu masu pacova / *The influence of eugenol on body weight in rats*

Prosečna telesna masa pacova u eksperimentu i najvažniji statistički parametri koji ih definišu prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Prosečna telesna masa pacova tokom oglada
Table 3. The average rat body mass throughout the research

Tretman / Treatment	Dan / Day	$\bar{X}$	SD	SE	IV
Kontrola / Control	1	261.50	11.72	3.71	244-284
	7	320.80	19.54	6.18	290-350
	14	344.60	22.50	7.12	300-374
	21	372.40	19.49	8.72	340-390
	28	422.40	29.64	13.26	388-460
Vehicle	1	209.00	24.24	7.67	180-240
	7	273.80	23.69	7.49	226-302
	14	320.20	24.85	7.86	264-350
	21	342.40	24.35	10.89	306-366
	28	385.20	30.55	13.66	348-418
Eugenol 10 mg/kg	1	233.83	18.77	5.42	210-280
	7	285.33	23.79	6.87	250-340
	14	354.17	24.37	7.03	322-406
	21	375.67	19.99	8.16	354-394
	28	414.00	27.07	11.05	382-452
Eugenol 50 mg/kg	1	220.83	20.65	5.96	190-250
	7	262.24	24.45	7.06	212-300
	14	319.00	25.63	7.40	270-352
	21	329.33	36.74	15.00	284-384
	28	359.60	52.56	23.51	280-414
Eugenol 200 mg/kg	1	230.17	18.02	5.20	200-270
	7	274.00	24.86	7.18	226-320
	14	327.83	31.35	9.05	280-386
	21	338.00	37.39	15.27	302-384
	28	364.67	37.90	15.47	324-410
Eugenol 400 mg/kg	1	192.00	5.06	2.07	186-200
	7	246.67	32.71	7.71	184-300
	14	281.72	37.14	8.75	216-342
	21	302.67	38.41	11.09	232-372
	28	314.00	30.43	8.78	274-382

Prosečna telesna masa pacova kontrolne grupe i onih tretiranih eugenolom i vehikulom imala je pozitivan trend (tabela 3, slika 3).



Slika 3. Prosečna telesne masa kontrolnih pacova i tretiranih eugenolom tokom ogleda /
Figure 3. The average body mass in control rats and those treated with eugenol throughout the experiment

Na početku ispitivanja prosečna telesna masa pacova tretiranih eugenolom u dozi od 10 mg/kg tm iznosila je 233,83 g, dozom od 50 mg/kg 220,83 g, od 200 mg/kg (230,17 g), a najvišom dozom eugenola (400 mg/kg) 192,00 g. Do kraja ispitivanja razlike u telesnoj masi pacova tretiranih različitim dozama eugenola ostale su srazmerne vrednostima prvog dana ispitivanja.

Telesna masa pacova kontrolnih grupa se povećavala vremenom bez značajnih varijacija. Eugenol primenjivan u dozama od 10, 50 i 200 mg/kg tm neznatno je uticao na telesnu masu pacova. Izuzetak predstavlja najviša ispitivana doza, 400 mg/kg, koja prouzrokuje značajno smanjenje prirasta telesne mase u poređenju sa kontrolama, ali ne i sa nižim dozama eugenola (slika 3).

Naši rezultati ispitivanja uticaja eugenola na prirast telesne mase pacova tokom 28 dana uglavnom su u saglasnosti sa odgovarajućim iz relevantne literature koji su dobijeni sa komparabilnim ili nekoliko puta većim dozama eugenola primenjivanim tokom različitih vremenskih perioda. Ustanovljeno je, na primer, da eugenol davan u hrani tokom tri meseca u dozi od 89,7 mg/kg ne utiče na telesnu masu pacova (Trubek Laboratories, 1958), kao ni u dozi od 800 mg/kg/dan ako se primenjuje tokom tri meseca (<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je10.htm>).

Slični rezultati dobijeni su posle primene eugenola u hrani u dozi većoj od 1000 mg/kg/dan tokom 133 dana (Hagan i sar., 1967), kao i posle primene doza od 1400 do 4000 mg/kg tokom mesec dana (Hagan i sar., 1965; 1967).

Naš nalaz da najviša testirana doza eugenola, 400 mg/kg, primenjena tokom četiri nedelje prouzrokuje značajno smanjenje prirasta telesne mase u odnosu na netretirane pacove u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora koji su dokazali da eugenol primenjivan u dozi od 250 i 500 mg/kg tm/dan tokom deset dana prouzrokuje dozno zavisno smanjenje prirasta kod pacova (Rompelberg, 1993). Smanjeni prirasta telesne mase za 10 do 15 % uočen je posle tromesečnog tretiranja pacova eugenolom u dozi od 1250 mg/kg (NTP, 1983) i posle jednomesečnog tretmana dozom od 2000 mg/kg tm (Hirose i sar, 1987).

Uticaj eugenola na ponašanje i preživljavanje pacova / *The influence of eugenol on rat behavior and survival*

Ispitivanje podnošljivosti eugenola tokom četvornedeljne primene podrazumevalo je praćenje ponašanja i preživljavanja tretiranih pacova. Ustanovljeno je da eugenol primenjivan u dozama od 10, 50 i 200 mg/kg tm ne utiče na ponašanje pacova. Međutim, najviša ispitivana doza (400 mg/kg/dan) prouzrokovala je uznemirenost i preosetljivost (hiperestezija), što je zapaženo prilikom hvatanja i sputavanja pacova u cilju aplikacije eugenola. Ove promene u ponašanju prvi put su uočene posle tri nedelje od početka svakodnevne aplikacije leka.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu rezultata ispitivanja podnošljivosti, odnosno stepena toksičnosti eugenola primenjivanog p.o. kod pacova tokom 14 i 28 dana, mogu da se izvedu određeni zaključci.

Eugenol primenjivan tokom 14 i 28 dana u dozama od 10, 50, 200 i 400 mg/kg ne utiče značajno na unos hrane i vode, niti na telesnu masu pacova.

Niže testirane doze eugenola (10, 50 i 200 mg/kg) primenjivane tokom 28 dana ne prouzrokuju uginuće, neželjene reakcije niti promene u ponašanju pacova. Najveća ispitivana doza eugenola, 400 mg/kg, prouzrokuje povećanu osetljivost pacova na dodir i uznemirenost počev od 21. dana primene.

Pacovi dobro podnose produženu p.o. primenu eugenola. Njegova subakutna peroralna toksičnost kod pacova je niska, a doze od 200 i 400 mg/kg mogu da se smatraju bezbednim.

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 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. Abdo KM, Cunningham ML, Snell ML, Herbert RA, Travlos GS, Eldridge SR, Bucher JR. 14-Week toxicity and cell proliferation of methyleugenol administered gavage to F344 rats and B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 303-16.
2. Aleksić N, Jezdimirović M, Jezdimirović N. On the efficacy of eugenol in the treatment of sheep mange, 19th International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants (Femesprum), Belgrade 2011, Congress Proceedings, 322-7.
3. Asha MK, Prashanth D, Murali B, Pdmja R, Amit A. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. *Fitoterapia* 2001; 72: 669-70.
4. Beuchat LR. Antimicrobial properties of spices and their essential oils. In: Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation. Y M Dillon and R G Board (editors), CAB International, Oxon, 1994; 167-79.
5. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi A, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*) *Phytother Res* 2007; 21: 501-6.
6. Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrob Chemother* 2004a; 54: 909-14.
7. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *BJID* 2004; 8(3): 217-26.
8. Choi IG. Antifungal compounds from several essential oils against dermatophytes. *China Wood Sci Res.* 2005; 8: 28-34.
9. Crampton EW, Lloyd LE. The effect of water restriction on the food intake and food efficiency of growth rats. *J Nutrition* 1954; 54: 221-4.
10. CVMP EMEA/MRL/406/98 Final Caryophylli aetheroleum summary report, 1998.
11. Eugenol, <http://chemicalland21.com/specialtychem/perchem/EUGENOL.htm>. Accessed Oct 4, 2011.
12. Eugenol, <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je10.htm>.
13. European Medicines Agency. Assessment report on *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et L.M. Perry, flos and *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et LM Perry, floris aetheroleum, 2011, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal/_HMPC_assessment_report/2011/03/WC500104268.pdf.
14. Grdović S, Šefer D, Petrujkić B. Uticaj biljnih ekstrakata dodatih u hranu na proizvodne i reproduktivne rezultate preživara. *Vet. glasnik* 2010; 64(3-4): 207-18.
15. Hagan EC, Hansen WH, Fitzhugh OG, Jenner PM, Jones WI, Taylor JM, Long EL, Nelson AA, Brouwer JB. Food flavorings and compounds of related structure II. Subacute and chronic toxicity. *Food Cosmet Toxicol* 1967; 5: 141-57.
16. Hagan EC, Jenner PM, Jones WH, Fitzhugh OG, Long EL, Brouwer JG, Webb WK. Toxic properties of compounds related to safrole. *Toxicol Appl Pharmacol* 1965; 7: 18-24.
17. Hara-Kudo Y, Kobayashi A, Sugita-Konishi Y, Kondo K. Antibacterial activity of plants used in cooking for aroma and taste. *J Food Protect* 2004; 67: 2820-4.
18. Harkness JE, Wagner JE. The Biology and Medicine of rabbits and rodents, 3rd Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1989.

19. Hau J, Van Hoosier GL. Jr (Editors) Handbook of Laboratory animal Science, 2nd Ed: Animal Models, Volume II, CRC Press, Boca Raton, 2002.
20. Hirose M, Masuda A, Imaida K, Kagawa M, Tsuda H, Ito N. Induction of forestomach lesions in rats by oral administrations of naturally occurring antioxydants for 4 weeks. Jpn J Cancer Res 1987; 78: 317-21.
21. Jezdimirović M, Aleksić N, Radojičić B. Komparativno ispitivanje efikasnosti eugenola i benzil-benzoata u terapiji šuge ovaca. Veterinarski glasnik 2010; 64(3-4): 177-85.
22. Jezdimirović M, Kulišić Z, Aleksić N, Bjelić N, Ivanović S. Efikasnost eugenola u lečenju šuge svinja. Veterinarski glasnik 2006; 60: 33-42.
23. Kim EH, Kim HK, Ahn YJ. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphoidea). J Agric Food Chem 2003; 51: 885-9.
24. López-Malo A, Barreto-Valdivieso J, Palou E, Martin FS. Aspergillus flavus growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. Food Control 2006; 18: 1358-62.
25. Methyleugenol, Report on carcinogenesis, Twelfth Edition, 2011, <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/Methyleugenol.pdf>, Accessed Oct 4 2011, 15:45.
26. Nakatani N. Antioxidative and antimicrobial constituents of herbs and spices. In: Spices, Herbs and Edible Fungi. Ed. G. Charalambous, Elsevier Science, New York, 1994: 251-71.
27. NTP: Carcinogenesis studies of eugenol (CAS No. 97-53-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed studies), US Department of Health and Human Services, December 1983.
28. Pessoa LM, Morais SM, Berilaqua CML, Luciano JHS. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 2002; 109: 59-63.
29. Pravilnik o radu sa životinjama na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd 2008.
30. Ratajac R. Ispitivanje efikasnosti eugenola u preveniranju i lečenju infekcija brojlera izazvanih sa *Salmonella enteritidis*. Specijalistički rad, Beograd, 2005.
31. Rompelberg CJM, Verhagen H, van Blander PJ. Effect of the naturally occurring alkylbenzenes eugenol and transanetole on drug metabolizing enzymes in rat liver. Food Chem Toxicol 1993; 31: 637-45.
32. Seed S, Tariq P. *In vitro* antibacterial activity of clove against gram negative bacteria. Pak J Bot 2008; 41: 2157-60.
33. Sipes IG, Mattia A. Eugenol, Related Hydroxyallylbenzene Derivatives. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v56je09.pdf>.
34. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett Appl Microbiol 1998, 26: 118-22.
35. Škrinjar M, Nemet N. Antimicrobial effects of species and herbs essential oils. APTEFF 2009; 40: 195-209.
36. Trubek Laboratories Inc. Toxicological screening of eugenol, p-methoxybenzaldehyde and piperonal in rats. Class IX: Aromatic aldehydes. Unpublished report to the Flavor and extract manufacturers of the USA. Submitted to WHO by the Flavor and extract manufacturers association of the United States, Washington DC, USA, 1958.

37. Yang YC, Lee SH, Lee WJ, Choi DH, Ahn Yj. Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. J Agric Food Chem 2003; 51: 4884-8.

ENGLISH

THE ASSESSMENT OF TOLERABILITY OF PROLONGED ORAL EUGENOL ADMINISTRATION IN RATS

Milanka Jezdimirović, Nevenka Aleksić, S. Trailović, S. Ivanović, N. Jezdimirović

The potential toxicity and general tolerability of eugenol following two-week or four-week continuous p.o. administration to rats has been investigated. An experiment was performed on 72 male rats of the Wistar strain. Four groups of rats were treated with different doses of eugenol (10 mg/kg bm/day, 50 mg/kg, 200 mg/kg and 400 mg/kg bm/day), the fifth group was administered vehicle (0.5 % methylcellulose, propylene glycol and water), and the sixth group comprised absolutely untreated controls. The corresponding doses of eugenol and vehicle were applied using a gastric probe in a volume of 1 ml/100 g body mass. The general tolerability of eugenol was evaluated on the basis of the daily intake of water and food, body mass, general health condition, behaviour, and lethality in the course of the experiment.

In the investigated doses, eugenol applied p.o. in the course of two or four weeks does not influence significantly the intake of food, water, or body mass of rats. The dose of 400 mg/kg/day produced undesired reactions (agitation and hyperesthesia) that were first observed on day 21 and lasted until the end of the experiment.

Low subacute toxicity of eugenol was established following p.o. administration to rats. Eugenol in doses of 200 and 400 mg/kg tm/day has a low toxic potential and is safe for administration to this animal species.

Key words: eugenol, toxicity, rat, food and water intake

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ СНОСНОСТИ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЭУГЕНОЛА У КРЫС

**Миланка Ездимирович, Невенка Алексич, С. Траилович, С. Иванович,
Н. Ездимирович**

Испытана потенциальная токсичность, то есть общая сносность эугенола после двухнедельного непрерывного п.о. применения. Опыт выведен на 72 самца крыс штамма *Wistar*. Четыре группы крыс лечены различными дозами эугенола (10 мг/кг тм/день, 50 мг/кг, 200 мг/кг и 400 мг/кг тм/день), пятая группа получала вехикулум (0,5% метил-целлюлоза, пропилен-гликол и вода), а шестая была абсолютный нелеченный контроль. Отвечающие дозы эугенола и вехикулума апплицированы гастричным зондом в объеме от 1 мл/100 г телесной массы. Общая снос-

ность эугенола оценивна на основе дневного дохода воды и корма, массы тела, общего состояния здоровья, поведения и летальности в течение опыта.

В испытанных дозах эугенол применен в п.о. в течение две или четыре недели не влияет значительно на прибыль корма, воды и массы тела крыс. Доза от 400 мг/кг/день привела до нежелательных реакций (беспокойство и гиперестезия), которые первый раз замечены 21 дня и продолжались до конца опыта.

Установлена низкая подострая токсичность эугенола от 200 и 400 мг/кг тм/день имеют низкий токсический потенциал безопасные для применения у этого вида животных.

Ключевые слова: эугенол, токсичность, крыса, доход корма и воды

**ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI *STAPHYLOCOCCUS* VRSTA NA
NEKE ANTIBAKTERIJSKE LEKOVE PRIMENOM DISK
DIFUZIJE I MIKRODILUCIJE METODE U BUJONU***
*INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY OF STAPHYLOCOCCUS
SPECIES TO SOME ANTIBACTERIAL DRUGS BY DISK DIFFUSION
AND BROTH MICRODILUTION*

Jelena Ašanin, Ksenija Aksentijević, M. Žutić, Vera Katić, D. Krnjaić,
N. Milić, Ružica Ašanin, D. Mišić**

Cilj ovog rada je bila identifikacija izolovanih vrsta stafilocoka i ispitivanje njihove osetljivosti na neke antibakterijske lekove. Kao materijal u ovom ispitivanju korišćeni su izolati stafilocoka poreklom iz uzoraka mleka. Ukupno je ispitano 25 sojeva izolovanih stafilocoka od kojih su 24 poticala iz uzoraka mleka krava sa mastitisom, a jedan soj je izolovan iz uzorka mleka krave nakon lečenja mastitisa. U primarnoj identifikaciji su korišćeni katalaza i oksidaza testovi, kao i test prisustva slobodne koagulaze. Nakon izvođenja preliminarnih testova, vršena je identifikacija izolovanih sojeva, primenom komercijalnih sistema ID32 STAPH (bioMérieux, Francuska) i BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, SAD) prema uputstvima proizvođača.

Osetljivost izolovanih sojeva stafilocoka ispitivana je na: oksacilin, penicilin, cefoksitin, gentamicin, eritromicin, hloramfenikol, tetraciklin, ciprofloksacin, sulfametoksazol/trimetoprim i vankomicin primenom disk difuzije metode i mikrodilucije metode u bujonu prema preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2003), a tumačenje rezultata je vršeno prema preporukama CLSI iz 2008. i 2010. godine. Korišćeni su antibiogram diskovi proizvođača Becton Dickinson (SAD), a za mikrodilucionu metodu u bujonu korišćene su čiste supstance antibakterijskih

* Rad primljen za štampu 30. 12. 2011. godine

** Dr med. Jelena Ašanin, istraživač saradnik, Inovacioni Centar Tehnološko-Metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu; mr sc. med. vet. Ksenija Aksentijević, asistent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sc. med. vet. Milenko Žutić, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr sc. med. vet. Vera Katić, profesor, dr sc. med. vet. Dejan Krnjaić, vanr. profesor, dr sc. med. vet. Nenad Milić, profesor, dr sc. med. vet. Ružica Ašanin, profesor, dr sc. med. vet. Dušan Mišić, docent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

lekova različitih proizvođača: eritromicin, hloramfenikol, cefoksitin, gentamicin, oksacilin, tetraciklin (Sigma Aldrich, SAD), sulfametoksazol (Fluka, SAD), penicilin (Calbiochem, Nemačka), vankomicin (Abbott laboratories, SAD), ciprofloksacin i trimetoprim (Zdravlje A.D., Srbija). Svih 25 sojeva je bilo katalaza pozitivno i oksidaza negativno. Od 25 sojeva, 19 je bilo koagulaza-pozitivno, a 6 koagulaza-negativno. Primenom disk difuzione metode od 19 sojeva *S. aureus* kod 17 je utvrđena rezistencija na penicilin (89,5%), a kod 2 soja na gentamicin (10,5%). Od 3 soja *S. xylosus*, kod jednog je primenom disk difuzione metode utvrđena rezistencija na tetraciklin (33,3%) i na oksacilin (33,3%), dok je kod drugog soja utvrđena rezistencija na penicilin (33,3%). Treći soj *S. xylosus* je bio osetljiv na sve ispitivane antibiotike. Kod dva soja *S. simulans* i jednog soja *S. haemolyticus* nije utvrđena rezistencija ni na jedan od ispitivanih antibiotika primenom disk difuzione metode. Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod 13 sojeva *S. aureus* je utvrđena rezistencija na penicilin (68,4%) sa vrednostima minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) od 0,5 do 4 µg/ml, kod 2 soja na gentamicin (10,5%) sa vrednostima MIC od 32 µg/ml, a intermedijarna osetljivost na hloramfenikol utvrđena je kod 9 sojeva *S. aureus* (47,4%) sa vrednostima MIC od 16 µg/ml i na vankomicin kod jednog soja *S. aureus* (5,3%) čija je vrednost MIC iznosila 4 µg/ml.

Cljučne reči: mastitis, staphylococcus, antibakterijski lekovi, rezistencija

Uvod / Introduction

Još 1878. godine Koh (Robert Koch) je zapazio kokoidne oblike u gnoju pacijenta, a zatim i prepoznao da su pojedine bolesti, poput dubokih apscesa kože, povezane sa prisustvom koka koje formiraju grozdove. Nakon dve godine (1880) Koh je uspeo da ih kultiviše u tečnoj hranljivoj podlozi, a zatim ih je Ogston 1882. godine nazvao stafilokokama (*Staphylococcus*). Nešto kasnije, 1884. godine, Rozenbah (Friedrich Julius Rosenbach) je uspeo da na hranljivoj podlozi izoluje čistu kulturu stafilokoka iz materijala uzetog iz rane kod čoveka. Iako su dugo poznate čovečanstvu, *Staphylococcus* vrste još uvek predstavljaju mikroorganizme koji su u centru pažnje naučne i stručne javnosti. Nalaze se kod ljudi i svih vrsta životinja, pa se mogu naći i u namirnicama različitog porekla. Veoma lako se prilagođavaju spoljašnjim uslovima sredine i sposobne su da izazovu širok spektar infekcija, počev od benignih infekcija kože do vrlo ozbiljnih stanja koja ugrožavaju život, kao što su septikemije i nekrotizirajuća pneumonija.

Staphylococcus aureus kod krava izaziva mastitis i impetigo vimena, kod ovaca i koza dovodi do mastitisa i dermatitisa, a kod jagnjadi do pijemije nakon ujeda krpelja, kao i benignog folikulitisa (Quinn i sar., 2002).

Osim izučavanja sposobnosti *S. aureus* i ostalih vrsta stafilocoka da izazovu brojne infekcije, velika pažnja je usmerena na njihovu rastuću rezistenciju na različite antibiotike, a posebno na β -laktame. Kako je koja grupa antibiotika uvedena u kliničku praksu, tako su stafilocoke vrlo brzo sticale rezistenciju na njih, verovatno brže od svih ostalih vrsta bakterija. Ovaj podatak izaziva paniku, jer su stafilocoke svuda prisutne, pa tako i sposobne da izazovu infekcije koje bi, zbog njihove rezistencije, bilo vrlo teško lečiti. Dok penicilin, kao prvi predstavnik β -laktamskih antibiotika, nije uveden u kliničku praksu, smrtnost od infekcija izazvanih vrstom *S. aureus* je iznosila do 80%. Danas se smatra da skoro ne postoje sojevi *S. aureus* koji su osetljivi na penicilin. Najznačajniji tip rezistencije na antibiotike koju vrste iz ovog roda mogu imati je rezistencija na meticilin, koja predstavlja rezistenciju na sve β -laktamske antibiotike. Rezistencija na vankomicin *Staphylococcus* vrsta predstavlja još veću opasnost od rezistencije na meticilin, jer su, pored nekih novih antibiotika, glikopeptidni antibiotici poslednja odbrana protiv stafilokoknih infekcija. Iako je vankomicin odavno uveden u kliničku praksu, stafilocoke su rezistenciju na njega stekle dugo posle njegovog uvođenja u kliničku praksu i taj tip rezistencije nije toliko zastupljen, koliko rezistencija na meticilin.

Ranije je vladalo mišljenje da su različite vrste stafilocoka strogo adaptirane na određene domaćine i da je prenos stafilocoka sa jedne vrste domaćina na drugu vrstu domaćina nemoguć. Međutim, dokazano je da, iako postoje neki sojevi pojedinih vrsta koji su specifično adaptirani na određenog domaćina, većina vrsta stafilocoka se može preneti sa jedne vrste domaćina na drugu. Da bi situacija bila još gora, takvi sojevi su vrlo često multirezistentni i meticilin-rezistentni, pa je tako zabeležen i dokazan prenos MRSA (meticilin-rezistentan *Staphylococcus aureus*) sojeva između ljudi i pasa, ljudi i konja, ljudi i svinja itd (Van Loo i sar., 2007).

Vrste iz velike grupe poznate kao koagulaza-negativne stafilocoke (CoNS) se normalno nalaze na koži i mukoznim membranama i imaju ulogu komensala ili saprofita. Smatralo se da u kliničkim materijalima predstavljaju kontaminante, pa čak i onda kada su ti materijali poticali iz primarno sterilnih regija tela. Međutim, ukoliko dođe do oštećenja kože, zbog traume, injekcionih procedura ili prisustva stranih tela, CoNS prodiru u dublje strukture organizma, nakon čega mogu izazvati infekcije opasne po život. U namirnicama i hrani za životinje njihovo prisustvo nije ni utvrđivano. Prvi slučaj izolacije CoNS poreklom od krave sa mastitisom je zabeležen 1916. godine. U istraživanjima CoNS su dugo vremena bile zapostavljane, ali je danas velika pažnja usmerena na njih iz više razloga. Prvi razlog je to što veliki broj sojeva CoNS pokazuje rezistenciju na meticilin. Do 80% izolovanih sojeva CoNS iz bolničke sredine je rezistentno na meticilin. Drugi razlog je to što CoNS izazivaju veliki broj infekcija kod bolesnika u bolnicama, koje se vrlo teško leče zbog njihove rezistencije na antibiotike. Treći razlog, ali nikako najmanje važan, je što CoNS predstavljaju rezervoar gena rezistencije za različite sojeve meticilin-osetljivih stafilocoka, uključujući i meticilin-osetljive sojeve *S. aureus* (MSSA). Kod krava CoNS izazivaju supkliničke i kliničke

mastitise, koji dovode do ekonomskih gubitaka zbog smanjene proizvodnje mleka. (Busscher i sar., 2006; Vengust i sar., 2006). Takođe, koagulaza-negativne stafilocoke su rezistentnije na antibiotike od *S. aureus* i brže razvijaju multirezistenciju. U većini studija izolati CoNS su *in vitro* testirani na penicilin, koji se koristi u lečenju mastitisa izazvanih penicilin-osetljivim CoNS, ali je veliki broj izolata CoNS bio rezistentan na penicilin (Taponen i Pyörälä, 2009). Utvrđeno je da u namirnicama CoNS mogu lučiti enterotoksine, zbog čega predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi. Produkcija različitih stafilokoknih enterotoksina i toksina 1 toksičnog šok sindroma, bila je česta kod CoNS izolata isto kao kod izolata *S. aureus*, bilo da su poticali iz uzoraka kod slučajeva supkliničkog, hroničnog ili akutnog mastitisa (Kuroishi i sar., 2003).

Dominantne CoNS vrste u prostirci i okolini u kojoj se nalaze krave su *S. xylosus*, *S. sciuri* i *S. saprophyticus*. Iste vrste su često izolovane sa kože krava, nozdrva, kože bradavice i ostalih mesta. Mnoge druge vrste, uključujući *S. chromogenes*, *S. warneri* i *S. epidermidis* su takođe izolovane sa kože krava. Osim *S. chromogenes*, CoNS vrste često izolovane sa kože bradavice, vrha bradavice i sisnog kanala se razlikuju od vrsta CoNS izolovanih iz mleka. *Staphylococcus xylosus*, *S. sciuri* i *S. haemolyticus* su vrste koje dominiraju u uzorcima sa kože i apeksa bradavice, dok su *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans* i grupa neidentifikovanih stafilokoka često izolovane iz uzoraka mleka

Iz mleka krava sa kliničkim i supkliničkim mastitisom povremeno se može izolovati *S. haemolyticus* (Quinn i sar., 2002; Koneman i sar., 2006). Takođe *S. simulans* je vrsta koja je često izolovana tokom laktacije. U nekim studijama izolati koji su poticali iz uzoraka kliničkih i supkliničkih mastitisa, najčešće su identifikovani kao *S. simulans* (Taponen i sar., 2006; Taponen i Pyörälä, 2009).

Svi navedeni podaci ukazuju na to da je značaj ovih vrsta bakterija, kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini veliki, ali novijih podataka o njihovom prisustvu i rezistenciji u Republici Srbiji nema.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Kao materijal su korišćeni izolati stafilokoka poreklom iz uzoraka mleka krava sa klinički manifestnim mastitisom. Od 25 sojeva stafilokoka izolovanih iz uzoraka poreklom od životinja, 24 su poticala iz uzoraka mleka krava sa mastitisom, a jedan soj je izolovan iz uzorka mleka krave nakon lečenja mastitisa.

Od svih izolata stafilokoka iz ispitivanih uzoraka pripremani su preparati koji su bojeni po Gramu. Sve gram-pozitivne koke u grozdovima su potvrđene daljem ispitivanju. U primarnoj identifikaciji su korišćeni katalaza i oksidaza testovi, kao i test slobodne koagulaze.

Nakon izvođenja preliminarne testova, vršena je identifikacija izolovanih sojeva, primenom komercijalnih sistema ID32 STAPH (bioMérieux, Francuska) i BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, SAD) prema uputstvima proizvođača. Osetljivost izolovanih sojeva stafilokoka je ispitivana na sledeće

antibakterijske lekove: oksacilin, penicilin, cefoksitin, gentamicin, eritromicin, hloramfenikol, tetraciklin, ciprofloksacin, trimetoprim/sulfametoksazol i vankomicin primenom disk difuzione metode i mikrodilucione metode u bujonu prema preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2003), a tumačenje rezultata je vršeno prema preporukama CLSI iz 2008. i 2010. godine. Korišćeni su antibiogram diskovi proizvođača Becton Dickinson (SAD), a čiste supstance antibakterijskih lekova korišćene za mikrodilucionu metodu u bujonu su bili sledećih proizvođača: eritromicin, hloramfenikol, cefoksitin, gentamicin, oksacilin, tetraciklin (Sigma Aldrich, SAD), sulfametoksazol (Fluka, SAD), penicilin (Calbiochem, Nemačka), vankomicin (Abbott laboratories, SAD), ciprofloksacin i trimetoprim (Zdravlje A.D., Srbija). Osetljivost na antibiotike izolovanih sojeva stafilocoka metodom disk difuzije je ispitivana na Mueller Hinton agaru (bioMérieux, Francuska).

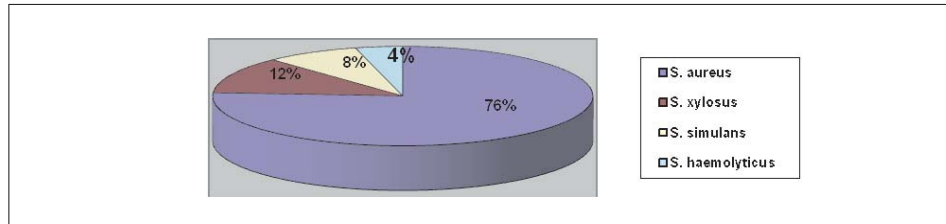
Rezultati su očitavani merenjem prečnika zona inhibicije, na osnovu kojih su utvrđivane interpretativne kategorije (S, I, R). Za kontrolu kvaliteta izvođenja ove metode, kao i kvaliteta antibiogram diskova korišćen je referentni soj *S. aureus* ATCC 25923. Osetljivost na antibiotike izolovanih sojeva stafilocoka mikrodilucionom metodom ispitivana je u Cation Adjusted Mueller Hinton 2 bujonu (Becton Dickinson, SAD). Rastvori antibiotika u čistim supstancama su pripremani prema preporukama CLSI. Za ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva stafilocoka na oksacilin, u podlogu je dodavan NaCl (Zorka Šabac, Srbija) u koncentraciji od 2%. Metoda je izvođena u mikrotitracionim pločama sa „U“ dnom (Spektar d.o.o. Čačak, Srbija) u koje je unošena podloga, a zatim i antibiotici u određenim koncentracijama. Raspon koncentracija antibakterijskih lekova se kretao: za penicilin od 0,12 do 256 µg/ml; za cefoksitin od 0,12 do 256 µg/ml; za gentamicin od 0,06 do 126 µg/ml; za eritromicin od 0,12 do 256 µg/ml; za hloramfenikol od 0,25 do 512 µg/ml; za tetraciklin od 0,06 do 128 µg/ml; za ciprofloksacin od 0,0015 do 32 µg/ml; za oksacilin 0,06 do 128 µg/ml; za trimetoprim/ sulfametoksazol od 0,004/0,075 do 8/152 µg/ml i za vankomicin od 0,12 do 256 µg/ml. Ispitivani sojevi su inokulisani u bazenčiće u finalnoj koncentraciji od 5×10^5 CFU/ml. Inkubacija je obavljena na temperaturi od 37°C tokom 16-18 h, osim za oksacilin i vankomicin, kada je vreme trajanja inkubacije iznosilo 24 h. Za kontrolu kvaliteta izvođenja mikrodilucione metode, kao i kvaliteta upotrebljenih antibakterijskih lekova je korišćen referentni soj *S. aureus* ATCC 29213.

Rezultati / Results

Izolovano je 25 sojeva iz uzoraka mleka krava sa mastitisom. Svi sojevi su bili katalaza pozitivni i oksidaza negativni. Izolovane stafilocoke su identifikovane do vrste primenom sistema ID32 STAPH i BBL Crystal GP.

Od 25 sojeva poreklom iz uzoraka mleka krava sa mastitisom, 19 je identifikovano kao *Staphylococcus aureus* (76%) primenom oba sistema, 3 kao *Staphylococcus xylosus* (12%) primenom BBL Crystal GP sistema, dok je ID32

STAPH jedan soj identifikovao kao *S. equorum* (u daljem tekstu prikazan kao *S. xylosus*), 2 kao *Staphylococcus simulans* (8%) i 1 kao *Staphylococcus haemolyticus* (4%), sva 3 soja su identifikovana primenom oba sistema identično.



Grafikon 1. Prikaz zastupljenosti pojedinih vrsta stafilocoka izolovanih iz uzoraka mleka krava sa mastitisom /

Graph 1. Representation of the different *Staphylococcus* strains isolated from milk samples from cows with mastitis

Primenom disk difuzione metode, od 19 sojeva *S. aureus* kod 17 je utvrđena rezistencija na penicilin (89,5%), a kod 2 soja na gentamicin (10,5%). Od 3 soja *S. xylosus*, kod jednog je primenom disk difuzione metode utvrđena rezistencija na tetraciklin (33,3%) i na oksacilin (33,3%), dok je kod drugog soja utvrđena rezistencija na penicilin (33,3%). Treći soj *S. xylosus* je bio osetljiv na svih 10 ispitivanih antibiotika. Kod 2 soja *S. simulans* i jednog soja *S. haemolyticus* nije utvrđena rezistencija ni na jedan od ispitivanih antibiotika primenom disk difuzione metode. Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod 13 sojeva *S. aureus* je utvrđena rezistencija na penicilin (68,4% sa vrednostima MIC od 0,5 do 4 µg/mL), a kod 2 soja na gentamicin (10,5%, vrednost MIC od 32 µg/mL.), dok je na 2 antibiotika ustanovljena intermedijarna osetljivost i to na hloramfenikol kod 9 sojeva (47,4%, vrednost MIC od 16 µg/mL) i na vankomicin kod 1 soja *S. aureus* (5,3% vrednost MIC od 4 µg/mL).

Rasponi vrednosti MIC za ispitivane antibiotike prikazani su u tabeli 1. Od 3 soja *S. xylosus*, primenom mikrodilucione metode u bujonu, utvrđena je rezistencija kod jednog soja na tetraciklin (33,3%) i na oksacilin (33%), a kod drugog na penicilin (33,3%). Treći soj je primenom mikrodilucione metode u bujonu bio osetljiv na svih 10 ispitivanih antibakterijskih lekova. Kod jednog od 2 soja *S. simulans* primenom mikrodilucione metode u bujonu je utvrđena intermedijarna osetljivost na hloramfenikol, dok je drugi bio osetljiv na svih 10 antibakterijskih lekova. Primenom mikrodilucione metode u bujonu kod soja *S. haemolyticus* nije utvrđena rezistencija ni na jedan od ispitivanih antibakterijskih lekova.

Na grafikonu koji sledi (grafikon 2) su prikazane razlike u rezultatima ispitivanja osetljivosti na antibiotike dobijene primenom disk difuzione metode i mikrodilucione metode u bujonu za 25 sojeva poreklom iz uzoraka mleka krava sa mastitisom. Razlika se može videti kod hloramfenikola, na koji je 40% sojeva bilo intermedijarno osetljivo primenom mikrodilucione metode u bujonu, dok su pri-

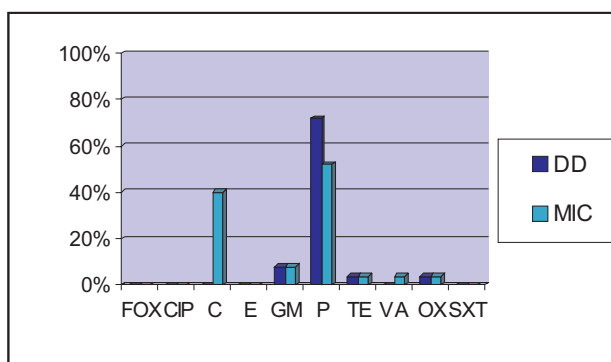
menom disk difuzione metode svi sojevi bili osetljivi na hloramfenikol. Takođe je 4% sojeva bilo intermedijarno osetljivo na vankomicin primenom mikrodilucione metode u bujonu, dok su svi sojevi bili osetljivi na vankomicin primenom disk difuzione metode. Može se videti i razlika u rezultatima ispitivanja osetljivosti na penicilin, jer je primenom mikrodilucione metode u bujonu na penicilin bilo rezistentno 52% sojeva, a primenom disk difuzione metode 72%. Rezultati osetljivosti ispitivanih sojeva stafilokoka na gentamicin (8%) i tetraciklin (4%) bili su identični primenom obe metode.

Tabela 1. Rasponi u kojima su se kretale MIC vrednosti (g/mL) ispitivanih antibakterijskih lekova prema vrstama izolovanih stafilokoka iz uzoraka mleka krava sa mastitisom / Table 1. Range of MIC values (g/mL) of examined antibacterial drugs according to species of *Staphylococcus* isolates from milk samples from cows with mastitis

Izolovane vrste / Isolated species	FOX	CIP	C	E	GM	P	TE	VA	OX	SXT*
<i>S. aureus</i>	1-4	0,03 - 0,12	8-16	0,25 - 0,5	≤0,06-32	≤0,12-4	0,12 -2	0,5-4	0,12 - 0,5	0,06 - 0,5
<i>S. xylosus</i>	1-2	0,12	4-8	0,25	≤0,06	≤0,12	1->128	0,5-1	0,25 -1	0,12-0,5
<i>S. simulans</i>	2-4	0,03	8-16	0,25 - 0,5	≤0,06	≤0,12	0,5 - 1	1-2	0,25	0,5-1
<i>S. haemolyticus</i>	1	0,06	8	0,25	≤0,06	≤0,12	0,5	1	0,25	0,5

* Vrednosti za trimetoprim/sulfametoksazol (SXT) su prikazane prema vrednostima trimetoprima; njihov odnos je 1:19 (T/S) /

* Values for trimetoprim/sulfametoxazol(SXT) are shown according to values for trimetoprim; their ratio is 1:19 (T/S)



Grafikon 2. Prikaz rezistencije i razlike u rezultatima između mikrodilucione metode u bujonu i disk difuzione metode za sojeve poreklom iz uzoraka mleka krava sa mastitisom

*sojevi su primenom mikrodilucione metode u bujonu bili intermedijarno osetljivi / Graph 2. Resistance and difference in results between broth microdilution method and disk diffusion method for strains originating from milk samples from cows with mastitis

*using the broth microdilution method strains were intermediately sensitive

Diskusija / Discussion

U ovom ispitivanju su korišćene 2 metode za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike. Od 19 sojeva *S. aureus*, izolovanih iz uzoraka mleka krava sa mastitisom disk difuzionom metodom je utvrđena rezistencija na penicilin kod 17 sojeva, dok je mikrodilucionom metodom u bujonu rezistencija utvrđena kod 13 sojeva. Po preporukama CLSI, poželjnije je ispitivanje osetljivosti sojeva stafilokoka na penicilin, umesto na ampicilin, jer se tako lakše detektuju sojevi koji produkuju β -laktamaze. Na osnovu osetljivosti na penicilin, može se predvideti i osetljivost na većinu drugih penicilina. Pošto se smatra da je prevalencija penicilin-osetljivih sojeva *S. aureus* niska, preporuka je da se za sojeve koji imaju vrednosti $MIC \leq 0.12 \mu g/ml$ ili zonu inhibicije $\geq 29mm$, koristi test za indukciju β -laktamaza (nitrocefinski test), pre nego što se soj prijavi kao osetljiv na penicilin (CLSI, 2010). Rezistencija na penicilin kod sojeva *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka krava sa mastitisom varira i kreće se od 5% u Norveškoj do 87% u Brazilu (Aarestrup, 2006). U istraživanju čeških autora (Schlegelova i sar., 2008), 52,5% sojeva CoNS poreklom iz uzoraka sirovog mleka, sirovog mesa i mesnih prerađevina, kao i briseva opreme u mlekarima je bilo rezistentno na penicilin primenom disk difuzione metode.

Rezistencija na gentamicin je u ovom ispitivanju utvrđena kod 2 soja *S. aureus*, primenom obe metode. Prema podacima iz literature (Aarestrup, 2006), najveći procenat sojeva *S. aureus* rezistentnih na gentamicin je izolovan u Švajcarskoj 2003. godine. Osetljivost stafilokoka na vankomicin se prema novim preporukama (CLSI, 2010) ne ispituje primenom disk difuzione metode, jer se ovom metodom ne mogu razlikovati sojevi *S. aureus* koji su osetljivi i intermedijarno osetljivi na vankomicin. Disk difuziona metoda sa vankomicinom je u ovom ispitivanju rađena prema preporukama CLSI iz 2008. godine. Ispitivanjem osetljivosti stafilokoka na vankomicin (30 μg) primenom disk difuzione metode mogu se detektovati izolati *S. aureus* koji imaju *vanA* gen (VRSA izolati). Kod takvih izolata se neće videti nikakva zona inhibicije oko diska vankomicina (CLSI, 2010). Rezistencija na gentamicin je utvrđena kod 2 soja *S. aureus*, primenom obe metode.

Izolovan je jedan soj *S. aureus* koji je bio intermedijarno osetljiv na vankomicin primenom mikrodilucione metode u bujonu, dok se vankomicin prema novim preporukama (CLSI, 2010) ne testira disk difuzionom metodom, jer se ovom metodom ne mogu razlikovati sojevi *S. aureus*, koji su osetljivi i intermedijarno osetljivi na vankomicin. Disk difuziona metoda sa vankomicinom je u ovom ispitivanju rađena prema preporukama CLSI iz 2008. godine. Rezistencija na tetraciklin kod CoNS poreklom iz uzoraka od krava sa mastitisom se kretala od 4% u Danskoj do 9% u Finskoj i SAD (Aarestrup, 2006). U istraživanju čeških autora (Schlegelova i sar., 2008), rezistencija na tetracikline iznosila je 32,5%.

Kod CoNS, osim kod *S. epidermidis*, vrlo često se javljaju problemi zbog neslaganja rezultata disk difuzione i mikrodilucione metode sa oksacilinom. Interpretativna kategorija za oksacilin ima uske granice kada su u pitanju CoNS,

osim za *S. epidermidis*, jer sojevi čije vrednosti MIC za oksacilin iznose od 0,5 do 2 µl/mL ne moraju imati *mecA* gen (CLSI, 2010). Za sojeve čije vrednosti MIC za oksacilin iznose od 0,5 do 2 µl/mL, preporuka je da se sojevi testiraju na prisustvo PBP2a ili na prisustvo *mecA* gena. Po preporukama CLSI za 2010. godinu, više se ne proverava rezistencija na oksacilin primenom disk difuzione metode, već samo primenom mikrodilucione metode u bujonu. Disk difuziona metoda sa oksacilinom je u ovom ispitivanju rađena prema preporukama CLSI iz 2008. godine.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata identifikovano je 19 sojeva *S. aureus*, 3 soja *S. xylosus*, 2 soja *S. simulans* i jedan soj *S. haemolyticus*. Od 19 sojeva *S. aureus* kod 17 sojeva utvrđena je rezistencija na penicilin primenom disk difuzione metode, a primenom mikrodilucione metode u bujonu rezistencija je utvrđena kod 13 sojeva *S. aureus*. Kod CoNS, osim kod *S. epidermidis* vrlo često se javljaju problemi zbog neslaganja rezultata disk difuzione i mikrodilucione metode sa oksacilinom te je potrebno primeniti najmanje 2 različite metode sa cefoksitinom i oksacilinom za utvrđivanje rezistencije na meticilin. U ovom ispitivanju, osim na penicilin, nije utvrđen visok procenat rezistencije kod ispitivanih sojeva na ostale korišćene antibakterijske lekove.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGMENTS:

Ovaj rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, Projekat Ev.br 31079. *This work was supported by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia, Project No 31079.*

Literatura / References

1. Aaerstrup FM. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin, ASM Press, 2006.
2. Busscher JF, Van Duijkeren E, Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM. The prevalence of methicillin-resistant staphylococci in healthy horses in the Netherlands. *Vet Microbiol* 2006; 113: 131-6.
3. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 629-41.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition. M7-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA, 2003.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA, 2008.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA, 2010.
7. Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Procop GW, Janda WM, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, sixth edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

8. Kuroishi T, Komine K, Kai K, Itagaki M, Kobayashi J, Ohta M, Kamata S, Kumagai K. Concentration and specific antibody to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretion, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. *J Vet Med Sci* 2003; 65: 899-906.
9. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Blackwell Science Ltd 2002;44-8.
10. Schlegelova J, Vlkova H, Babak V, Holasova M, Jaglic Z, Stosova T, Sauer P. Resistance to erythromycin of *Staphylococcus* spp. Isolates from food chain. *Veterinarni Medicina* 2008; 53(6): 307-14.
11. Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol* 2006; 115: 199-207.
12. Taponen S, Pyörälä S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol* 2009; 134: 29-36.
13. van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, de Neeling A, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, Voss A, Kluytmans J. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 1834-9.
14. Vengust M, Anderson MEC, Rousseau J, Weese JS. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Lett Appl Microbiol* 2006; 43: 602-6.

ENGLISH

INVESTIGATION OF SUSCEPTIBILITY OF *STAPHYLOCOCCUS* SPECIES TO SOME ANTIBACTERIAL DRUGS BY DISK DIFFUSION AND BROTH MICRODILUTION

Jelena Ašanin, Ksenija Aksentijević, M. Žutić, Vera Katić, D. Krnjajić, N. Milić, Ružica Ašanin, D. Mišić

The objective of this work was to identify isolated *Staphylococcus* species and to investigate their sensitivity to some antibacterial drugs. The material used for these investigations were *Staphylococcus* isolates originating from milk samples. A total of 25 strains of *Staphylococcus* isolates were examined, including 24 from milk samples from cows with mastitis, and one strain was isolated from a milk sample from a cow following treatment for mastitis. For primary identification, catalase and oxidase tests were used, as well as the free coagulase test. Following the preliminary tests, the isolated strains were identified using commercial systems ID32 STAPH (bioMérieux, France) and the BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, USA) according to the enclosed instructions.

The *Staphylococcus* isolates were examined for sensitivity to the following: oxacillin, penicillin, cefoxitin, gentamicin, erythromycin, chloramphenicol, tetracycline, ciprofloxacin, sulfamethoxazol/trimetoprim, and vacomycin using the disk diffusion method and the broth microdilution method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI(2003), and the results were interpreted according to CLSI recommendations from 2008 and 2010. Antibigram disks manufactured by Becton Dickinson (USA) were used, and the broth microdilution method was applied using pure antibiotic

substances from different manufacturers: erythromycin, chloramphenicol, cefoxitin, gentamicin, oxacillin, tetracycline (Sigma Aldrich, USA), sulfametoxazol (Fluka, USA), penicillin (Calbiochem, Germany), vancomycin (Abbott laboratories, USA), ciprofloxacin and trimetoprim (Zdravlje A.D., Serbia). All 25 strains were catalase positive and oxidase negative. Of the 25 strains, 19 were coagulase positive and 6 were coagulase negative. With the implementation of the disk diffusion method on 19 strains of *S. aureus*, 17 were established to be resistant to penicillin (89.5%), and 2 strains to gentamicin (10.5%). The investigation of 3 strains of *S. xylosus* using the disk diffusion method showed that one strain was resistant to tetracycline (33.3%) and to oxacillin (33.3%), while another strain was found to be resistant to penicillin (33.3%). The third strain of *S. xylosus* was sensitive to all the examined antibiotics. Two strains of *S. simulans* and one strain of *S. haemolyticus* were not found to be resistant to any of the examined antibiotics using the disk diffusion method. The implementation of the broth microdilution method yielded in 13 strains of *S. aureus* resistance to penicillin (68.4%) with MIC values from 0.5 to 4 µg/ml, in 2 strains to gentamicin (10.5%) with MIC values of 32 µg/ml, and intermediary sensitivity to chloramphenicol was established in 9 strains of *S. aureus* (47.4%) with MIC values of 16 µg/ml and to vancomycin in 1 strain of *S. aureus* (5.3%) with MIC values of 4 µg/ml.

Key words: mastitis, *Staphylococcus*, antibacterial drugs, resistance

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *STAPHYLOCOCCUS* ВИДОВ НА НЕКОТОРЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВА

Елена Ашанин, Ксения Аксентиевич, М. Жутич, Вера Катич, Д. Крняич,
Н. Милич, Ружица Ашанин, Д. Мишич

Цель этой работы была идентификация изолированных видов стафилококков и испытание их чувствительности на определённое число антибактериальных лекарств. Как материал в этом испытании использованы изоляты стафилококков происхождением из образчиков молока. Совокупно испытано 25 штаммов изолированных стафилококков из которых 24 происходили из образчиков молока коров с маститом, а один штамм изолирован из образчика молока коровы после лечения мастита. В первичной идентификации использованы каталаза и оксидаза тесты, словно и тест присутствия свободной коагулазы. После исполнения прелиминарных тестов, совершена идентификация изолированных штаммов, применением коммерческих систем ID32 STAPH (bioMérieux, Франция) и BBL crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, США) согласно инструкциям производителя.

Чувствительность изолированных штаммов стафилококков испытана на: оксацилин, пенициллин, цефокситин, гентамицин, эритромицин, хлорамфеникол, тетрациклин, ципрофлоксацин, сульфаметоксазол/триметроприм и ванкомицин применением диск диффузионного метода и микродилуционного метода в бульоне согласно рекомендациям Института для клинических и лабораторных стандартов Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI(2003), а толкование результатов совершено рекомендациям CISI из 2003 и 2010 года. Пользованы антибиотикограмма диски производителя Becton Dickinson (США), а для микродилуционного метода в бульоне использованы чистые субстанции антибиотиков различных произво-

дителей: эритромицин, хлорамфеникол, цефокситин, гентамицин, оксацилин, тетрациклин (*Sigma Aldrich*, США), сульфаметоксазол (*Fluka*, США), пенициллин (*Calbiochem*, Германия), ванкомицин (*Abbott Laboratories*, США), ципрофлоксацин и триметроприм (Здравље А.Д. Србија). Всех 25 штаммов было каталаза положительно и оксидаза отрицательно. От 2 штаммов 19 было коагулаза-положительно и оксидаза отрицательно. От 25 штаммов 19 было коагулаза-положительно, а 6 коагулаза-отрицательно. Применением диск диффузионного метода от 10 штаммов *S. aureus* у 17 утверждена резистенция на пенициллин (89,5%), а у 2 штамма на гентамицин (10,5%). От 3 штамма *S. hylosus*, у одного штамма применением диск диффузионного метода утверждена резистенция на тетрациклин (33,3%) и на оксациклин 33,3%, пока у второго штамма утверждена резистенция на пенициллин (33,3%). Третий штамм *S. xylosus*, у одного штамма применением диск диффузионного метода утверждена резистенция на тетрациклин (33,3%) и на оксациклин (33,3), пока у второго штамма утверждена резистенция на пенициллин (33,3%). Третий штамм *S. xylosus* был чувствительным на все испытанные антибиотики. У два штамма *S. simulans* и одного штамма *S. haemolyticus* на утверждена резистенция ни на один из испытанных антибиотиков применением диск диффузионного метода. Применением микродилуционного метода в бульоне у 13 штаммов *S. aureus* утверждена резистенция на пенициллин (66,4%) с стоимостями MIC от 0,5 до 4 мг/м, а у 2 штамма на гентамицин (10,5%) с стоимостями MIC от 16 мг/мл и на ванкомицин у одного штамма *S. aureus* (5,3%) чья стоимость MIC составляла (в сумме) 4 мг/мл.

Ключевые слова: мастит, *Staphylococcus*, antibakterialnye lekarstva, резистенция

**ULOGA HARDEROVE ŽLEZDE U IMUNOM ODGOVORU
PILIĆA SA MATERNALNIM IMUNITETOM NA VAKCINU
PROTIV VIRUSNOG INFektivNOG BRONHITISA***
*ROLE OF HARDERIAN GLAND IN IMMUNE RESPONSE OF CHICKENS
WITH MATERNAL IMMUNITY TO VACCINE AGAINST INFECTIOUS
BRONCHITIS VIRUS*

Ljiljana Spalević, V. Ivetić, Dobrila Jakić Dimić, Danka Maslić Strižak,
A. Potkonjak, N. Pavlović**

U ovom radu je ispitivana uloga Harderove žlezde u imunološkom odgovoru nakon vakcinacije protiv infektivnog bronhitisa (IB). Ogleđom je obuhvaćeno 100 brojerskih pilića koji su podeljeni u dve grupe. Ogledna grupa vakcinisana je prvog dana starosti protiv infektivnog bronhitisa vakcinom Bronhivet I, koja sarži živi atenuirani soj H120. Kontrolna grupa nije imunizovana. Ogled je trajao 21 dan. Ispitivani su krvni serumi 1, 7, 14. i 21. dana na prisustvo specifičnih antitela prema infektivnom bronhitisu (ELISA test).

Praćene su histološke promene u građi Harderove žlezde u odnosu na primenjenu vakcinu. Ovim istraživanjem je dokazana uloga Harderove žlezde kao sekundarnog limfoidnog organa kod vakcinacije brojerskih pilića protiv infektivnog bronhitisa. Prisutna maternalna antitela na IB nemaju negativan uticaj na vakcinaciju pilića prvog dana starosti. Vakcinalni virus delimično oštećuje Harderovu žlezdu.

Ključne reči: Harderova žlezda, infektivni bronhitis, maternalna antitela, sekundarni limfoidni organ

* Rad primljen za štampu 20. 12. 2011. godine

** Mr sc. med. vet. Ljiljana Spalević, spec. vet., istraživač-saradnik, dr sc. med. vet. Vojin Ivetić, viši naučni saradnik, dr sc. med. vet. Dobrila Jakić Dimić, viši naučni saradnik, dr sc. med. vet. Danka Maslić Strižak, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr sc. med. vet. Aleksandar Potkonjak, asistent, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad; Nikola Pavlović, spec. med., Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

Uvod / Introduction

Infektivni bronhitis živine (IB) je akutno kontagiozno respiratorno oboljevanje virusne etiologije svih starosnih kategorija. Kod mladih pilića se bolest ispoljava kao kataralni bronhitis praćen velikom smrtnošću, a kod starijih se dodatno komplikuje sa sekundarnim bakterijskim infekcijama (Ignjatović i Sapats, 2000). Kod koka nosilja se pored respiratornih simptoma javlja i infekcija jajovoda. Posledično dolazi do usporenog rasta, smanjene nosivosti i promene kvaliteta ljuske jaja (King i Cavanagh, 1991). Uzročnik bolesti je virus iz familije *Nidoviridae*, rod *Coronavirus*. Bolest je proširena u svim zemljama sa razvijenim živinarstvom. Dovodi i do 100% morbiditeta u jatu, jedan je od vodećih uzročnika ekonomskih gubitaka (Engstrom i sar., 2003). Aktivnom imunizacijom se smanjuju gubici u jatu. Nosilje koje se imunizuju protiv IB prenose antitela na potomstvo, ali ta zaštita vremenom pada od početnih 95% prvog dana na 30% sedmog dana (Mondal i Naqui, 2001). Iz tog razloga se brojlerski pilići vakcinišu prvog dana starosti živom atenuisanom vakcinom (Glisson i Kleven, 1993). Značajnu ulogu u imunološkom odgovoru na vakcinaciju ima Harderova žlezda. Žlezda je smeštena ventromedijalno u orbiti i labavo pričvršćena periorbitalnom fascijom ispod mišića (Shirama i sar. 1996). Kod živine je jezičastog oblika (Walcott i sar., 1989). Histostrukturno pripada složenim tubuloalveolarnim žlezdama (Khan i sar., 2007), čiji je izvodni kanal morfološki vidljiv tek posle izlaska iz žlezde (Burns i Maxwell, 1979) gde se otvara u konjunktivalnu vreću na površini trećeg očnog kapka. Kod živine ova žlezda ima dve osnovne funkcije: da proizvodi sekret koji podmazuje treći kapak (Payne, 1994) i da štiti okulonazalni region od antigena (Olah i sar., 1996). Intersticijalno tkivo Harderove žlezde obiluje plazma ćelijama koje sekretuju tri klase imunoglobulina: IgA, IgG i IgM (Ohshima i Hiramatsu, 2002). Na osnovu ovih ispitivanja autori smatraju da Harderova žlezda kao komponenta lokalnog imunog sistema ima značajnu ulogu u protekciji okulonazalne regije kao i da prisutna maternalna antitela ne umanjuju efekat vakcinacije prvog dana starosti pilića.

Materijal i metode rada / Material and methods

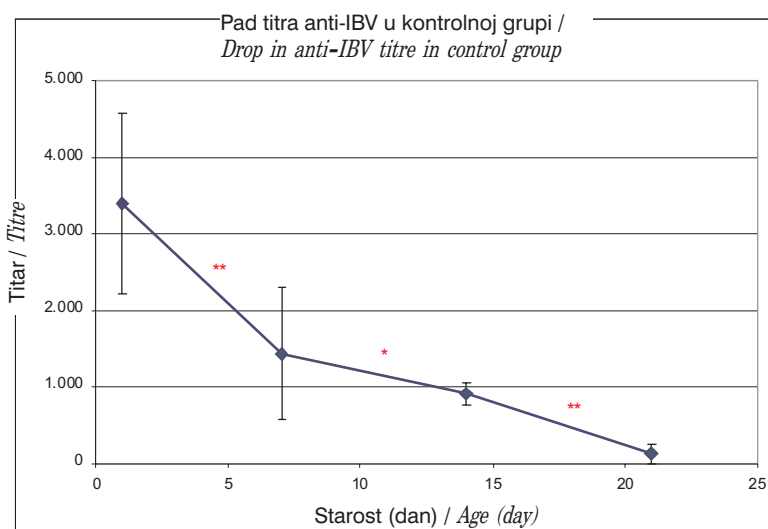
Za predviđena istraživanja korišćeni su jednodnevni brojlerski pilići poreklom od roditeljskih parova provenijence Hybro PG. Program imunoprofilakse kod roditeljskog jata sproveden je prema programu za roditeljske parove. Ogled je izveden na 100 jednodnevnih brojlerskih pilića oba pola podeljenih u dve grupe – ogledna i kontrolna (O i K) sa po 50 jedinki u grupi. Pilići su hranjeni *ad libitum* kompletnom smešom za ovu starosnu kategoriju. Pilići ogledne grupe stari jedan dan vakcinisani su sprej metodom protiv infektivnog bronhitisa vakcinom Bronhivet I koja sadrži živi atenuirani soj H120. Kod pilića kontrolne grupe nije sproveden nikakav imunološki program. Ogled je trajao 21 dan.

U predviđenim terminima (1, 7, 14, i 21, dana starosti živine) uzeti su uzorci krvi i izdvojeni krvni serumi za ispitivanje titra antitela na infektivni bronhitis. Izdvojeni serumi su inaktivisani na 56°C (30 min) a zatim ispitani imunoenzimskim testom (ELISA) na prisustvo antitela prema virusu infektivnog bronhitisa.

Za histopatološko ispitivanje, ekstirpirane Harderove žlezde su fiksirane u 10% neutralnom formalinu, zatim dehidrirane u rastućoj koncentraciji alkohola i prosvetljavane u ksilolu. Nakon toga su uklopljene u parafin i isečene na listiće debljine 5 µm pomoću rotacionog mikrotoma. Od svakog bloka je napravljeno 4-5 listića sa različitih dubinskih nivoa koji su zatim bojeni hematoksilin-eozinom (HE).

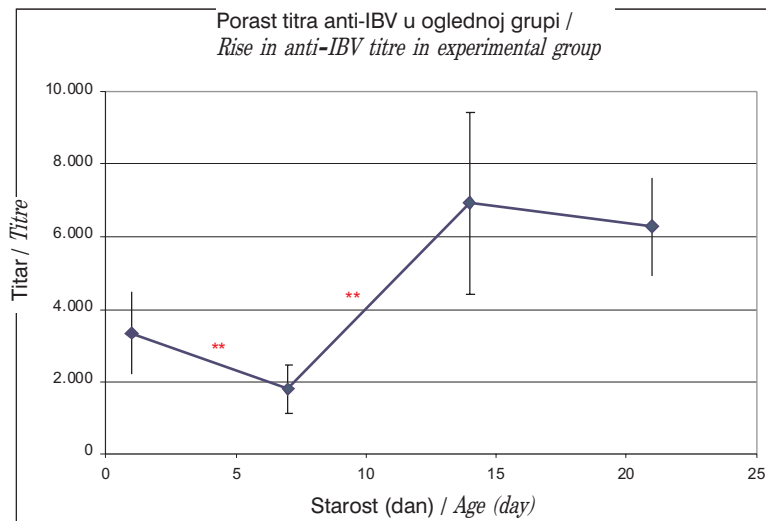
Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Na osnovu dobijenih vrednosti visine titra antitela ELISA testom uočeno je prisustvo maternalnih antitela na infektivni bronhitis u obe ogledne grupe.



Grafikon 1. Visina titra antitela u kontrolnoj grupi
Graph 1. Antibody titre values in control group

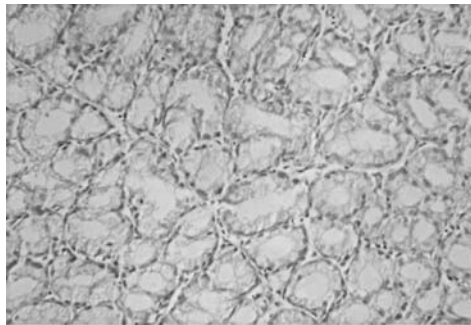
U kontrolnoj grupi (K) od 1. do 7. dana uočava se pad titra antitela koji progresivno pada sve do 21. dana starosti (grafikon 1). U grupi O maternalna antitela opadaju od 1. do 7. dana starosti, a zatim se titar antitela značajno povećava i dostiže maksimum 14. dana. Od 14. do 21. dana visina titra je bez statistički značajne razlike (grafikon 2).



Grafikon 2. Visina titra antitela u ogleđnoj grupi
Graph 2. Antibody titre values in experimental group

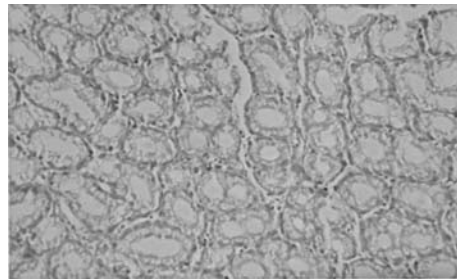
Nivo maternalnih antitela vremenom se smanjuje (Darbyshire i Peters, 1985) i opada linearno, tj. za 5-6 dana je duplo manji. Talebi i sar. (2005) opisuju da se titar maternalnih antitela kod nevakcinisanih pilića za 5-6 dana umanjuje za pola, da bi 21. dana visina izmerenog titra bila jedva merljiva. U našem ogledu titar antitela je spao na pola 7. dana, a 21. je bio negativan (grafikon 1).

Konstatovani pad titra maternalnih antitela se objašnjava serokonverzijom, pa je stoga neophodno izvršiti vakcinaciju pilića već prvog dana života



Slika 1. Harderova žlezda kod pilića starih 7 dana u kontrolnoj grupi.
Pojedinačni limfociti i plazma ćelije.
H&E, X100

Figure 1. Harderian gland in chicks aged seven days in control group.
Some lymphocytes and plasma cells. H&E, X100



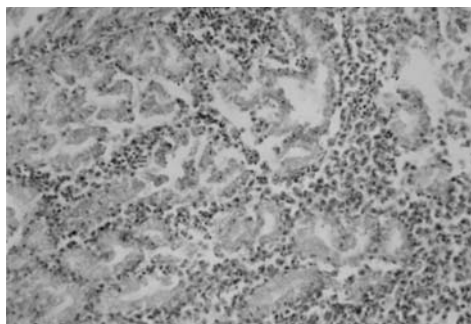
Slika 2. Harderova žlezda kod pilića starih 14 i 21 dan u kontrolnoj grupi.
Mali broj limfocita i plazma ćelija u blizini centralnog kanala. H&E, X100

Figure 2. Harderian gland in chicks aged 14 and 21 days in control group.
Small number of lymphocytes and plasma cells near central canal. H&E, X100

(Davelaar i Kouwenhoven, 1981) čime se lokalno štiti okulonazalna mukoza od eventualnog prodora virusa infektivnog bronhitisa (Davelaar i Kouwenhoven, 1980b). Značajan porast titra antitela smo ustanovili u oglednoj grupi od 7. do 14. dana, gde je pik dostignut 14. dana (grafikon 2). Povećanje titra antitela u serumu dve nedelje nakon vakcinacije jednodnevnih pilića uočavaju Davelaar (1982), Ignjatović i Galli (1995), što je u saglasnosti sa rezultatima koje smo dobili u toku našeg ispitivanja. Neznatan pad titra smo izmerili od 14. do 21. dana starosti, što se razlikuje od nalaza koje su imali Mockett i Darbyshire (1981). Oni su izmerili povećanje titra antitela 5 dana nakon vakcinacije, a pik je dostignut 21. dana. Razliku u dobijenim rezultatima možemo objasniti eventualnom razlikom u virulentnosti vakcinalnog virusa.

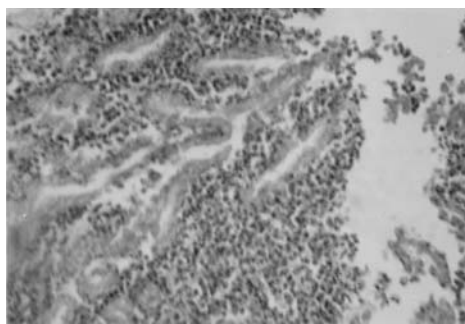
Histopatološkim ispitivanjem Harderove žlezde u kontrolnoj grupi kod pilića starih 7 dana uočavaju se izvodni kanali, pojedinačni limfociti i plazma ćelije (slika 1). Kod pilića starih 14 i 21. dan uočava se neznatno povećanje limfocita i plazma ćelija pored centralnog kanala (slika 2).

U oglednoj grupi 7. dana nakon vakcinacije u histopatološkom nalazu Harderove žlezde uočavaju se limfociti i visokovaskularizovane plazma ćelije u interacinusnim prostorima, a u izvodnim kanalima nađen je sekrecioni sadržaj (slika 3). Davelaar i Kouwenhoven (1976) kod pilića imunizovanih 1. dana života vakcinom H120 nakon 3 dana uočavaju povećanje broja plazma ćelija. Do istih rezultata dolaze i Toro i sar. (1996) koji još opisuju i sekrecioni sadržaj u sakupljačkim kanalima, što je u saglasnosti sa našim nalazima. Harderova žlezda je 14. dana ispunjena velikim brojem limfocita i plazma ćelija koje pokazuju znake destrukcije, a u izvodnim kanalima se nalazi sekret sa detritusom ćelija (slika 4). Iako poveća-



Slika 3. Harderova žlezda kod pilića starih 7 dana u oglednoj grupi. Povećanje broja limfocita i plazma ćelija. H&E, X400

Figure 3. Harderian gland in seven-day-old chicks in experimental group. Increased number of lymphocytes and plasma cells. H&E, X400

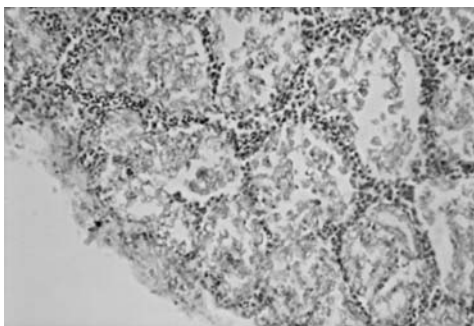


Slika 4. Harderova žlezda kod pilića starih 14 dana u oglednoj grupi. Veliki broj limfocita i plazma ćelija ispunjava žlezdu; blaga destrukcija plazma ćelija. H&E, X400

Figure 4. Harderian gland in 14-day-old chicks in experimental group. Large numbers of lymphocytes and plasma cells fill gland; mild destruction of plasma cells. H&E, X400

nje broja plazma ćelija i limfnih folikula pokazuje imunokompetentnost Harderove žlezde, vakcinalni virus je delimično oštećuje. U prilog tome govore istraživanja koja je sproveo Toro (1996), koji u plazma ćelijama nalazi Raselova telašca i ljušćenje tubulo-epitelnih ćelija. U svojim istraživanjima Davelaar i Kouwenhoven (1980) dve nedelje posle vakcinacije nalaze formirane limfne folikule.

Dvadeset prvog dana veliki broj plazma ćelija je prešao iz žlezdanog epitela u lumen tubula, koji je ispunjen sekretom. Dolazi do destrukcije plazma ćelija i detritusa epitela u izvodnim kanalima (slika 5).



Slika 5. Harderova žlezda kod pilića starih 21 dan u oglednoj grupi.
Veliki broj plazma ćelija, lumen tubula ispunjen sekretom i detritusom epitela.
Prisutna destrukcija plazma ćelija. H&E, X400

Figure 5. Harderian gland in 21-day-old chicks in experimental group.
Large number of plasma cells, tubular lumen filled with secretory material and epithelial detritus.
Destruction of plasma cells is present. H&E, X400

Zaključak / Conclusion

Na osnovu našeg ispitivanja i navoda iz literature došli smo do sledećih zaključaka:

Kod jednodnevnih brojlerskih pilića čiji su roditelji vakcinisani utvrđen je visok nivo maternalnih antitela na infektivni bronhitis, koji vremenom opada usled serokonverzije.

Prisutna maternalna antitela nemaju negativan efekat na imunološki odgovor živine kojoj je vakcina protiv IB aplikovana prvog dana starosti.

Harderova žlezda učestvuje u lokalnom imunološkom odgovoru na aplikovanu vakcinu povećanjem broja plazma ćelija i lučenjem imunoglobulina.

Literatura / References

1. Burns RB, Maxwell MH. The structure of the Harderian gland and lacrimal gland duct of the turkey, fowl and duck. A light microscope study. J Anat 1979; 128: 285-92.
2. Engström B, Eriksson H, Fossum O, Jansson D. Fjäderfäsjukdomar. Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt, 2003.

3. Glisson JR, Kleven SH. Poultry vaccines, In: Peters AR (Ed) Vaccines for veterinary Applications 1993; 165-98.
4. Ignjatović J, Sapats S. Avian infectious bronchitis. Rev Sci Tech 2000; 19(2): 493-508.
5. King DJ, Cavanagh D. Infectious bronchitis. In: Calnek, BM, Barnes, CW. et al. Diseases in poultry. 9.ed. Iowa State University 1991; 471-84.
6. Khan MZI, Jahan MR, Islam MN, Haque Z, Islam MR, Kon Y. Immunoglobulin (Ig) containing plasma cells in the Harderian gland in broiler and native chickens of Bangladesh. Tissue cell 2007; 39: 141-9.
7. Mondal SP, Naqi SA. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. Vet Immunol Immunopathol 2001; 79: 31-40.
8. Olah I, Kupper A, Kittner Z. The lymphoid substance of the chickens Harderian gland is organized in two histologically distinct compartments. Microsc Res Tech 1996; 34: 166-76.
9. Ohshima K, Hiramatsu K. Immunohistochemical localization of three different immunoglobulin classes in the Harderian gland of young chickens. Tissue and cell 2002; 34(2): 129-37.
10. Payne AP. The Harderian gland: a tercentennial review. J Anat 1994; 185: 1-49.
11. Shirama K, Satoh T, Kitamura T, Yamada J. The avian Harderian gland: Morphology and immunology. Microscopy Research and Technique 1996; 34: 16-27.
12. Walcott B, Sibony PA, Keyser KT. Neuropeptides and the innervation of the avian lacrimal gland. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989; 30(7): 1966-74.

ENGLISH

ROLE OF HARDERIAN GLAND IN IMMUNE RESPONSE OF CHICKENS WITH MATERNAL IMMUNITY TO VACCINE AGAINST INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

Ljiljana Spalevic, V. Ivetić, Dobrila Jakic-Dimic, Danka Maslic-Strizak, A. Potkonjak, N. Pavlovic

In this study we investigated the role of the Harderian gland in the immune response following vaccination against infectious bronchitis (IB). The experiment was carried out on 100 broiler chicks which were divided into two experimental groups.

Experimental group O was vaccinated on the first day of age against infectious bronchitis with vaccine Bronhivet I batches that contain a live attenuated strain H120 and the control group did not get immunized. The experiment lasted 21 days. Blood sera were examined on days 1, 7, 14 and 21 for the presence of specific antibodies against infectious bronchitis (ELISA test).

Histological changes were observed in the structure of the Harderian gland in relation to the applied vaccine. This research demonstrated the role of the Harderian gland as a secondary lymphoid organ in broiler vaccination against infectious bronchitis.

Maternal antibodies present in the IB had no negative impact on the vaccination of chickens on the first day of age. The vaccine virus partially damaged the Harderian gland.

Key words: Harderian gland, infectious bronchitis, maternal antibodies, secondary lymphoid organ

РУССКИЙ

РОЛЬ ЖЕЛЕЗЫ ХАРДЕРА В ИММУННОМ ОТВЕТЕ ЦИПЛЯТ С МАТЕРИНСКИМ ИММУНИТЕТОМ НА ВАКЦИНУ ПРОТИВ ВИРУСНОГО ИНФЕКЦИОННОГО БХРОНХИТА

Лиляна Спалевич, Добрила Якич-Димич, Данка Маслич-Стрижак, А. Потконяк, Н. Павлович

В этой работе испытана роль железы Хардера в иммуноогическом ответе после вакцинации против инфекционного бронхита (ИБ). Опыт охвачено 100 бройленых цыплят, которые разделены в две опытные группы. Опытная группа 01 вакцинирована первого дня старости против инфекционного бронхита вакциной Бронхивет I, содержащая живой аттенюированный штамм *H120* и контрольная группа, которая не иммунизирована. Опыт продолжался 21 день. Испытаны кровяные сыворотки 1, 7, 14 и 21 дня на присутствие специфических антител согласно инфекционному бронхиту (ELISA тест).

Слежены гистологические изменения в строении железы Хардера в отношении применённой вакцины. Этим исследованием доказана роль железы Хардера как вторичного лимфоидного органа у вакцинации бройлерных цыплят против инфекционного бронхита. Присутствующие материнские антитела на ИБ не имеют отрицательное влияние на вакцинацию цыплят в первом дне старости. Вакцинальный вирус частично повреждает железу Хардера.

Ключевые слова: железа Хардера, инфекционный бронхит, материнские антитела, вторичный лимфоидный орган

**ISPITIVANJE UTICAJA POSTUPAKA DEZINFEKCIJE NA
HIGIJENU U ZANATSKOJ KLANICI***
*INVESTIGATIONS OF INFLUENCE OF DISINFECTION PROCEDURES
ON HYGIENE IN PRIVATE SLAUGHTERHOUSE*

Ljiljana Janković, Brana Radenković-Damnjanović, N. Karabasil,
M. Mirilović, S. Marić**

Cilj rada je bio da se na osnovu dobijenih rezultata ukupnog broja bakterija pre i posle izvršenih dezinfekcija utvrdi da li su postojale razlike u efikasnosti dezinfekcije koju je izvršilo stručno lice i dezinfekcije koju je sproveo nestručno lice zanatske klanice.

Materijal za ova istraživanja su bili uzorci vlažno-suvih briseva uzetih tokom pet nedelja, pre i posle različitih postupaka dezinfekcije: sa noža kojim se vrši evisceracija, sa podne površine na mestu gde se vrši evisceracija, sa stola za skidanje dlaka i sa poda ispod stola za skidanje dlaka. Postupak uzimanja vlažno-suvog brisa je urađen prema standardnoj metodi ISO 18593 (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs). Iz uzetih uzoraka određen je ukupan broj bakterija standardnom metodom ISO 4833 (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30 °C). Dezinfekcija je obavljena hlornim preparatom (natrijum dihlorizocijanurat dihidrat) u koncentraciji od 0,02%; vreme ekspozicije je 30 min. Rezultati su interpretirani na osnovu graničnih vrednosti kod ocene higijene opreme, alata i radnih površina, predstavljeni u Commission Decision 471/2001/EC.

Rezultati ispitivanja su pokazali da je dezinfekcija koju je izvršilo stručno lice bila efikasnija od dezinfekcije koju je izvršilo nestručno lice jer je ukupan broj bakterija bio značajno manji ($p < 0,01$), u toku svih V eksperimentalnih nedelja na nožu za evisceraciju, na podnoj površini

* Rad primljen za štampu 30. 05. 2012. godine

** Dr sc. med. vet. Ljiljana Janković, docent, dr sc. med. vet. Brana Radenković-Damnjanović, red. profesor, Katedra za zoohigijenu; dr sc. med. vet. Nedeljko Karabasil, docent, Katedra za higijenu i tehnologiju mesa; dr Milorad Mirilović, docent, Katedra za ekonomiku i statistiku, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; spec. dr vet. med. Slobodan Marić, veterinarski inspektor, Banja Luka

ispod stola za skidanje dlaka u I, II i V nedelji, i na podu na mestu gde se vrši evisceracija u I i V nedelji.

Ključne reči: zanatska klanica, ukupan broj bakterija, dezinfekcija

Uvod / Introduction

Broj infekcija i intoksikacija ljudi namirnicama animalnog porekla u stalnom je porastu. S toga se u pogonima u kojima se proizvodi hrana svakodnevno postavlja sve više zahteva u cilju postizanja i održavanja higijenskih uslova za dobijanje zdravstveno ispravnog finalnog proizvoda. To se može postići poštovanjem načela dobre proizvođačke prakse (Good Manufacturing Practice) i primenom HACCP koncepta (Hazard Analysis Critical Control Points).

U klanice se svakodnevno preko stoke koja dolazi na klanje i preko radnika unosi veliki broj različitih vrsta mikroorganizama. Sam tehnološki proces u proizvodnji u klanicama je tako koncipiran da u pojedinim fazama utiče na brojnost mikroorganizama u mesu (visoke i niske temperature, procesi salamurenja, soljenja i dimljenja proizvoda). Pored svega, primena tehničko-tehnoloških metoda nije dovoljna da bi se smanjila brojnost mikroorganizama već je neophodna svakodnevna dezinfekcija.

U proizvodnji svinjskog mesa, postoje velike mogućnosti kontaminacije trupova patogenim mikroorganizmima. Primarna kontaminacija životinja može nastati još u oboru, usled valjanja svinja, u boksovima ili usled kontakta životinje sa izmetom koji je nosilac velikog broja saprofitnih, ali i patogenih mikroorganizama. Zdrave svinje mogu biti nosioci salmonela i zbog stresa kojem su izložene tokom transporta, kada često dolazi do pojave dijareje i kontaminacije poda i prostirke. Prevozno sredstvo koje posle transporta nije pravilno očišćeno, oprano i dezinfikovano može da bude izvor kontaminacije za zdrave životinje (Rajkowski i sar., 1998; Amass i sar., 2007; Mannion i sar., 2008). U klanici, do kontaminacije životinja mikroorganizmima može doći u „prljavoj zoni“, kojoj pripadaju: ulaz za životinje, istovarna rampa, mesto gde se životinje obeležavaju, depo, mesto gde se vrši inspekcija pred klanje životinja, izolacioni depo za bolesne životinje, objekat u kome se obavlja prinudno klanje, prostorija u kojoj se obavlja pregled uginulih životinja, mesto za obuzdavanje i omamljivanje životinja i mesto kvarenja. Stočni depo smatra se krajnjom tačkom transporta životinja sa farme do klanice. To je mesto u kojem se sakuplja veliki broj životinja, ne samo sa različitih geografskih lokaliteta, već i sa različitim epizootiološkim statusom. Iz stočnog depoa, mikroorganizmi mogu da se prenesu u pogon za proizvodnju i preradu mesa ili preko površine kože samih životinja ili fekalnom materijom, sa kojom su životinje došle u kontakt u depou ili na putu od depoa do klanice (Swanenburg i sar., 2001; Amaechi i Ezeronve, 2006).

Kontaminacija trupova je moguća sa površine kože životinja, sadržajem iz gastrointestinalnog trakta, preko opreme i pribora (Sammarco i sar.,

1997; Eustace i sar., 2007; Swanenburg i sar., 2001b; Gun i sar., 2003) odeće, obuće i ruku odgovornog lica i radnika, iz unutrašnje sredine same klanice, kao što su vazduh, pod, kanalizacioni otvori, ali i iz vode i aditiva koji se dodaju hrani (Small i sar., 2006; 2007a, b).

Sanitacija je dopuna tehnološkog procesa i pomoću nje se može kontrolisati mnoštvo kontaminenata koji mogu uzrokovati ozbiljne gubitke u proizvodnji. U industriji mesa pod tim pojmom se podrazumeva kompletan program mera čišćenja, pranja i dezinfekcije prostorija, radnih površina, instrumenata, pročišćavanje vazduha, pranje i sterilizacija odeće, održavanje sanitarnih čvorova, kao i mere dezinsekcije i deratizacije. Krajnji cilj sanitacije je prevencija, sprečavanje formiranja mogućih izvora kontaminacije, kao i svođenje ukupnog broja bakterija na najmanju moguću meru.

Pravilno sprovođenje dezinfekcije i ispiranje dezinfikovanih površina su integralni delovi svake operacije i svake faze proizvodnog procesa u klaničnoj industriji i jedan od veoma bitnih elemenata za bezbednost hrane. Problemi koji nastaju zbog nestručno sprovedene dezinfekcije imaju osnov u nepoznavanju same mere, njenog nestručnog sprovođenja, neadekvatnog obrazovanja radnika neposrednih izvršilaca ovih poslova kao i nepostojanja standarda za procenu uspeha i kontrole dezinfekcije (Radenković i sar., 1997; 1995; Rahkio i Korkeala, 1996; Naglić i Hajsig, 2005).

S obzirom na to da rad u zanatskoj klanici prate izvesni higijenski problemi, a da je za bezbednost hrane jedan od veoma bitnih elemenata pravilno sprovođenje dezinfekcije, cilj našeg rada je bio da se utvrdi ukupan broj bakterija pre i posle dezinfekcije, one koju je sproveo nestručno lice zanatske klanice i druge, koju je sproveo stručno lice, i da se analizom dobijenih rezultata utvrdi da li su postojale razlike u efikasnosti sprovedenih dezinfekcija.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Ispitivanje efikasnosti dezinfekcije koju je sproveo nestručno lice zanatske klanice i dezinfekcije u izvođenju stručnog lica, izvršeno je u zanatskoj klanici i u laboratorijskim uslovima.

Materijal za ova istraživanja su bili uzorci vlažno-suvih briseva uzetih sa određenih površina u zanatskom objektu pre i posle dezinfekcije stručnog i nestručnog lica.

Snake nedelje pre i posle dezinfekcije koju je sproveo stručno lice uzeti su uzorci briseva i to: sa noža kojim se vrši evisceracija, sa podne površine gde se vrši evisceracija, sa stola za skidanja dlaka i sa poda ispod stola za skidanje dlaka (I nedelja – ponedeljak; II nedelja – utorak; III nedelja – sreda, IV nedelja – četvrtak; V nedelja – petak) Brisevi su uzeti sa istih površina pre i posle dezinfekcije koju je sproveo nestručno lice zanatske klanice (I nedelja – utorak; II nedelja – sreda; III nedelja – četvrtak; IV nedelja – petak; V nedelja – ponedeljak).

Postupak uzimanja briseva sa površina je urađen prema standardnoj metodi ISO 18593 (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs). Iz uzetih uzoraka određivan je ukupan broj bakterija standardnom metodom ISO 4833 (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30 °C) u laboratoriji u Zavodu za higijenu namirnica na veterinarskom institutu u Banja Luci.

Dezinfekcija klanice obavljena je hlornim preparatom (natrijum dihlorizocijanurat dihidrat) u koncentraciji od 0,02% i vremenu ekspozicije od 30 minuta.

Interpretacija rezultata vršena je na osnovu graničnih vrednosti kod ocene higijene opreme, alata i radnih površina, predstavljena u Commission Decision 471/2001/EC.

U statističkoj analizi dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta korišćeni su deskriptivni statistički parametri, i to: aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška, interval varijacije i koeficijent varijacije. Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički značajnih razlika između ispitivanih eksperimentalnih grupa korišćen je Studentov t-test. Signifikantnost razlika ustanovljena je na nivoima značajnosti od 5% i 1%. Dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička obrada dobijenih rezultata urađena je u statističkom paketu PrismaPad 4.00.

Rezultati / Results

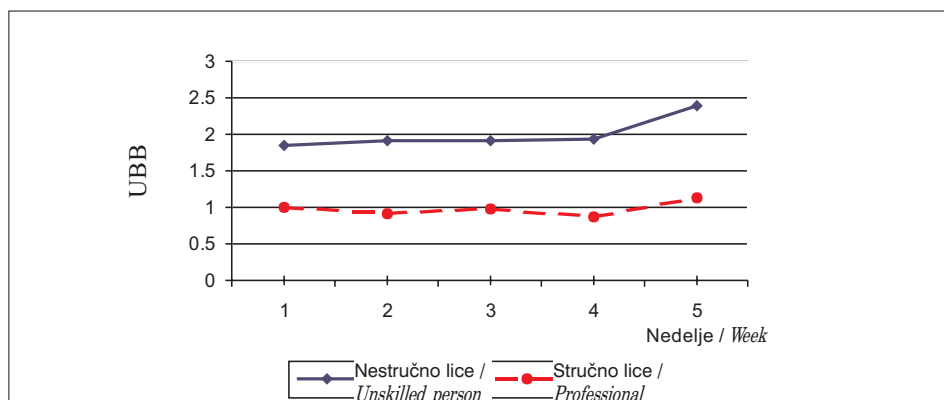
Razlika u ukupnom broju bakterija ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) na ispitivanim površinama u zanatskoj klanici pre dezinfekcije koju je sproveo nestručno lice klanice i one koju je sproveo stručno lice nije bila statistički značajna ($p > 0,05$).

Rezultati ukupnog broja bakterija ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) dobijeni posle obe dezinfekcije noža za evisceraciju su prikazani u tabeli 1 i na grafikonu 1.

Tabela 1. Ukupan broj bakterija ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) na nožu za evisceraciju posle dezinfekcije / Table 1. Total number of bacteria ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) on evisceration knife following disinfection

Nedelje / Week	Nestručno lice / <i>Unskilled person</i>		Stručno lice / <i>Professional</i>	
	$\bar{X} \pm \text{Sd}$	CV%	$\bar{X} \pm \text{Sd}$	CV%
1.	$1,85 \pm 0,44^x$	24,00	$1,01 \pm 0,20^x$	20,05
2.	$1,91 \pm 0,40^y$	21,17	$0,92 \pm 0,15^y$	16,06
3.	$1,92 \pm 0,54^z$	45,78	$0,97 \pm 0,15^z$	15,57
4.	$1,93 \pm 0,77^q$	40,07	$0,87 \pm 0,05^q$	5,96
5.	$2,40 \pm 0,52^w$	21,85	$1,14 \pm 0,45^w$	39,52

Statistički značajna razlika je prikazana istim slovima $p < 0,01$ x, y, z, q, w i $p < 0,05$ a, b, c / Statistically significant difference shown with same letters $p < 0,01$ x, y, z, q, w and $p < 0,05$ a, b, c



Grafikon 1. Ukupan broj bakterija (log CFU/cm²) na nožu za evisceraciju posle dezinfekcije / Graph 1. Total number of bacteria (log CFU/cm²) on evisceration knife following disinfection

Iz rezultata dobijenih posle dezinfekcije noža za evisceraciju se može uočiti da je dezinfekcija stručnog lica bila efikasnija od dezinfekcije koju je sprovedo nestručno lice zanatske klanice. Smanjenje ukupnog broja bakterija (log CFU/cm²) je bilo značajno ($p < 0,01$) posle dezinfekcije stručnog lica u toku svih V eksperimentalnih nedelja u odnosu na ukupan broj bakterija utvrđen na nožu posle dezinfekcije nestručnog lica zanatske klanice.

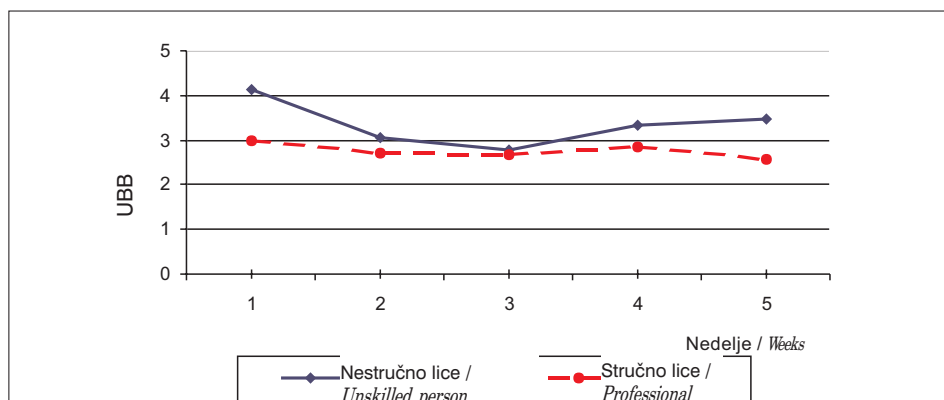
Ukupan broj bakterija na podu na mestu gde se vrši evisceracija posle dezinfekcije od strane nestručnog lica zanatske klanice i one od strane stručnog lica prikazani su u tabeli 2 i na grafikonu 2.

Tabela 2. Ukupan broj bakterija (log CFU/cm²) posle dezinfekcije na podu na mestu gde se vrši evisceracija /

Table 2. Total number of bacteria (log CFU/cm²) following disinfection of floor in evisceration area

Nedelje / Week	Nestručno lice / Unskilled person		Stručno lice / Professional	
	$\bar{X} \pm Sd$	CV%	$\bar{X} \pm Sd$	CV%
1.	4,14±0,40 ^x	9,74	2,99±0,20 ^x	6,80
2.	3,06 ±0,52	17,09	2,71±0,42	15,48
3.	2,79±0,51	18,23	2,68±0,37	13,95
4.	3,34±0,50	14,93	2,83±0,48	17,11
5.	3,47±0,31 ^y	8,91	2,57±0,40 ^y	15,58

Statistički značajna razlika je prikazana istim slovima $p < 0,01$ x, y, z i $p < 0,05$ a, b, c / Statistically significant difference shown with same letters $p < 0,01$ x, y, z and $p < 0,05$ a, b, c



Grafikon 2. Ukupan broj bakterija (log CFU/cm²) posle dezinfekcije na podu na mestu gde se vrši evisceracija /

Graph 2. Total number of bacteria (log CFU/cm²) following disinfection of floor in evisceration area

Analizom rezultata ukupnog broja bakterija (log CFU/cm²) dobijenih posle dezinfekcije poda na mestu gde se vrši evisceracija može se zaključiti da je dezinfekcija od strane stručnog lica bila efikasnija u I i V nedelji, jer je utvrđen statistički značajno manji ($p < 0,01$) broj bakterija na podu u odnosu na broj bakterija posle dezinfekcije od strane nestručnog lica klanice. U II, III i IV nedelji, utvrđene razlike u ukupnom broju bakterija posle sprovedenih dezinfekcija nisu bile značajne ($p > 0,05$).

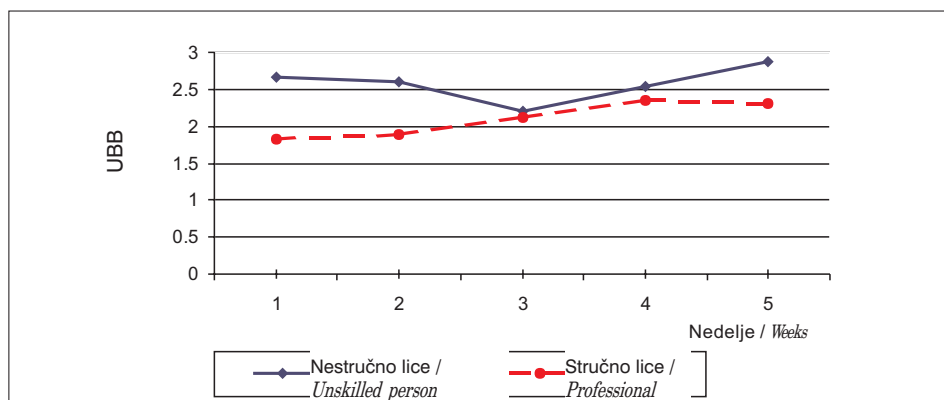
Rezultati ukupnog broja bakterija na stolu za skidanje dlake posle dezinfekcije od strane nestručnog i one od strane stručnog lica prikazani su u tabeli 3 i na grafikonu 3.

Tabela 3. Ukupan broj bakterija (log CFU/cm²) posle dezinfekcije stola za skidanje dlake /

Nedelje / Week	Nestručno lice / Unskilled person		Stručno lice / Professional	
	$\bar{X} \pm Sd$	CV%	$\bar{X} \pm Sd$	CV%
1.	$2,62 \pm 0,28^x$	10,75	$1,82 \pm 0,33^x$	17,95
2.	$2,60 \pm 0,30^y$	11,54	$1,88 \pm 0,49^y$	26,33
3.	$2,20 \pm 0,41$	18,50	$2,12 \pm 0,83$	39,13
4.	$2,54 \pm 0,32$	12,63	$2,34 \pm 0,60$	25,42
5.	$2,88 \pm 0,57$	19,94	$2,30 \pm 0,63$	27,60

Statistički značajna razlika je prikazana istim slovima $r < 0,01$ x, y, z i $p < 0,05$ a, b, c /

Statistically significant difference shown with same letters $p < 0,01$ x, y, z and $p < 0,05$ a, b, c



Grafikon 3. Ukupan broj bakterija ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) posle dezinfekcije stola za skidanje dlaka / Graph 3. Total number of bacteria ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) following disinfection of bristle removal surface

Analizom rezultata dobijenih posle dezinfekcije stola za skidanje dlake, može se uočiti da je u I i II nedelji ukupan broj bakterija posle dezinfekcije od strane stručnog lica bio statistički značajno manji ($p < 0,01$) u odnosu na broj bakterija utvrđen posle dezinfekcije od strane nestručnog lica zanatske klanice, dok u III, IV i V nedelji utvrđene razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$).

Rezultati ukupnog broja bakterija na podu ispod stola za skidanje dlaka posle dezinfekcije koju je sproveo nestručno lice zanatske klanice i posle dezinfekcije koju je sproveo stručno lice su prikazani u tabeli 4 i na grafikonu 4.

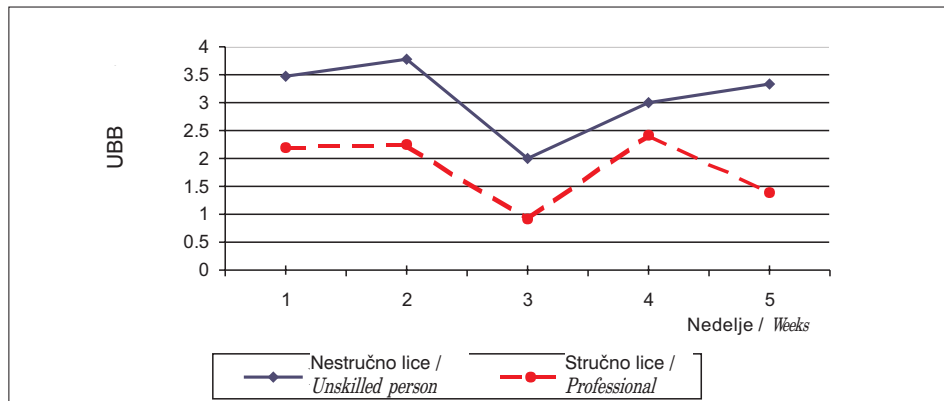
Tabela 4. Ukupan broj bakterija ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) posle dezinfekcije na podu ispod stola za skidanje dlaka /

Table 4. Total number of bacteria ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) following disinfection of floor underneath bristle removal surface

Nedelje / Week	Odgovorno lice klanice		Stručno lice – veterinar	
	$\bar{X} \pm \text{Sd}$	CV%	$\bar{X} \pm \text{Sd}$	CV%
1.	$3,48 \pm 0,21^x$	6,06	$2,20 \pm 0,12^x$	5,57
2.	$3,78 \pm 0,46^y$	16,67	$2,24 \pm 0,13^y$	5,82
3.	$1,99 \pm 0,85$	42,70	$0,93 \pm 0,14$	14,64
4.	$2,99 \pm 0,56$	18,80	$2,43 \pm 0,58$	23,74
5.	$3,34 \pm 0,32^z$	9,70	$1,38 \pm 0,49^z$	20,47

Statistički značajna razlika je prikazana istim slovima $p < 0,01$ x, y, z i $p < 0,05$ a, b, c /

Statistically significant difference shown with same letters $p < 0.01$ x, y, z and $p < 0.05$ a, b, c



Grafikon 4. Ukupan broj bakterija ($\log CFU/cm^2$) posle dezinfekcije na podu ispod stola za skidanje dlake /

Graph 4. Total number of bacteria ($\log CFU/cm^2$) following disinfection of floor under bristle removal surface

Iz dobijenih rezultata se može videti da je ukupan broj bakterija na podu ispod stola za skidanje dlake utvrđen posle dezinfekcije stručnog lica bio statistički značajno manji ($p < 0,01$) u I, II i V nedelji u odnosu na ukupan broj bakterija utvrđen posle dezinfekcije od strane odgovornog lica zanatske klanice. U III i IV nedelji utvrđene razlike nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$).

Diskusija / Discussion

Dobro sprovedena dezinfekcija je preduslov za proizvod dobrog kvaliteta. Radni stolovi, pribor, oprema, podovi klanice i podovi hladnjača su važna mesta koja mogu biti izvor patogena za kontaminaciju zaklanih životinja i s toga je neophodno da se u klanicama pravilno sprovede faze dezinfekcije (mehaničko čišćenje i sanitarno pranje) i dezinfekcija (Sammarco i sar., 1997; Borch i sar., 1996; Newton i sar., 2008).

Rezultati utvrđenog ukupnog broja bakterija posle dezinfekcije noža za evisceraciju ukazuju na činjenicu da su faze dezinfekcije od strane stručnog lica bile pravilno sprovedene, jer je ukupan broj bakterija bio značajno manji ($p < 0,01$) u toku svih pet nedelja, u odnosu na broj bakterija posle dezinfekcije koju je izvršilo nestručno lice zanatske klanice. Pravilno sprovedena dezinfekcija i zamena noževa u toku rada veoma je bitna, jer su istraživanja pokazala da je najčešći način kontaminiranja mesa rukama i prljavim alatom (Newton i sar., 2008, i Gun i sar., 2003; Rahkio i Korkeala, 1996). Noževi se u klanicama peru na tradicionalan način ispiranjem u vodi na temperaturi od $20^{\circ}C$ - $40^{\circ}C$, a potom se kratko potapaju u kupku (sterilizator) u kojoj temperatura vode nije ispod $82^{\circ}C$. Eustace i sar. (2007) su u klanici posle ovakvog tradicionalnog načina pranja noževa i kratkog potapanja u kupku (sterilizator) utvrdili prisustvo mikroorganizama na 20 noževa od ispitivanih 230 (8,7%).

Posle dezinfekcije poda od strane stručnog lica na mestu gde se vrši evisceracija u I i V nedelji utvrđen je značajno manji ($p < 0,01$) broj bakterija, u odnosu na ukupan broj bakterija posle dezinfekcije od strane nestručnog lica. Razlike u II, III i IV nedelji nisu bile značajne ($p > 0,05$). Mnogobrojna istraživanja su potvrdila da prisustvo organskih materija umanjuje efikasnost hlornih preparata, što navodi na zaključak da i u ovom eksperimentu, na tretiranim površinama, na kojima nije došlo do značajnog smanjenja ukupnog broja bakterija posle dezinfekcije, nisu pravilno sprovedene faze dezinfekcije, mehaničko čišćenje i sanitarno pranje. Teodorović i sar. (1994) su utvrdili da natrijum dihlorizocijanurat dihidrat (Galisept) u laboratorijskim uslovima u koncentraciji od 2% uništava test mikroorganizme, tokom ekspozicije od samo 0,5 min. U zanatskoj klanici u kojoj su vršena ispitivanja, sanitarno pranje vrši se hladnom vodom. Kada je temperatura vode 50°C uz dodatak surfaktanata ili deterdženata, visok broj mikroorganizama (90% i više) može biti uklonjen sa površina (FAO). U literaturi, većina autora ukazuje na činjenicu da se značajno smanjenje nivoa mikroorganizama postiže efikasnim sanitarnim pranjem i dezinfekcijom (Rajkowski i sar., 1998; Samarco i sar., 1997; Swanenburg i sar., 2001b).

Efikasno mehaničko čišćenje, sanitarno pranje i dezinfekciju stola za skidanje dlake izvršilo je stručno lice u I i II nedelji, jer je ukupan broj bakterija posle dezinfekcije bio značajno manji, ($p < 0,01$) u odnosu na broj bakterija utvrđen posle dezinfekcije nestručnog lica zanatske klanice. U III, IV i V nedelji utvrđene razlike u ukupnom broju bakterija posle izvršenih dezinfekcija nisu bile statistički značajne ($p < 0,05$). Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa navodima McDowella i sar. (2007), koji su utvrdili da je kontaminacija trupova najveća krajem nedelje (petak), a najmanja na početku nedelje (ponedeljak), što je povezano sa higijenom i dezinfekcijom klanice. Sammarco i sar. (1997) navode da su radni stolovi važna mesta koja mogu biti izvor patogena kao što su *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* i *Listeria monocytogenes* i da je potrebno dati veći značaj mehaničkom čišćenju i sanitarnom pranju klanica, pribora i opreme. Ispitivanjem stepena kontaminacije u 11 klanica isti autori su utvrdili prisustvo *Salmonelle* na jednom od 16 radnih stolova, dok je *Yersinia enterocolitica* otkrivena u dva uzorka uzetih sa dva radna stola.

Ukupan broj bakterija utvrđen posle dezinfekcije stručnog lica, na podu ispod stola za skidanje dlake je bio statistički značajno manji ($p < 0,01$) u I, II i V nedelji u odnosu na broj bakterija utvrđen posle dezinfekcije koju je izvršilo nestručno lice zanatske klanice, dok razlike u III i IV nedelji nisu bile značajne ($p > 0,05$).

Čišćenje i pranje u klanicama podrazumeva da po završenom procesu proizvodnje sve površine moraju biti oslobođene od ostataka iz prethodne proizvodnje. Da je mehaničko čišćenje i sanitarno pranje uspešno izvršeno, zaključuje se na osnovu kontinuiranog filma vode koji u potpunosti prekriva određenu površinu tj. kada njen kontinuitet nije nigde prekinut ostacima masti ili belančevina (Radenković i sar., 1997, 1995; Naglić, 2005). Istraživanja su pokazala da

rutinsko čišćenje i pranje nije dovoljno za uklanjanje većeg dela patogenih mikroorganizama sa podova, što se može uočiti i iz naših rezultata dobijenih posle dezinfekcije koju je sproveo nestručno lice zanatske klanice. Small i sar. (2006; 2007a, b) izveštavaju da je *Salmonella* izolovana u 70%-90% uzoraka briseva uzetih sa poda depoa i poda koridora i da je uobičajeni način čišćenja i dezinfekcije smanjio nivo kontaminacije na 25% pozitivnih uzoraka (što nije dovoljno da se eliminiše rizik), dok je poboljšana procedura čišćenja i dezinfekcije smanjila ovaj nivo na 10% pozitivnih uzoraka, što je i dalje nezadovoljavajuće i ukazuje na činjenicu da je neophodno poboljšati procedure čišćenja i dezinfekcije u klanici.

Zaključak / Conclusion

Analizom rezultata ukupnog broja bakterija, dobijenih posle dezinfekcije nestručnog lica zanatske klanice i dezinfekcije stručnog lica se može zaključiti da je na ispitivanim površinama na kojima je pravilno sprovedena dezinfekcija, došlo do značajnog smanjenja ukupnog broja bakterija. Dobijeni rezultati takođe ukazuju na činjenicu da je neophodno poboljšati procedure mehaničkog čišćenja, sanitarnog pranja i dezinfekcije u zanatskoj klanici.

Literatura / References

1. Amaechi N, Ezeronve O. Occurrence of *Salmonella* spp. in slaughtered healthy swine and abattoir environment of Umuahia. Abia State Nigeria. J Anim Vet Adv 2006; 5(4): 289-93.
2. Amass F, Thompson B, Dimmich M, Gaul A, Schneider J. Impact of downtime on reducing aerobic bacterial counts in cleaned and disinfected trailers, J Swine Health Prod 2007; 15(1): 37-41.
3. Borch E, Nesbakken T, Christensen H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. J Food Microbiol 1999; 30(1): 9-25.
4. Eustace I, Midgley J, Giarrusso C, Laurent C, Jenson I, Sumner J. An alternative process for cleaning knives used on meat slaughter floors. J Food Microbiol 2007; 113(1): 23-7.
5. Gun H, Yilmaza A, Turker S, Tanlasia A, Yilmaz H. Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. J Food Microbiol 2003; 84(3): 339-4.
6. Mannion CJ, Egan J, Lynch B, Fanning S, Leonard N. An investigation into the efficacy of washing trucks following the transportation of pigs - a *Salmonella* perspective. Foodborne Pathogens and Disease 2008; 5(3): 261-71.
7. McDowell SJ, Portera R, Madden R, Cooper B, Neill SD. Salmonella in slaughter pigs in Northern Ireland: Prevalence and use of statistical modelling to investigate sample and abattoir effects. Int J Food Microbiol 2007; 118(2): 116-25.
8. Naglić T, Hajsig D. Dezinfekcija – osnova biosigurnosti. Praxis Veterinaria 2005; 3: 205-14.
9. Newton KG, Harrison CL, Wauters AM. Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir, J Appl Microbiol 2008; 45(1): 75-82.

10. Rahkio M, Korkeala H. Microbiological contamination of carcasses related to hygiene practice and facilities on slaughtering lines. *Acta Vet Scand* 1996; 37(3): 219-28.
11. Radenković B, Janković Lj. Značaj sanitarnog pranja u dezinfekciji. *Veterinarski glasnik* 1997; 51; 433-52.
12. Radenković B, Teodorović R, Janković Lj. Propusti koji prate dezinfekciju. *Zbornik kratkih sadržaja sa VII kongresa mikrobiologa Jugoslavije* 1995; 185.
13. Rajkowski T, Eblen S, Laubach C. Efficacy of washing and sanitizing trailers used for swine transport in reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J Food Prot* 1998; 61(1): 31-5.
14. Sammarco ML, Ripabelli G, Ruberto A, Iannitto G, Grasso M. Prevalence of salmonellae, listeriae, and yersiniae in the slaughterhouse environment and on work surfaces, equipment, and workers. *J Food Prot* 1997; 60: 367-71.
15. Small A, James C, James S, Davies R, Howell M, Hutchison M, Bunčić S. Construction, management and cleanliness of red meat abattoir lairages in the UK. *Meat Sci* 2007a; 75: 523-32.
16. Small A, James C, James S, Davies R, Liebana E, Howell M, Hutchison M, Buncic S. Presence of *Salmonella* in the red meat abattoir lairage after routine cleansing and disinfection and on carcasses. *J Food Prot* 2006; 69 (10): 2342-51.
17. Small A, James C, Purnell G, Losito P, James S, Buncic S. An evaluation of simple cleaning methods that may be used in red meat abattoir lairages. *Meat Sci* 2007b; 75: 523-32.
18. Small A, Purnell G, James S, James C. Routes of *Salmonellae* contamination in pig lairages and the development and evaluation of simple cleaning methods. 7th International Symposium on the epidemiology control of foodborne pathogens in pork, 2007.
19. Swanenburg M, Urlings HA, Snijders JM, Keuzenkamp DA, Knapen F. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int J Food Microbiol* 2001b; 70(3): 243-54.
20. Swanenburg M, Wolfb PJ, Urlingsa AP, Snijdersc MA, Knapenc F. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. *Int J Food Microbiol* 2001; 70(3): 231-42.
21. Swanenburg M, Urlings HA, Keuzenkamp DA, Snijders JM. *Salmonella* in the lairage of pig slaughterhouses. *J Food Prot* 2001a; 64(1): 12-6.
22. Teodorović R, Radenković B, Teodorović V, Janković Lj. Ispitivanje baktericidnog efekta smesa Galisepta i odabranih deterdženata. V simpozijum DDD u zaštiti životne sredine, 1994: 21-5.
23. FAO corporate document repository. Meat processing hygiene. <http://www.fao.org/docrep>

ENGLISH

INVESTIGATIONS OF INFLUENCE OF DISINFECTION PROCEDURES ON HYGIENE IN PRIVATE SLAUGHTERHOUSE

Ljiljana Janković, Brana Radenković-Damnjanović, N. Karabasil, M. Mirilović, S. Marić

The objective of this work was to establish, on the grounds of obtained results for the total number of bacteria before and after completed disinfection, whether there are differences in the efficiency of disinfection performed by a professional and disinfection carried out by an unqualified employee in a private slaughterhouse.

The material used in these investigations were samples of wet-dry swabs taken over a course of five weeks, before and after disinfection carried out by an unqualified employee and the skilled professional, from the following: the knife used for evisceration, the floor in the evisceration area, from the table serving for bristle removal, and from the floor underneath the bristle removal surface. The wet-dry swabs were taken according to the procedure described in the standard method ISO 18593 (Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs). Analysing the taken samples, the total number of bacteria was determined using the standard method ISO 4833 (Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30°C). Disinfection was carried out using a chlorine preparation (sodium dichloroisocyanurate dihydrate) in a concentration of 0.02% and for an exposure period of 30 min. The results were interpreted on the grounds of the border values in evaluating the hygiene of the equipment, tools, and work surfaces, presented in Commission Decision 471/2001/EC.

The results of the investigations have shown that the disinfection performed by the skilled professional was more efficient than the disinfection performed by the unqualified person, as the total number of bacteria was significantly smaller ($p < 0.01$) in the course of all 5 experimental weeks on the evisceration knife, the floor under the bristle removal surface, during weeks 1, 2 and 5, and on the floor in the evisceration area in weeks 1 and 5.

Key words: private slaughterhouse, total number of bacteria, disinfection

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОСТУПКОВ ДЕЗИНФЕКЦИИ НА ГИГИЕНУ В РЕМЕСЛЕННОЙ СКОТОБОЙНЕ

Лиляна Янкович, Брана Раденкович-Дамнянович, Неджелько Карабасил, Милорад Мирилович, Слободан Марич

Цель работы была, что на основе полученных результатов совокупного числа бактерий перед и после совершенных дезинфекций, утвердить существовали ли разницы в эффективности дезинфекции, которую совершило специальное лицо и дезинфекции, которую провело неспециальное лицо ремесленной скотобойни.

Материал для этих исследований были образчики влажно-сухих мазков, взятых в течение пяти недель, перед и после дезинфекции неспециального и специального лица а именно: с ножа, которым совершается эвисцерация, с половой поверхности на месте, где совершается эвисцерация, со стола для снятия шерсти и с пола под столом для снятия шерсти. Поступок брания влажно-сухого мазка сделан по стандартному методу ISO 18593 (Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs). Из взятых образчиков определено совокупное число бактерий стандартным методом ISO 4833 (Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30°C). Дезинфекция совершена с хлорным препаратом (натрий дихлоризоцианурат дихадрат) в концентрации от 0,02% и при времени экспозиции от 30 мин. Интерпретация результатов совершена на основе пограничных стоимостей у оценки гигиены оснастки, инструментов и рабочих поверхностей, представлена с Commission Decision 471/2001/EC.

Результаты испытания показали, что дезинфекция, которую совершило специальное лицо была более эффективная дезинфекция, которую совершило неспециальное лицо ибо совокупное число бактерий было значительно меньше ($p < 0,01$), в течение всех экспериментальных недель на ноже для эвисцерации, на половой поверхности под столом для снятия шерсти в I, II и V неделе, и на полу на месте, где совершается эвисцерация в I и V неделе.

Ключевые слова: ремесленная скотобойная, совокупное число бактерий, дезинфекция

**NALAZ SALMONELA NA POVRŠINAMA U STOČNOM DEPOU
I BOKSU ZA OMAMLJIVANJE SVINJA***
SALMONELLA IN PIG LAIRAGE AND IN STUNNING BOX

N. Karabasil, Mirjana Dimitrijević, Nataša Pavličević, V. Teodorović,
Jasna Lončina, Jelena Nedeljković Trailović, M. Ž. Baltić**

Salmonele spadaju među važnije patogene, a meso svinja jedan je od glavnih izvora infekcije potrošača. Cilj ovoga rada je da se ispita prisustvo salmonela na različitim površinama u stočnom depou i boksu za omamljivanje svinja, kao potencijalnih izvora unakrsne kontaminacije svinja i trupova zaklanih životinja na liniji klanja. Uzorkovanja su sprovedena u dve klanice (klanica A i klanica B). Uzorci iz klanice A uzeti su u dva navrata (uzorkovanje I i II, ukupno 60 uzoraka), a u klanici B jedanput (uzorkovanje III, ukupno 30 uzoraka), sa sledećih površina: pod istovarne rampe; koridor istovarna rampa – stočni depo; zidovi boksa u stočnom depou; pod boksa u stočnom depou; voda iz napajalice u stočnom depou; kanal za tečnost/fekalije; prolaz od stočnog depoa do koridora; koridor od stočnog depoa do boksa za omamljivanje, ulaz/vrata boksa za omamljivanje; pod boksa za omamljivanje. Od ukupnog broja pregledanih uzoraka, procenat pozitivnih uzoraka na salmonelu, u stočnom depou je bio 12,50 % (72/9), a iz uzoraka sa površina boksa za omamljivanje 61,11 % (18/11). Površine u stočnom depou i boksu za omamljivanje redovno su kontaminirane salmonelom i mogu predstavljati izvore unakrsne kontaminacije životinja pa i trupova na liniji klanja svinja.

Ključne reči: salmonela, svinje, površine, kontaminacija

Uvod / Introduction

Salmonele spadaju među važnije patogene, a meso svinja jedan je od glavnih izvora infekcije potrošača. U Belgiji su, prema podacima iz 2008. godine,

* Rad primljen za štampu 25. 10. 2011. godine

** Dr sc. med. vet. Nedeljko Karabasil, docent, dr sc. med. vet. Mirjana Dimitrijević, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; Nataša Pavličević, Veterinarski specijalistički institut Subotica, Subotica; dr sc. med. vet. Vlado Teodorović, red. profesor, Jasna Lončina, Jelena Nedeljković Trailović, dr sc. med. vet. Milan Ž. Baltić, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

registrovana 3944 slučaja infekcije salmonelama, od čega je *Salmonella Typhimurium* (57 %) bio najčešći serotip (NRSS, 2008). Smatra se da je stvaran broj infekcija potrošača znatno veći od zabeleženih, jer jedan broj ostaje neprijavljen (EFSA, 2008). Da bi se utvrdili izvori kontaminacije salmonelama u lancu proizvodnje mesa, značajan podatak predstavlja informacija o nalazu ovih bakterija na farmi (Korsak i sar., 2003). Prilikom transporta svinja od farme do klanice prevalenca salmonela se povećava, što ukazuje na to da se radi o unakrsnoj kontaminaciji. Unakrsna kontaminacija u klanici predstavlja značajan problem sa aspekta bezbednosti hrane (De Busser i sar., 2011; Mannion i sar., 2011; De Sadeleer i sar., 2008; Rostagno i sar., 2007; Karabasil i sar., 2007; Kraken i sar., 2003; Small i sar., 2002), a u prilog ovoj činjenici govori podatak da je utvrđen sedam puta češći nalaz salmonela u uzorcima svinja uzetih iz stočnog depoa u odnosu na uzorke svinja sa farme (Hurd i sar., 2001). Istraživanjima u SAD-u i Evropi zaključeno je da je *S. enterica* široko rasprostranjena na površinama u stočnom depou svinja (Rostagno i sar., 2010; Karabasil i sar., 2008; Karabasil, 2006; Rostagno i sar., 2003; Swanenburg i sar., 2001a). Jedan od razloga za povećanje nalaza ovog patogena, jeste dug period tokom koga se životinje drže u kontaminiranom prostoru stočnog depoa, nekada i preko 12 h (Morgan i sar., 1987). U eksperimentalnim uslovima svinje se mogu inficirati bakterijom *S. Typhimurium* za relativno kratko vreme tokom boravka u kontaminiranim boksevima, a ovaj serotip je takođe izolovan iz fecesa i cekuma 30 do 60 minuta nakon ekspozicije životinja sa infektom (Hurd i sar., 2001a; 2001b).

Cilj ovoga rada je da se ispita prisustvo salmonela na različitim površinama u stočnom depou i boksu za omamljivanje svinja.

Materijal i metode rada / Material and methods

Uzorkovanja su sprovedena u dve klanice (klanica A i klanica B). Linija klanja i obrade na klanici A je automatizovana i transport duž linije se obavlja pomoću konvejskih sistema. Prema satnom kapacitetu, na ovoj liniji se zakolje i obradi oko 150 svinja h⁻¹. Linija klanja i obrade svinja u klanici B je malog satnog kapaciteta i obavlja se više operacija na jednom radnom mestu. Na ovim klanicama zakolje se i obradi oko 10 svinja h⁻¹. Uzorci iz klanice A uzeti su u dva navrata (uzorkovanje I i II), a iz klanice B (uzorkovanje III) jedanput.

Uzorci za izolaciju salmonela uzeti su sa površina u stočnom depou i boksu za omamljivanje svinja. Prilikom uzorkovanja u stočnom depou, brisevi su uzeti sa sledećih mesta: 1. pod istovarne rampe; 2. koridor istovarna rampa – stočni depo; 3. zidovi boksa u stočnom depou; 4. pod boksa u stočnom depou; 5. voda iz napajalice u stočnom depou; 6. kanal za tečnost/fekalije; 7. prolaz od stočnog depoa do koridora; 8. koridor od stočnog depoa do boksa za omamljivanje. Uzorci iz boksa za omamljivanje uzeti su sa vrata i poda.

Sa svih navedenih površina uzeta su po tri brisa sa različitih mesta (uzorkovanje I, 30 briseva; uzorkovanje II, 30 briseva; uzorkovanje III, 30 briseva).

Uzorkovanje u stočnom depou je vršeno dok su životinje boravile u istom pre početka rada, a kada se radi o uzorcima iz boksa za omamljivanje tokom sredine radnog dana.

Postupak uzimanja uzoraka i metoda izolacije salmonela sprovedena je prema Small i sar. (2002). Za uzimanje uzoraka korišćeni su ravni celulozni sunderi veličine 20 x 18 cm, presavijeni na pola. Tako presavijen sunder je ponovo presavijen na pola i stavljen u sterilnu stomaher kesu zapremine 400 ml. Svaki sunder je navlažen neposredno pre upotrebe, sa 10 ml MRD-ja (*Maximum Recovery Diluent*). Preko spoljašnje strane stomaher kese, bris je fiksiran jednom rukom. Otvor stomaher kese je prevučen preko iste ruke, kao rukavica, tako da je omogućeno uzimanje uzorka/brisa sa ciljane površine. Šablon sa otvorom 10 x 10 cm (100 cm²) je oslanjan na površinu sa koje se želi uzeti bris. Sunder je stavljan na označenu površinu šablona i uzorak brisa je uzet jednim potezom prevlačenjem sundera sa leve na desnu stranu. Na neravnim površinama, na kojima metalni šablon nije mogao da se koristi, brisevi su uzeti sa površine koja je vizuelno procenjena. Nakon uzimanja brisa, stomaher kesa je svučena sa ruke i presavijena. Uzeti uzorci su čuvani pri + 4 °C i obrađeni u laboratoriji u roku od dva sata od momenta uzorkovanja.

U laboratoriji, 90 ml MRD-ja je naliveno u stomaher kese sa brisevima. Brisevi su manuelno homogenizovani (gnječeni) jedan minut, da bi prisutni mikroorganizmi prešli sa površine brisa u MRD. Homogenizat je naliven u količini od 10 ml u 240 ml BPW (*Buffer Peptone Water*) podloge za predobogaćenje. Nakon predobogaćenja u BPW tokom 16-20 h pri 37° C, 0,1 ml je zasejan u 10 ml RV (*Rappaport Vassiliadis Broth*) i 10 ml u 100 ml SCB (*Selenite Cysteine Broth*). Bujoni su inkubisani pri 42° C (RV) i 37° C (SCB) tokom 24 h. Alikvot iz jednog odnosno drugog bujona je presejan omčicom na površinu ploča BGA i XLD agara. Ploče su inkubisane tokom 24 h pri 37° C. SCB je vraćen u termostat na još 24h pri 37° C, nakon čega je vršeno zasejavanje kao što je prethodno opisano. Ploče BGA (*Brilliant Green Agar*) i XLD (*Xylose Lysine Desoxycholate Agar*) agara na kojima nije bilo rasta posle 24 h, vraćene su u termostat na još 24 h inkubacije pri 37° C. Sumnjive kolonije sa BGA (crvene) i XLD agara (crvene sa crnim centrom) su zasejane metodom iscrpljivanja na PCA (*Plate Count Agar*) (24h pri 37° C) i kasnije potvrđene korišćenjem sledećih testova: bojenje po Gramu (-), dvostruki šećer (kosina crvena / stubić žut-crni), katalaza (-), oksidaza (-) i ureaza (-) test, polivalentni serum O i H. Kolonije salmonela su presejane na kosi agar (PCA) za serotipizaciju. Određivanje serotipa, izolovanih salmonela, urađeno je na Institutu za zaštitu zdravlja Srbije, metodom brze aglutinacije (aglutinacija na pločici) sa komercijalno pripremljenim serumima (Institut za zaštitu zdravlja Srbije). Antigena formula za *Salmonella* spp. očitavana je prema Popoff-u (2001).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Nalaz salmonela u stočnom depou.

Prvi deo naših istraživanja odnosi se na prisustvo salmonela na različitim površinama u stočnom depou svinja na klanicama (A i B). Od ukupnog broja pregledanih uzoraka (72), 9 (12,50 %) je bilo pozitivno na salmonele (tabela 1). Salmonela je utvrđena u klanici A prilikom uzorkovanja I u 16,67 % i uzorkovanja II u 8,33 %, dok u klanici B (uzorkovanje III) u 12,50 % pregledanih uzoraka.

Tabela 1. Nalaz salmonela u stočnom depou i boksu za omamljivanje svinja /

Klanica / <i>Slaughterhouse</i>	A						B			A + B		
Uzorkovanje / <i>Sampling</i>	I			II			III			I+II+III		
Površina / <i>Surface</i>	n	S	%	n	S	%	n	S	%	n	S	%
Stočni depo / <i>Holding pens</i>	24	4	16,67	24	2	8,33	24	3	12,50	72	9	12,50
Boks za omamljivanje / <i>Stunning box</i>	6	3	50,00	6	6	100,00	6	2	33,33	18	11	61,11
Ukupno / <i>Total</i>	30	7	23,33	30	8	26,67	30	5	16,67	90	20	22,22

Napomena: n – broj pregledanih uzoraka; S – broj pozitivnih uzoraka na salmonele /

Note: n – number of examined samples; S – number of salmonella positive samples

Rezultati naših istraživanja (tabela 1) jasno ukazuju na to da je stočni depo za svinje redovno kontaminiran salmonelama. Swanenburg i sar. (2001a) navode da su na dve holandske klanice iz skoro svakog uzorka u stočnom depou svinja izolovali salmonele. U okviru naših istraživanja salmonela je utvrđena na sledećim površinama: pod istovarne rampe (22,22 %), koridor istovarna rampa-stočni depo (33,33 %), pod boksa u stočnom depou (22,22 %), koridor stočni depo – boks za omamljivanje (22,22 %). Ispitivanjem uzoraka sa zidova bokseva, voda iz napajalice u stočnom depou, kanala za fekalije i prolaza od stočnog depoa do koridora (za boks za omamljivanje) salmonela nije izolovana.

Prema istraživanju Lazaro-a i sar. (1997), iz Brazila, čak 20 % pregledanih uzoraka sa površina u stočnom depou bilo je pozitivno na salmonele, što je u poređenju sa našim ispitivanjima procentualno viši nalaz jer je zbirni prikaz procentualne zastupljenosti salmonela, na površinama u stočnom depou na uzorkovanim klanicama (A i B) bio 12,50 %.

Tabela 2. Mesto nalaza salmonela u stočnom depou i boksu za omamljivanje /
Table 2. Site of *Salmonella* findings in holding pens and stunning box

Klanica / <i>Slaughterhouse</i>	A				B		A + B		
Uzorkovanje / <i>Sampling</i>	I		II		III		I+II+III		
Površina / <i>Surface</i>	n	S	n	S	n	S	n	S	%
STOČNI DEPO / <i>HOLDING PENS</i>									
Pod istovarne rampe / <i>Floor of ramp at unloading area</i>	3	2	3	-	3	-	9	2	22,22
Koridor istovarna rampa-stočni depo / <i>Race between unloading area and holding pens</i>	3	2	3	-	3	1	9	3	33,33
Zidovi boksa u stočnom depou / <i>Walls of holding pens</i>	3	-	3	-	3	-	9	-	-
Pod boksa u stočnom depou / <i>Floor of holding pens</i>	3	-	3	-	3	2	9	2	22,22
Voda iz napajalice u stočnom depou / <i>Water troughs in pens</i>	3	-	3	-	3	-	9	-	-
Kanal za tečnost/fekalije / <i>Drainage for fluids/feces</i>	3	-	3	-	3	-	9	-	-
Prolaz od stočnog depoa do koridora / <i>Race between holding pen and main race</i>	3	-	3	-	3	-	9	-	-
Koridor stočni depo - boks za omamljivanje / <i>Race between holding pen and stunning box</i>	3	-	3	2	3	-	9	2	22,22
BOKS ZA OMAMLJIVANJE / <i>STUNNING BOX</i>									
Ulaz/vrata boksa za omamljivanje / <i>Gates between race and stunning box</i>	3	-	3	3	3	-	9	3	33,33
Pod boksa za omamljivanje / <i>Stunning box floor</i>	3	3	3	3	3	2	9	8	88,88
Ukupno / <i>Total</i>	30	7	30	8	30	5	90	20	22,22

Napomena: n – broj pregledanih uzoraka; S – broj pozitivnih uzoraka na salmonela /

Note: n – number of examined samples; S – number of salmonella positive samples

U stočnom depou klanice A u oba navrata (uzorkovanje I i II) utvrđen je serotip *S. Typhimurium*, dok je u klanici B (uzorkovanje III) zabeležen serotip *S. Mbandaka*. Iako se u klanici A i B redovno pere i povremeno dezinfikuje radni prostor zbog same konstrukcije stočnog depoa i bokseva u kojem borave životinje verovatno da se salmonela može zadržati u pukotinama betonskog poda (neravna površina) u koje dezinfekciona sredstva slabo prodiru. Neravne/hrapave betonske površine u stočnom depou, neophodne sa aspekta dobrobiti životinja, otežavaju čišćenje, pranje i dezinfekciju (Karabasil i sar., 2011; Small i sar., 2003). Sa druge strane, ravne površine poda, koje nisu opravdane sa aspekta dobrobiti životinja (klizavost poda), sa higijenskog aspekta bile bi znatno prihvatljivije. Swanenburg i sar. (2001a) u svojim istraživanjima su došli do zaključka da u svakoj klanici, stočni depo ima rezidualnu mikrofloru koja se obnavlja ulaskom novih ži-

votinja. Moguće i da su neki serotipovi rezistentniji na primenjeno sredstvo za dezinfekciju u poređenju sa drugim sojevima salmonela. Oni navode *S. Typhimurium* kao jedan od primera rezistentnijeg soja, koji se može izolovati nakon primenjenog postupka dezinfekcije.

Veliki broj autora, slaže se sa konstatacijom da dužina boravka svinja u stočnom depou predstavlja rizik od infekcije salmonelama, što je naročito aktualizovano ako svinje potiču sa farmi slobodnih od salmonela (Hurd i sar., 2001; Hurd i sar., 2002; Berends i sar., 1996).

Nalaz salmonela u boksu za omamljivanje

Drugi deo naših istraživanja odnosi se na prisustvo salmonela na površinama u boksu za omamljivanje svinja na klanici A i B (tabela 1). Uzorci iz boksa za omamljivanje uzeti su sa dve površine – (a) ulaz/vrata i (b) pod, a salmonela su utvrđene sukcesivno kod 33,33 % odnosno 88,88 % pregledanih uzoraka (tabela 2).

Od ukupnog broja pregledanih uzoraka sa površina u boksu za omamljivanje u 61,11 % je utvrđeno prisustvo salmonele (tabela 1). Ako pogledamo nalaz po klanicama, procenat pozitivnih uzoraka na salmonele, u klanici A je 75 % (uzorkovanje I 50 % i uzorkovanje II 100 %), dok je u klanici B, 33,33 % (uzorkovanje III). Veći nalaz salmonela na površinama boksa za omamljivanje u klanici A može se objasniti i samom organizacijom rada. Svinje se putem restrejnera (jedna po jedna) dovode do mesta omamljivanja i, nakon ove operacije, sa poda boksa podižu na visoki kolosek. Samim tim, svaka omamljena svinja dolazi u kontakt sa ograničenom površinom poda boksa za omamljivanje. U klanici B, svinje su u jednom prostoru u kome se vrši omamljivanje, gde može da stane i do 15 životinja.

Uzorci u boksu za omamljivanje uzeti su sa površina ulaza i poda. Uzorci sa ulaza uzeti su u klanici A sa bočnih površina restrejnera, koje su u kontaktu sa telom životinje, a u klanici B sa vrata prostorije u kojoj su smeštene svinje za omamljivanje. U klanici A, 50 % pregledanih uzoraka sa ulaza boksa za omamljivanje je sadržavalo salmonele, dok u klanici B nijedan. Opet treba naglasiti da su u klanici A uzorci uzeti sa površine restrejnera sa kojim je telo svinje u kontaktu, dok u klanici B to nije slučaj. Pod boksa za omamljivanje, prema našim ispitivanjima, s obzirom na podatke klanici A i klanici B gotovo je redovno kontaminiran salmonelama (tabela 2). S obzirom na to da omamljene životinje padaju na pod boksa za omamljivanje, na osnovu naših rezultata, možemo pretpostaviti da se salmonelom sa ove površine može kontaminirati trup svinje, naročito regija grudi i buta (Karabasil i sar., 2010).

U boksu za omamljivanje klanice A u oba navrata (uzorkovanje I i II) utvrđen je serotip *S. Typhimurium*, dok je u klanici B (uzorkovanje III) zabeležen serotip *S. Mbandaka*.

Zaključak / Conclusion

Iako se kontaminacija/infekcija svinja salmonelama može destiti na bilo kojoj tački od farme do klanice, treba naglasiti da klanica ima značajnu ulogu u ovom procesu. Površine u stočnom depou i boksu za omamljivanje redovno su kontaminirane salmonelom i mogu predstavljati izvore unakrsne kontaminacije životinja pa i trupova na liniji klanja svinja.

Literatura / References

1. Berends BR, Urlings HAP, Snijders JMA. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *Int J Food Microbiol* 1996; 30: 37-53.
2. De Busser VE, Maes D, Houf K, Dewulf J, Imberechts H, Bertrand S, De Zutter L. Detection and characterization of *Salmonella* in lairage, on pig carcasses and intestines in five slaughterhouses. *Int J Food Microbiol* 2011; 145: 279-86.
3. De Sadeleer L, Dewulf J, De Zutter L, Van der Stede Y, Ribbens S, De Busser E, Quoilin S, Houf K, Delhalle L, Grijspeerdt K, Maes D. A qualitative risk assessment for human salmonellosis due to the consumption of fresh pork in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 2008; 78: 34-41.
4. EFSA. European Food Safety Authority. Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from the European Commission on a quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in meat: source attribution for human salmonellosis from meat. *The EFSA Journal* 2008b; 625: 1-32.
5. Hurd HS, McKean JD, Wesley IV, Karriker LA. The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *J Food Protection* 2001; 64, 1155-8.
6. Hurd HS, McKean JD, Griffith RW, Wesley IV, Rostagno MH. *Salmonella enterica* Infections in Market Swine with and without Transport and Holding. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68, 2376-81.
7. Hurd HS, Gailey JK, McKean JD, Rostagno MH. Experimental rapid infection in market swine following exposure to a *Salmonella* contaminated environment, Berl Muench. *Tieraerztl Wochenschr* 2001a; 114: 382-4.
8. Hurd HS, Gailey JK, McKean JD, Rostagno MH. Rapid infection in market – weight swine following exposure to a *Salmonella* Typhimurium contaminated environment. *Am J Vet Res* 2001b; 62: 1194-7.
9. Karabasil N. Putevi kontaminacije trupova svinja u klanici i njihovo ponašanje u mesu. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 2006: 80-8.
10. Karabasil N, Kilibarda N, Baltić MŽ, Dimitrijević M, Teodorović V. Nalaz salmonela u stočnom depou klanica za svinje. Zbornik kratkih sadržaja. Međunarodno 54. savetovanje industrije mesa, Vrnjačka Banja, 18-20. juni, 2007: 49.
11. Karabasil N, Dimitrijević M, Kilibarda N, Teodorović V., Baltić ŽM. Značaj salmonela u proizvodnji mesa svinja. *Veterinarski glasnik* 2008; 62(5-6): 259-75.
12. Karabasil N, Baltić MŽ, Dimitrijević M, Teodorović V, Pavličević N. Nalaz salmonela na trupovima svinja neposredno posle omamljivanja. Zbornik referata i kratkih sadržaja 21. savetovanja veterinara Srbije (sa međunarodnim učešćem). Zlatibor, 15-18. septembar, 2010: 270-1.

13. Karabasil N, Dimitrijević M, Milićević D. Welfare of slaughter animals and impact on meat quality. International 56th meat industry conference, Tara 12–15 june 2011. Meat Technology 2011; 52(1): 182-7.
14. Korsak N, Jacob B, Groven B, Etienne G, China B, Ghafir Y, Daube G. *Salmonella* Contamination of Pigs and Pork in an Integrated Pig Production Systems. J Food Protection 2003; 66(7): 1126-33.
15. Kraken S, Alban L, Boes J, Dahl J. Longitudinal Study of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Infection in Three Danish Farrow-to-Finish Swine Herds. J Clin Microbiology 2003; 41(6): 2282-8.
16. Lazaro NS, Tibana A, Hofer E. *Salmonella* spp. in healthy ewine and in abattoir environments in Brazil. J Food Prot 1997; 60: 1029-2664.
17. Mannion Celine, Fanning J, McLernon J, Lendrum L, Montserrat Gutierrez, Duggan S, Egan J. The role of transport, lairage and slaughter processes in the dissemination of *Salmonella* spp. in pigs in Ireland. Food Research International, Article in Press, 2011.
18. Morgan IR, Krautil FL, Kraven JA. Effect of time in lairage on caecal and carcass salmonella contamination of slaughter pigs, Epidemiol Infect 1987; 98: 323-30.
19. NRSS, National Reference Centre for *Salmonella* and *Shigella*. Annual report on Salmonella and Shigella in Belgium in 2008, Institute of Public Health. Online: <http://www.iph.fgov.be/bacterio/iframes/rapports/2008>.
20. Popoff MY. Antigenic Formulas of the Salmonella Serovas. 8th Edition, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, 2001.
21. Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD, Ziemer CJ, Gailey JK, Leite RC. Preslaughter Holding Environment in Pork Plants Is Highly Contaminated with *Salmonella enterica*. Appl Environm Microb 2003; 4489-94.
22. Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD. Salmonella enterica prevalence and serotype distribution in swine at slaughter. Proceedings of the Seventh International Safe-pork Symposium on the Epidemiology and Control of Foodborne Pathogens in Pork. Verona, Italy, May 9–11 2007; 153-5.
23. Rostagno MH, Eicher SD, Lay Jr, DC. Does pre-slaughter stress affect pork safety risk? Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada, July 18–21 2010: 176.
24. Small A, Reid C-A, Avery SM, Karabasil N, Crowley C, Buncic S. Potential for the spread of Escherichia coli O 157, Salmonella, Campylobacter in the Lairage Environment at Abattoirs. J Food Protect 2002; 65(6): 931-6.
25. Small A, Reid CA, Buncic S. Conditions in Lairages at Abattoirs for Ruminants in south-west England and *In Vitro* Survival of *Escherichia coli* O157, *Salmonella Kedougou*, and *Campylobacter jejuni* on Lairage Related Substrates. J Food Protection 2003; 66(9): 1570-5.
26. Swanenburg M, Urlings HAP, Keuzenkamp DA, Snijders JMA. *Salmonella* in the Lairage of Pig Slaughterhouses. J Food Protect 2001; 64(1): 12-6.

ENGLISH

FINDINGS OF SALMONELLA ON SURFACES IN PIG LAIRAGE AND STUNNING BOX

N. Karabasil, Mirjana Dimitrijević, Nataša Pavličević, V. Teodorović, Jasna Lončina, Jelena Nedeljković Trailović, M. Ž. Baltić

Salmonella is one of the most important zoonotic pathogens and the consumption of pork meat is a major source of human infection. The aim of this study was to investigate the presence of Salmonella on different surfaces in the pig lairage and stunning box as potential sources of cross contamination of animals and carcasses. Sampling was conducted in two abattoirs (*slaughterhouse A* and *slaughterhouse B*). Samples were taken from *slaughterhouse A* in two instances (sampling I and II, a total of 60 samples) and in *slaughterhouse B* once (sampling III, a total of 30 samples), from each of the following sites: floor of ramp at unloading area, race between unloading area and holding pens area, walls of holding pens, floor of holding pens, water troughs in pens, drainage for fluids/feces, race between holding pen and main race, race before stunning box, gates between race and stunning box, stunning box floor. Of the total number of examined samples, the percentage of positive samples for Salmonella in the lairage was 12.50% (72 / 9), and samples from the surface of the stunning box was 61.11%. (18 / 11). Surfaces in a lairage and stunning box are regularly contaminated with salmonella, and can pose potential sources of cross contamination of animals and carcasses.

Key words: salmonella, pigs, surfaces, contamination

РУССКИЙ

РЕЗУЛЬТАТЫ САЛЬМОНЕЛЛ НА ПОВЕРХНОСТЯХ В СКОТОВОДЧЕСКОМ ДЕПО И БОКСЕ ДЛЯ ПРИМАНИВАНИЯ СВИНЕЙ

Н. Карабасил, Миряна Димитриевич, Наташа Павличевич, В. Теодорович, Ясна Лончина, Елена Неделькович Траилович, М. Ж. Балтич

Сальмонеллы относятся к между более важными патогенными, а мясо свиней один из главных источников инфекции потребителей. Цель этой работы испытать присутствие сальмонелл на различных поверхностях в скотоводческом депо и боксе для приманивания свиней и туловищей убитых животных на линии убоя. Образчирования проведены в две скотобойни (скотобойня А и скотобойня Б). Образчики из скотобойни А взяты в два раза захода (образчирование I и II, совокупно 60 образчиков), а в скотобойне Б однажды (образчирование III, совокупно 30 образчиков), со следующих поверхности: пол выгруженного шлагбаума; коридор выгруженный шлагбаум-скотоводческий депо; стены бокса в скотоводческом депо; пол бокса в скотоводческом депо; вода из поилки в скотобводческом депо; канал для жидкости (фекалии; приход от скотоводческого депо докоридора; коридор от скотоводческого депо до бокса для приманивания, вход) дверь бокса для приманивания; пол бокса для приманивания. От совокупного числа осмотренных образчиков, процент положительных образчиков на сальмонеллу, в скотоводческом депо был 12,50% (72/9), а из образчиков с поверхностей бокса для приманивания 61,11%

(18/11). Поверхности в скотоводческом депо и боксе для приманивания регулярно контаминированы сальмонеллой и могут представлять собой источники перекрёстной контаминации животных да и туловищей на линии убоя свиней.

Ключевые слова: сальмонелла, свиньи, поверхности, контаминция

**ISPITIVANJE PRISUSTVA REZIDUA VETERINARSKIH
LEKOVA I KONTAMINENATA OKOLINE TOKOM
PROIZVODNOG CIKLUSA PETROVAČKE KOBASICE, KAO
DEO OBAVEZNIH PARAMETARA BEZBEDNOSTI HRANE***
*INVESTIGATIONS OF RESIDUE OF VETERINARY MEDICINES AND
ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS DURING PRODUCTION CYCLE
OF PETROVSKA KLOBASA AS PART OF COMPULSORY PARAMETERS
FOR FOOD SAFETY*

**Vesna Janković, Ljiljana Petrović, Slavica Vesković, Dragica Karan,
Tanja Radičević, S. Janković, S. Stefanović****

Značajan činilac zaštite zdravlja potrošača je sistematsko i stalno sprovođenje kontrole prisustva ostataka biološki aktivnih supstanci i njihovih metabolita u sirovinama i primarnim proizvodima životinjskog porekla.

Kada je u pitanju meso, bitan aspekt bezbednosti svakako je kontrola rezidua veterinarskih lekova i kontaminenata okoline.

U tom smislu, cilj Nacionalnog projekta pod nazivom „Razvoj tehnologije sušenja i fermentacije petrovačke kobasice (Petrovská klobása – oznaka geografskog porekla) u kontrolisanim uslovima“, evidencioni broj TR – 20037, bio je da se proizvod, petrovačka kobasica zaštiti oznakom geografskog porekla. Deo obaveznih ispitivanja obuhvatao je i utvrđivanje prisustva rezidua veterinarskih lekova i kontaminenata okoline u sirovinama i finalnom proizvodu, što ujedno predstavlja i cilj ovog rada.

Ključne reči: zaštita potrošača, rezidue veterinarskih lekova, kontaminenti okoline, petrovačka kobasica

* Rad primljen za štampu 25. 10. 2011. godine

** Vesna Janković, specijalista mikrobiologije, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd; dr sc. Ljiljana Petrović, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad; dr sc. Slavica Vesković, mr sc. Dragica Karan, mr sc. Tanja Radičević, Srđan Stefanović, DVM, Saša Janković, dipl. farmaceut, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Uvod / Introduction

Značajan činilac zaštite zdravlja potrošača je sistematsko i stalno sprovođenje kontrole prisustva ostataka biološki aktivnih supstanci i njihovih metabolita u sirovinama i primarnim proizvodima životinjskog porekla.

Kada je u pitanju meso, bitan aspekt bezbednosti svakako je kontrola rezidua veterinarskih lekova koji se koriste u terapijske, profilaktičke, a ne retko i u anaboličke svrhe (Dixon, 2001). Poznato je da se savremeni uzgoj životinja ne može zamisliti bez upotrebe različitih hemioterapeutika, a njihova ilegalna i/ili neadekvatna primena, kao i nepoštovanje propisanih doza i kareneci može imati za posledicu kontaminaciju namirnica animalnog porekla ostacima tih jedinjenja. Takođe, u lanac ishrane mogu dospeti i kontaminanti okoline, posebno u industrijski razvijenim oblastima.

U poslednjoj deceniji, čine se veliki naponi, kako u razvoju tehnoloških postupaka u proizvodnji i preradi hrane, tako i u uvođenju metoda za kontrolu hrane, kojima bi se dostigli prihvatljivi standardi bezbednosti. Kontrola rezidua veterinarskih lekova, kao i drugih kontaminenata, kako u Evropskoj uniji, tako i u Republici Srbiji predstavlja značajan korak ka smanjenju štetnih efekata po zdravlje potrošača (Council Directive 96/23/EC, Commission Decision 98/179/EC, Council Regulation 2377/90/EEC, Zakon o bezbednosti hrane i sl.). Celokupna strategija ima za cilj da uspostavi poljuljano poverenje potrošača ne samo u bezbednost lanca ishrane, već u širem smislu i u nauku o ishrani, zakonodavstvo i kontrolu hrane.

S druge strane, tradicionalna proizvodnja zaokuplja sve više interesovanja kako proizvođača, tako i potrošača. Proizvodnja i konzumiranje hrane, koja tokom procesa proizvodnje nije bila tretirana i ne sadrži veštačke dodatke, predstavlja za domaćeg i inostranog potrošača osnovni cilj. Specifične kulturne i društvene osobine, kao i prirodni, a pre svega klimatski uslovi različitih geografskih regiona u velikoj meri određuju fizičke i senzorne karakteristike svakog suvog fermentisanog proizvoda od mesa izrađenog na tradicionalan način. Tradicionalni postupci proizvodnje su veoma dugotrajni, proizvodne serije su male, obrt kapitala je veoma spor te su i ovi proizvodi svojom cenom nekonkurentni industrijski proizvedenim (Arnau i sar., 2007). Međutim, kako pokazuje studija Evropske Komisije iz 2003. godine, evropski potrošači su spremni da plate i do 20% veću cenu za tradicionalne proizvode sa geografskim poreklom (Thual, 2005). Zahvaljujući toj činjenici, u mnogim evropskim zemljama se proizvodi veliki broj vrsta fermentisanih kobasica, čija osobenost potiče od različitih sirovina, receptura i proizvodnih procesa koji su posledica navika i običaja, a mnoge od njih nose oznake geografskog porekla PDO (Protected Designation of Origin) ili PGI (Protected Geographical Indication) (Roseiro i sar., 2008). U Republici Srbiji, takođe, postoji niz fermentisanih kobasica, ali se samo mali broj njih odlikuje posebnim svojstvima i kvalitetom koji proističe iz specifičnih prirodnih i ljudskih faktora, karakterističnih za region u kojem se proizvode (Vesković-Moračanin i sar., 2009). Jedna

od njih je petrovačka kobasica, fermentisani proizvod od mesa koji je deo gastronomskog nasleđa vojvođanskih slovaka iz XVIII veka, koji se danas na tradicionalan način proizvodi u seoskim domaćinstvima u Opštini Bački Petrovac (Petrović i sar., 2011).

U tom smislu, cilj Nacionalnog projekta pod nazivom „Razvoj tehnologije sušenja i fermentacije petrovačke kobasice u kontrolisanim uslovima“, finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj R. Srbije, bio je da se proizvod, petrovačka kobasica zaštiti oznakom geografskog porekla. Deo obaveznih ispitivanja bilo je i utvrđivanje prisustva rezidua veterinarskih lekova i kontaminenata okoline u sirovinama i finalnom proizvodu, što ujedno predstavlja i cilj ovog rada.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Uzorci / Samples

U domaćinstvima zadrugara zadruge „Kulen“ za namensku proizvodnju petrovačke kobasice uzgajaju se svinje belih mesnatih rasa i melezi završne telesne mase od 150-180 kg, starosti od 9 meseci. Svinja proizvođača A, korišćena u I istraživačkoj godini za izradu kobasica grupe A bila je, melez bele mesnate svinje sa Pietrenom, mase 150 kg i starosti 7 meseci, a proizvođača B (B1 i B2) mase 170 i 180 kg, bele komercijalne mesnate svinje starosti 9 meseci. Za izradu nadeva kobasica upotrebljeno je mišićno tkivo od buta, plećke, karea i vrata, kao i čvrsto masno tkivo. II istraživačke godine (ogled C) za proizvodnju kobasica korišćena je krmača rase Landras, mase 153 kg i starosti 9 meseci, koja nije bila suprasna. Ispitani tehnološki kvalitet *M. semimembranosus* ukazuje da je na osnovu parametara i navedenih kriterijuma meso „normalnog“ kvaliteta i adekvatno za izradu petrovačke kobasice. Petrovačka kobasica se proizvodi mešanjem, delimično ohlađenog (cca 4h p.m.) ili hladnog (cca 24h p.m.), srednje usitnjenog svinjskog mišićnog i masnog tkiva (do 10 mm) uz dodatak crvene ljute mlevene začinske paprike (do 2,5 %), soli (do 2 %), pasiranog belog luka (do 0,2 %), kima (do 0,2 %) i šećera (do 0,15 %).

U skladu sa nacionalnim Programom sistematskog praćenja rezidua farmakoloških, hormonskih i drugih štetnih materija kod životinja, proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje, ispitivanja su obuhvatila sledeće matrikse: mišićno tkivo, tkivo bubrega i jetra i nadev. Na kraju proizvodnog ciklusa (210 i 270 dan) izvršeno je ispitivanje parametara bezbednosti gotovog proizvoda, spremnog za konzumiranje (neupakovana serija, vakuum, MAP i hitozan). Nužno je reći da je proces klanja svinja obuhvatao radnje i postupke koje su u osnovi imali manuelni pristup. Ispitivanja su obavljena u tri ogleda: A, B i C.

Laboratorijske analize za utvrđivanje prisustva rezidua veterinarskih lekova i kontaminenata okoline / *Laboratory analyses for establishing presence of residue of veterinary medicines and environmental contaminants*

1. Benzimidazoli (albendazol, mebendazol, oksibendazol i fenbendazol), određivani su metodom tečne hromatografije sa UV detekcijom na talasnoj dužini: $\lambda = 298 \text{ nm}$ (HPLC/UV) sa limitom detekcije od 0,005 mg/kg. Korišćen je HPLC Waters Separation module 2695, Dual λ absorbance detector Waters 2487.

2. Hinoloni tj. fluorohinoloni (norfloksacin, enrofloksacin, oksolinska kiselina i flumekvin), određivani su metodom tečne hromatografije sa fluorescentnom detekcijom HPLC/FL sa limitom detekcije od 0,020 mg/kg. Korišćen je HPLC Waters Separation module 2695, a razdvajanje hinolona je izvršeno na reverzno faznoj koloni C18, a određeni su na fluorescentnom detektoru sa ekscitacionim talasnim dužinama: Multil λ fluorescence detector Waters 2475 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ i 312 nm , $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$ i 366 nm .

3. Makrociklični laktoni (ivermektin, abamektin i moksidektin) određivani su metodom tečne hromatografije sa fluorescentnom detekcijom HPLC/FL sa limitom detekcije od 0,001 mg/kg.

Korišćen je HPLC Waters Separation module 2695, a detekcija makrocikličnih laktona izvršena je na fluorescentnom detektoru sa ekscitacionom talasnom dužinom (Multil λ fluorescence detector Waters 2475): $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ i emisio-
nom talasnom dužinom: $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$.

4. Nitrofurani (furazolidon, furaltadon, nitrofurazon i nitrofurantoin) određivani su metodom tečne hromatografije sa masenom detekcijom LC/MS/MS, sa limitom detekcije od 0,001 mg/kg. U ciljnom tkivu životinja, odnosno u tkivu bubrega, određeni su njihovi metaboliti: AOZ (3-amino-2-oxazolidinon), AMOZ (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinon), AHD (1-aminohydantoin) i SEM (Semicarbazide). Razdvajanje metabolita nitrofurana je izvršeno na reverzno faznoj koloni C18 HPLC uređaja WATERS 2695, a određivanje na tripl kvadropolnom masenom detektoru Quatromicro, sa kapilarnim naponom 3.2 kV i naponom na konusu od 45 V.

5. Nitroimidazoli (metronidazol, dimetridazol, ronidazol i ipronidazol) određivani su metodom tečne hromatografije sa UV detekcijom na talasnoj dužini: $\lambda = 320 \text{ nm}$ HPLC/UV sa limitom detekcije od 0,005 mg/kg. Pripremljeni uzorci su ekstarhováni i injektováni u HPLC Waters Separation module 2695, Dual λ absorbance detector Waters 2487.

6. Sulfonamidi su određivani metodom tečne hromatografije sa masenom detekcijom LC/MS/MS, sa limitom detekcije od 0,020 mg/kg. Razdvajanje sulfonamida je izvršeno na reverzno faznoj koloni C18 HPLC uređaja WATERS 2695, a određeni su na tripl kvadropolnom masenom detektoru Quatromicro sa kapilarnim naponom 3.2 kV i naponom na konusu od 28 V. Takođe, prisustvo

ukupnih sulfonamida određeno je ELISA testom, po proizvođačkoj specifikaciji kita Tecna, Italy.

7. Hloramfenikol, tiamfenikol i florfenikol, određivani su metodom tečne hromatografije sa masenom detekcijom LC/MS/MS, sa limitom detekcije od 0,0003 mg/kg za hloramfenikol, odnosno 0,001 mg/kg za tiamfenikol i florefenikol. Nakon pripreme uzorka, ekstrakt je injektovan u HPLC Waters Separation module 2695. Određivanje je izvršeno na tripl masenom detektoru MS/MS Quattro micro micromass sa kapilarnim naponom 3,35 kV i naponom na konusu od 35 V.

8. Karbadoks je određen gasnom hromatografijom sa masenom detekcijom sa limitom detekcije 0.010 mg/kg na uređaju VARIAN GC 3800 AS8400 maseni detector SATURN 2000.

9. Penicilini, Makrolidi i Aminoglikozidi određivani su metodom pet ploča korišćenjem osetljivih bakterijskih sojeva.

10. Tetraciklini su određivani metodom tečne hromatografije sa masenom detekcijom LC/MS/MS, sa limitom detekcije od 0,010 mg/kg. Tetraciklini iz homogenizovanih uzoraka su određeni pomoću HPLC Waters Separation module 2695, na tripl kvadropolnom masenom detektoru Quatromicro, sa kapilarnim naponom 3 kV i naponom na konusu od 37 V.

11. Organohlorni pesticidi (aldrin i dieldrin, DDT i derivati, hlordan, endrin, HCB, HCH – á i â izomeri, heptahlor i heptahlor-epoksid, lindan) i **polihlorovani bifenili**. Masno tkivo je najpre otopljeno, zatim ekstrahovano i eluirano. Dobijeni eluat je pažljivo uparen do radne zapremine, nakon čega je odgovarajući alikvot ubrizgan u gasni hromatograf VARIAN 3800, sa detektorom elektronskog zahvata radi detekcije i kvantifikacije.

12. Mikotoksini. Prisustvo mikotoksina (Ohratoksina A) utvrđeno je korišćenjem ELISA metode, po proizvođačkoj specifikaciji kita Tecna, Italy, dok je utvrđivanje aflatoksina B1 + G1 utvrđeno tankoslojnom hromatografijom.

13. Hemijski elementi (olovo, kadmijum, živa i arsen). Homogenizovani uzorci mesa (mišići SM), tkiva jetre i bubrega, kao i uzoraka kobasica su u skladu sa uputstvom za rukovanje aparatom za mikrotalasnu digestiju razoreni mikrotalasnom digestijom. Prisustvo olova i kadmijuma je određeno iz dobijenog rastvora atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom, grafitnom tehnikom, na aparatu VARIAN SpectrAA 220 sa grafitnom peći VARIAN GTA 110. Živa je određena tehnikom hladnih para. Prisustvo arsena je određeno hidridnom tehnikom na uređaju VARIAN VGA 77.

14. Kokcidiostatici (monenzin i salinomycin). Homogenizovani uzorak tkiva jetre (1,0 g) je najpre ekstrahovan, zatim uparen, a suvi ostatak je rastvoren u vodi. Za detekciju je korišćen HPLC uređaj WATERS 2695, sa reverzno faznom kolonom C18 i limitom detekcije od 0,010 mg/kg. Kokcidiostatici su određeni na tripl kvadropolnom masenom detektoru Quatromicro, sa kapilarnim naponom 3 kV i naponom na konusu od 30 V.

15. Neuroleptici (fenotiazini) (hlorpromazin, acepromazin i propionilpromazin) određivani su metodom tečne hromatografije sa UV detekcijom na

talasnoj dužini: $\lambda = 250$ nm (HPLC/UV) sa limitom detekcije od 0,020 mg/kg. Za detekciju sedativa, korišćen HPLC uređaj WATERS 2695, Dual λ absorbance detector Waters 2487.

16. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (fluniksin i fenilbutazon) određivani su metodom tečne hromatografije sa UV detekcijom na talasnoj dužini: $\lambda = 280$ nm (HPLC/UV) sa limitom detekcije od 0,020 mg/kg. Za detekciju su korišćeni HPLC Waters Separation module 2695 i Dual λ absorbance detector Waters 2487.

17. Karbamati (karbaril i propoksuri) su određivani metodom tečne hromatografije sa fluorescentnom detekcijom nakon postkolonske derivatizacije sa ortoftaldialdehidom i 2-merkaptoetanolom, $\lambda_{ex} = 339$ nm i 445 nm na uređajima HPLC Waters Separation module 2695, Multil λ fluorescence detector Waters 2475, Waters postcolumn reactor and reagent manager.

18. Piretroidi (permetrin, fluvalinat, deltametrin i cipermetrin). Piretroidi su iz uzorka ekstrahovani, razdvojeni od masti i eluirani. Eluat je zatim koncentrovan, a kvantitativno određivanje je obavljeno primenom gasne hromatografije, sa detektorom elektronskog zahvata GC/ECD na gasnom hromatografu VARIAN 3800.

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Bezbednost je osnovni prioritet u proizvodnji hrane u celom svetu. Bezbedna hrana je slobodna od rezidua, kontaminenata i patogenih mikroorganizama. Sagledavanje problema vezanih za namirnice otvara pitanje uticaja primarne proizvodnje na bezbednost hrane.

Toksični elementi mogu se naći u tkivima i organima životinja, naročito u jetri i bubrezima koji predstavljaju barijeru za njihov prelazak u meso, i ujedno su ciljna tkiva u kome se toksični elementi akumuliraju (Alonso i sar., 2000, 2002). S druge strane, bubreg i jetra su, takođe, izvor esencijalnih mikroelemenata kao što su gvožđe, bakar, cink i selen, što ih čini pogodnim za ishranu ljudi (Arnold i sar., 2006). Akumulacija toksičnih elemenata u bubrezima i jetri životinja često je posredovana apsorpcijom i metaboličkim ciklusom nekih mikroelemenata (Frank i sar., 2000; Dorton i sar., 2003; Custer i sar., 2004; Coudray i sar., 2006), o čemu svedoče i ispitivanja uticaja esencijalnih mikroelemenata, cinka, bakra i selen na akumulaciju kadmijuma, olova i arsena u uzorcima jetre i bubrega goveda (Nriagu i sar., 2009).

Rezultati ispitivanja (tabela 1) pokazuju da nije utvrđeno prisustvo kadmijuma ni u jednom od četiri uzorka bubrega. Sadržaj olova u količini od 0,07 mg/kg utvrđen je kod jednog uzorka bubrega (A), dok je kod ostala tri ispitivana uzoraka (B1, B2 i C) sadržaj bio ispod limita detekcije metode. Prisustvo arsena nije utvrđeno ni u jednom, dok je živa utvrđena kod dva uzorka bubrega (A, i C) u količinama od 0,009 i 0,027 mg/kg, respektativno. Utvrđene vrednosti su ispod

dozvoljenih vrednosti propisanih nacionalnim propisima – Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih supstancija koje mogu da se nađu u namirnicama (Sl. list SRJ, 5/92, 11/92, 32/02).

Tabela 1. Sadržaj toksičnih elemenata u bubrezima svinja A, B1, B2 i C (mg/kg) /
Table 1. Content of toxic elements in kidneys of pigs A, B1, B2 and C (mg/kg)

Bubreg / <i>Kidney</i>	Kadmijum, Cd / <i>Cadmium, Cd</i>	Olovo, Pb / <i>Lead, Pb</i>	Arsen, As / <i>Arsenic, As</i>	Živa, Hg / <i>Mercury, Hg</i>
Uzorak / <i>Sample A</i>	0,005	0,07	0,01	0,027
Uzorak / <i>Sample B1</i>	0,005	0,05	0,01	0,005
Uzorak / <i>Sample B2</i>	0,005	0,05	0,01	0,005
Uzorak / <i>Sample C</i>	0,005	0,05	0,01	0,009
MDK*	max. 0,100	max. 1,00	max. 0,30	max. 0,050

*MDK – maksimalna dozvoljena količina /

*MDK – *maximum permitted quantity*

U tabeli 2 prikazani su rezultati ispitivanja sadržaja toksičnih elemenata u jetri zaklanih svinja čije je meso bilo korišćeno za proizvodnju tradicionalne petrovačke kobasice. Rezultati ispitivanja su pokazali da sadržaj toksičnih metala nije prelazio zakonski propisanu vrednost. Prisustvo kadmijuma i arsena nije utvrđeno tokom ispitivanja ni u jednom uzorku jetre. Olovo je nađeno u uzorku A, ali u količini od 0,09 mg/kg, što ne predstavlja zdravstveni rizik. Isti slučaj je i sa živom koja je utvrđena u dva uzorka jetre (A i B1) u količinama od 0,011 i 0,026 mg/kg, respektativno.

Tabela 2. Sadržaj toksičnih elemenata u jetri svinja A, B1, B2 i C (mg/kg) /

Jetra / <i>Liver</i>	Kadmijum, Cd / <i>Cadmium, Cd</i>	Olovo, Pb / <i>Lead, Pb</i>	Arsen, As / <i>Arsenic, As</i>	Živa, Hg / <i>Mercury, Hg</i>
Uzorak A / <i>Sample A</i>	0,005	0,09	0,01	0,026
Uzorak B1 / <i>Sample B1</i>	0,005	0,05	0,01	0,011
Uzorak B2 / <i>Sample B2</i>	0,005	0,05	0,01	0,005
Uzorak C / <i>Sample C</i>	0,005	0,05	0,01	0,005
MDK*	max. 0,100	max. 1,00	max. 0,30	max. 0,050

*MDK – maksimalna dozvoljena količina /

*MDK – *maximum permitted quantity*

U uzorcima pripremljenog nadeva petrovačke kobasice nije utvrđeno prisustvo Cd i As, dok su Pb i Hg utvrđeni u jednom uzorku nadeva (A19), i to u količini od 0,07 mg/kg i 0,06 mg/kg, respektativno (tabela 3). Utvrđene vrednosti nisu veće od maksimalnih dozvoljenih količina (MDK) koje su propisane nacionalnom legislativom.

Tabela 3. Sadržaj toksičnih elemenata u nadevu kobasica, pre punjenja u crevo (mg/kg) / Table 3. Content of toxic elements in sausage filling before it is stuffed into intestine (mg/kg)

Uzorci kobasica / Sausage samples	Kadmijum, Cd/ Cadmium, Cd	Olovo, Pb / Lead, Pb	Arsen, As / Arsenic, As	Živa, Hg / Mercury, Hg
A19	0,005	0,07	0,01	0,006
A29	0,005	0,05	0,01	0,05
B19	0,005	0,05	0,01	0,005
B29	0,005	0,05	0,01	0,005
B38	0,005	0,05	0,01	0,005
B48	0,005	0,05	0,01	0,005
C18	0,005	0,05	0,01	0,005
C28	0,005	0,05	0,01	0,005
C38	0,005	0,05	0,01	0,005
MDK*	max. 0,100	max. 1,00	max. 0.30	max. 0.050

*MDK – maksimalna dozvoljena količina /

*MDK – maximum permitted quantity

U fermentisanim proizvodima (n = 28) na kraju proizvodnog ciklusa, nakon 210 i 270. dana zrenja i fermentacije, nije dokazano prisustvo ispitivanih toksičnih elemenata, zapravo njihove potencijalne količine su se nalazile ispod limita detekcije primenjenih analitičkih metoda.

Korišćenje većine veterinarskih lekova je zabranjeno u EU zbog potencijalne opasnosti na zdravlje ljudi. Prisustvo rezidua u mesu, kao u proizvodima od mesa može dovesti do genetskih, imunotoksičnih, karcinogenih ili endokrinih efekata kod konzumenata (Van Peteghem i sar., 2004).

S obzirom da se, u današnje savremeno doba, vrši aktivna upotreba veterinarskih lekova, neophodno je u celom proizvodnom lancu hrane tj. „od njive do trpeze“ vršiti ispitivanje prisustva rezidua i kontaminenata okoline u cilju smanjenja zdravstvenog rizika na minimum (Croubles i sar., 2004).

Na osnovu podataka prikazanih u tabelama 4, 5, 6 i 7 uočava se da ni u jednom ispitivanom ciljnom matriksu nisu dokazane količine veterinarskih lekova i njihovih metabolita, kao i kontaminenata okoline veće od maksimalnih dozvoljenih (vrednosti svih ispitivanih rezidua nalazile su se ispod limita detekcije), shodno odredbama Pravilnika o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih supstancija koje mogu da se nađu u namirnicama (Sl. list SRJ, 5/92, 11/92, 32/02). Rezultati su u skladu sa rezultatima Lilić i sar. (2010) koji su obavili opsežna ispitivanja bubrega i jetre goveda i svinja, kao sirovina za ishranu ljudi. Veliki je broj kontaminenata okoline (dioksini, organohlorni pesticidi, polihlorovanibifenili, mikotoksini) koji se mogu javiti u mesu kao sirovini, kao i u gotovom proizvodu. Vrlo su teški za detekciju, iako su potencijalni toksigeni elementi koji se mogu akumulirati u proizvodima od mesa i izazvati neželjene zdravstvene efekte kod konzumenata (Hegum, 2004).

Tabela 4. Rezidue veterinarskih lekova i drugih štetnih metabolita (matriks: bubreg svinja) / Table 4. Residue of veterinary medicines and other harmful metabolites (matrix: pig kidney)

Vrsta Ispitivanja / Investigations for	Metoda ispitivanja / Examination method	Jedinica mere / Unit of measurement	Propisana vrednost / Prescribed value	Bubrezi svinja / Kidney of pig			
				A	B1	B2	C
Hloramfenikol / <i>Chloramfenicol</i>	LC/MS/MS	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Hlorpromazin / <i>Chlorpromazine</i>	HPLC/UV	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Nitrofurani / <i>Nitrofurans</i>	LC/MS/MS	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Nitroimidazoli / <i>Nitroimidazoles</i>	HPLC/UV	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Nesteroidni anti. lekovi / <i>Non-steroid anti.medicines</i>	HPLC/UV	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Neuroleptici / <i>Neuroleptics</i>	HPLC/UV	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Kvinoloni / <i>Quinolones</i>	HPLC/FL	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Antibiotici / <i>Antibiotics</i>	Metod "5 ploča" / "5-plate" method	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Ohratoksin A / <i>Ochratoxin A</i>	Elisa – test	µg/kg	max. 10,00	ND	ND	ND	ND
Aflatoksini (B1 + G1) / <i>Aflatoxins (B1+G1)</i>	Elisa – test	µg/kg	max. 0,50	ND	ND	ND	ND

ND – nije detektovano / ND – not detected

Tabela 5. Rezidue veterinarskih lekova i drugih štetnih metabolita (matriks: jetra svinja) / Table 5. Residue of veterinary medicines and other harmful metabolites (matrix: pig liver)

Vrsta Ispitivanja / Investigations for	Metoda ispitivanja / Examination method	Jedinica mere / Unit of measure- ment	Propisana vrednost / Prescribed value	Jetra svinja / Liver of pig			
				A	B1	B2	C
Karbamati / <i>Carbamates</i>	HPLC/FL	mg/kg	Karbaril max 0,05 Propoksir – max 0,05 / <i>Carbaryl max 0.05</i> <i>Propoxur – max 0.05</i>	ND	ND	ND	ND
Makrociklični laktone / <i>Macrocyclic lactones</i>	HPLC/FL	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Karbadoks / <i>Carbadox</i>	GC	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Kokcidostatici / <i>Coccidiostats</i>	HPLC	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Benzimidazoli / <i>Benzimidazoles</i>	HPLC/UV	µg/kg	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>	ND	ND	ND	ND
Sulfonamidi / <i>Sulphonamides</i>	LC/MS/MS	mg/kg	max. 0,10	ND	ND	ND	ND

ND – nije detektovano / ND – not detected

Tabela 6. Rezidue veterinarskih lekova i drugih štetnih metabolite (matriks: mišićno tkivo) / Table 6. Residue of veterinary medicines and other harmful metabolites (matrix: muscle tissue)

Vrsta ispitivanja / Investigations for	Metoda ispitivanja / Examination method	Jedinica mere / Unit of measurement	Propisana vrednost / Prescribed value	Jetra svinja / Liver of pig			
				A	B1	B2	C
Organohlorni pesticidi / Organochlorine pesticides	GC	mg/kg	Aldrin i dieldrin / Aldrin and dieldrin max. 0,200 DDT (DDE + DDD + DDT) max. 1,000 Endrin / Endrin max. 0,050 HCB max. 0,200 HCH (alfa izomer) / HCH (alpha isomer) max. 0,200 HCH (beta izomer) / HCH (beta isomer) max. 0,100 Heptahlor i heptahlore-poksid / Heptachlor and heptachlor epoxide max. 0,200 Hlordan (alfa i gama izomer) / Chlordane (alpha and gamma isomer) max. 0,050 Lindan / Lindane max. 0,020	ND	ND	ND	ND
Polihlorovani bifenili / Polychlorinated biphenyls	GC	mg/kg	max 2	ND	ND	ND	ND
Piretroidi / Piretroides	GC/ECD	mg/kg	Permetrin – nije definisana Cipermetrin – max 0,2 Fluvalinat – nije definisana Deltametrin – max 0,5	ND	ND	ND	ND

ND – nije detektovano / ND – not detected

Pomenuti matriksi ispitani su u skladu sa zahtevima Evropske unije, kako po vrsti ispitivanih supstanci, tako i po primenjenim analitičkim tehnikama. Ispitivanja i rezultati su u potpunosti u saglasnosti sa nacionalnim monitoring programom, koji je doveden do nivoa koji postoji u zemljama članicama EU. O tome svedoče i direktive EU, kojima je našoj zemlji dozvoljen izvoz svih vrsta mesa i primarnih proizvoda animalnog porekla koji su obuhvaćeni Programom monitoringa (Janković i sar., 2008).

Tabela 7. Rezidue veterinarskih lekova i drugih štetnih metabolita u uzorcima kobasica na kraju proizvodnog ciklusa /

Table 7. Residue of veterinary medicines and other harmful metabolites in samples of sausages at end of production cycle

Vrsta Ispitivanja / <i>Investigations for</i>	Metoda ispitivanja <i>Examination method</i>	Jedinica mere / <i>Unit of measure- ment</i>	Petrovačka kobasica n=28	Propisana vrednost / <i>Prescribed value</i>
Hloramfenikol / <i>Chloramfenicol</i>	LC/MS/MS	µg/kg	ND	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>
Antibiotici / <i>Antibiotics</i>	Metod "5 ploča" / <i>"5-plate method"</i>	µg/kg	ND	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>
Sulfonamidi / <i>Sulfonamides</i>	LC/MS/MS	µg/kg	ND	Nije dozvoljeno / <i>Not permitted</i>
Nitrofurani / <i>Nitrofurans</i>	LC/MS/MS	mg/kg	ND	max. 0,10
Organohlorni pesticidi / <i>Organochlorine pesticides</i>	GC	mg/kg	ND	max. 0,020 – 1,000
Piretroidi / <i>Piretroides</i>	GC/ECD	mg/kg	ND	Permetrin – nije definisana <i>Permethrin not defined</i> Cipermetrin – max 0,2 / <i>Cypermethrin max 0.2</i> Fluvalinat – nije definisana <i>Fluvalinate not defined</i> Deltametrin – max 0,5/ <i>Deltamethrin max 0.5</i>
Polihlorovani bifenili, PCB / <i>Polychlorinated biphenyls, PCB</i>	GC	mg/kg	ND	max. 2,000
Ohratoksin A / <i>Ochratoxin A</i>	Elisa - test	µg/kg	ND	max. 10,00
Aflatoksini / <i>Aflatoxines</i> (B1 + G1)	Elisa - test	µg/kg	ND	max. 0,50

ND – nije detektovano / *ND – not detected*

Industrija mesa suočava se sa problemima tretiranog mesa koje se koristi za proizvodnju fermentisanih proizvoda od mesa, a to su: niži kvalitet, problem u fermentaciji u slučaju prisustva rezidua antibiotika, manji procenat masnoće, gubitak sočnosti i slabiji razvitak ukusa proizvoda (Brockman i sar., 1986). Zbog toga je kontrola biorezidua i kontaminenata okoline neophodna i to počev od uzgoja pa do gotovih proizvoda animalnog porekla (Croubles i sar., 2004).

Zaključak / Conclusion

U odgovarajućim matriksima svinja, kao i u uzorcima Petrovačke kobasice uzorkovanih u skladu sa Programom sistematskog praćenja rezidua far-

makoloških, hormonskih i drugih štetnih materija kod životinja, proizvoda životinjskog porekla, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje, nije ustanovljen povećan sadržaj toksičnih elemenata, odnosno žive, olova, kadmijuma i arsena veći od maksimalno dozvoljenih količina. Rezidue veterinarskih lekova i kontaminenata okoline bile su manje od limita detekcije primenjenih analitičkih metoda.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je autohtoni proizvod Petrovačka kobasica, u tipu fermentisanih kobasica visokog, prepoznatljivog kvaliteta, zdravstveno bezbedan. Kao takav, omogućava regulisanje oznake porekla, koja kod potrošača postaje sinonim za proizvode sa garancijom kvaliteta i efikasnom kontrolom procesa proizvodnje i kvaliteta proizvoda.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je finansiran sredstvima Projekta „Razvoj tehnologije sušenja i fermentacije petrovačke kobasice (Petrovská klobása - oznaka geografskog porekla) u kontrolisanim uslovima“, evidencioni broj TR - 20037.

The work was financed with funds from the Project „Development of technology for drying and fermentation of the sausage petrovačka kobasica (Petrovská klobása – registered geographic origin) under controlled conditions“, registered under Number TR - 20037.

Literatura / References

1. Alonso ML, Beneditto JL, Miranda M, Castillo C, Hernandez J, Shore RF. Toxic and trace elements in liver, kidney and meat from cattle slaughtered in Galicia (NW Spain). *Food Additives Contaminants* 2000; 17: 447-57.
2. Alonso ML, Beneditto JL, Miranda M, Castillo C, Hernandez J, Shore RF. Cattle as bio-monitors of soil arsenic, copper and zinc concentrations in Galicia(NW Spain). *Archives Environmental Contamination Toxicology* 2002; 43: 103-8.
3. 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.
4. Arnold SM, Zarnke RL, Lynn TV, Chimonas MAR, Frank A. Public health evaluation of cadmium concentrations in liver and kidney of moose (*Alces alces*) from four areas of Alaska. *Science of Total Environment* 2006; 357: 103-11.
5. Brockman M. Laarvelo R. Hormonal regulation of metabolism in ruminants. *Rev Livestock Prod Sci* 1986; 14: 313-7.
6. Commission Decision 98/179/EC, 1998. Laying down detailed rules on official sampling for the monitoring of certain substances and residues thereof in live animals and animal products. *Off J of the EU*, L 196.
7. Coudray C, Feillet-Coudray C, Rambeau M, Tressol JC, Gueux E, Mazur A, Rayssiguier Y. The effect of aging on intestinal absorption and status of calcium, magnesium, zinc and copper in rats. Stable isotope study. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2006; 20: 73-81.
8. Council Regulation (EEC) No 2377/90 (with amendments). Laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off J of the EC*, L 67/1, 1990.
9. Council Directive 96/23/EC On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products. *Off. J. of the EC*, L 125/10-32, 1996.

10. Croubels E, Daeselaire S, Baere S, Backer P, Courtheyn D. Feed and drug residues, In: Encyclopedia of Meat Sciences. Jensen W, Devine C, Dikemann M (editors), London. Elsevier Applied Science 2004; 1172 -87.
11. Custer TW, Cox E, Gray B. Trace elements in moose (*Alces alces*) found dead in north-western Minnesota, USA. Science of Total Environment 2004; 330: 81-7.
12. Dixon SN. Veterinary drug residues. In: Food chemical safety. Volume 1: Contaminants. DH Watson, ed Cambridge. England: Woodhead Publishing, Ltd., 2001: 109-47.
13. Dorton KL, Engle TE, Hamar DW, Siciliano PD, Yemm RS. Effects of copper source and concentration on copper status and immune function in growing and finishing steer. Anim Feed Science Technology 2003; 110: 31-44.
14. Frank A, Danielsson R, Jones B. The mysterious disease in Swedish moose. Concentrations of trace elements in liver and kidneys and clinical chemistry. Comparison with experimental molybdenosis and copper deficiency in the goat. Sci Total Environ 2000; 249: 107-22.
15. Heggum C. Risk analysis and quantitative risk management in Encyclopedia of Meat Sciences, ed by Jensen W, Devine C and Dikemann M. 2004: 1187-91.
16. Janković S, Spirić A, Radičević T, Stefanović S. Monitoring rezidua u životinjama i primarnim proizvodima animalnog porekla. Veterinarski glasnik 2008; 62(5-6): 383-94.
17. Lilić S, Janković S, Matekalo-Sverak V, Turubatović L, Okanović, Radičević T, Stefanović S. Possibility of use of bovine and pigs' liver and kidneys in human nutrition. Tehnologija mesa 2010; 50: 358-65.
18. Nriagu J, Boughanen M, Linder A, Howe A, Grant C, Rattray MV, Lalor G. Levels of As, Cd, Pb, Cu, Se and Zn in bovine kidneys and livers in Jamaica. Ecotoxicology and Environmental Safety 2009; 72: 564-71.
19. Petrović Lj i sar. Završni izveštaj o realizaciji istraživačkog projekta TR- 20037: „Razvoj tehnologije sušenja i fermentacije petrovačke kobasice (Petrovská klobasá – oznaka geografskog porekla), finansiran sredstvima Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu 2008–2011. godine. Rukovodilac projekta prof. dr Ljiljana Petrović.
20. Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih supstancija koje mogu da se nađu u namirnicama (Sl. list SRJ, 5/92, 11/92, 32/02).
21. Roseiro LC, Santos C, Sol M, Borges MJ, Anjos M, Gonçalves H, Carvalho AS. Proteolysis in Painho de Portalegre dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. Meat Science 2008; 79: 784-94.
22. Thual D. International Registration of Geographical Indications: what producers need. WIPO Symposium on Geographical Indications, Parma, 2005.
23. Van Peteghem C, Daeselaire E. Residues of Growth Promoters. In: Handbook of Food Analysis, 2nd ed. LML nollet, ed. New York, Marcel dekker Inc., 2004; 1037-63.
24. Vesković-Moračanin S, Obradović D. Mikrobiološki ekosistem tradicionalnih fermentisanih kobasica u Srbiji — mogućnosti stvaranja sopstvenih starter kultura. Tehnologija mesa 2009; 50(1-2): 60-7.
25. Zakon o bezbednosti hrane „Službeni glasnik RS“, broj 41/09.

ENGLISH

INVESTIGATIONS OF RESIDUE OF VETERINARY MEDICINES AND ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS DURING PRODUCTION CYCLE OF PETROVSKA KLOBASA AS PART OF COMPULSORY PARAMETERS FOR FOOD SAFETY

Vesna Janković, Ljiljana Petrović, Slavica Vesković, Dragica Karan, Tanja Radičević, S. Janković, S. Stefanović

A significant factor in the protection of consumer health is the systematic and constant implementation of control for the presence of residue of biologically active substances and their metabolites in raw materials and in primary products of animal origin.

As regards meat, an essential aspect of security is definitely the control of possible residue of veterinary medicines and environmental contaminants.

In that respect, the objective of the national project entitled „Development of technology for drying and fermentation of the sausage *petrovačka kobasica* (*Petrovská klobása* – registered geographic origin) under controlled conditions“, Number TR - 20037, was to protect the product *petrovačka kobasica* (*Petrovská klobása*) with the appropriate appellation. A part of the compulsory investigations also included the establishing of the presence of residue of veterinary medicines and environmental contaminants in raw materials and in the finished product, which was also the aim of this work.

Key words: consumer protection, residue of veterinary medicines, environmental contaminants, *petrovačka kobasica*

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ ПРИСУТСТВИЯ ОСТАТКОВ ВЕТЕРИНАРНЫХ ЛЕКАРСТВ И КОНТАМИНЕНТОВ ОКРЕСТНОСТИ В ТЕЧЕНИЕ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ЦИКЛА ПЕТРОВАЧКОЙ КОЛБАСЫ КАК ЧАСТЬ ОБЯЗАТЕЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ

Весна Янкович, Лиляна Петрович, Славица Вескович, Драгица Каран, Таня Радичевич, Саша Янкович, Срджан Стефанович

Значительный деятель охраны здоровья потребителей систематическое и постоянное проведение контроля присутствия остатков биологически активных субстанций и их метаболитов в сыре и первичных продуктах животного происхождения.

Когда вопрос мяса, важный аспект безопасности, всячески контроль остатков ветеринарных лекарств и контаминентов окрестности.

В этом смысле, цель Национального проекта под названием "Развитие технологии сушки и ферментации петровачкой колбасы (Петровска́ клоба́са - знак географического происхождения) в контролируемых условиях", учётный номер ТР-2037, был, что продукт, петровачка колбаса (Петровска́ клоба́са) защитить знаком географического происхождения. Часть обязательных испытаний охватывала и утверждение присутствия остатков ветеринарных лекарств и контами-

Vet. glasnik 66 (3-4) 243 - 257 (2012) Vesna Janković i sar.: Ispitivanje prisustva rezidua veterinarskih lekova i kontaminenata okoline tokom proizvodnog ciklusa petrovačke...

нентов окрестности в сыре и финальном продукте, что вместе представляет собой и цель этой работы.

Ключевые слова: защита потребителей, остатки ветеринарных лекарств, контаминенты окрестности, петровачкая колбаса

MEHANIZMI TOKSIČNOG DEJSTVA I INTERAKCIJE POLIHLOROVANIH BIFENILA I POLIBROMOVANIH DIFENIL ETARA*

TOXICITY MECHANISMS AND INTERACTIONS OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS AND POLYBROMINATED DIPHENYLETHERS

Biljana Antonijević, Vesna Milovanović, Marijana Ćurčić, S. Janković,
Vesna Jačević, Slavica Vučinić**

Polihlorovani bifenili (PCBs) i bromovani usporivači gorenja, polibromovani difenil etri (PBDEs) su široko rasprostranjeni u životnoj sredini kao posledica antropogenih aktivnosti i zahvaljujući njihovoj postojanosti i otpornosti na degradaciju. Obe grupe jedinjenja se nalaze na listi perzistentnih organskih zagađivača (POPs) usvojenoj Stokholmskom konvencijom sa ciljem da zabrani ili ograniči proizvodnju, upotrebu, emisiju ili uvoz i izvoz toksičnih supstanci označenih kao POPs u svrhu zaštite zdravlja ljudi i životne sredine. Uzimajući u obzir strukturnu sličnost između PBDEs i PCBs, kao i činjenicu da je istovremena ekspozicija ovim jedinjenjima realna, ispitivanja njihovih interakcija su od značaja za predviđanje rezultujućeg efekta. Saznanja u oblasti toksikologije smeša, takođe doprinose procesu evaluacije i karakterizacije rizika. Interakcije jedinjenja iz ovih grupa su verovatne na nivou endokrinog sistema, naročito tiroidnog i reproduktivnog. S obzirom na mehanizme toksičnosti obe grupe supstanci za nervni sistem, uključujući funkcionalne promene, neurološke poremećaje i promene u ponašanju, moguće je očekivati njihove interakcije i na sistemima neurotrans-

* Rad primljen za štampu 01. 11. 2012. godine

** Dr sc. Biljana Antonijević, vanredni profesor, Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, Srbija; Vesna Milovanović, dipl. pharm. – med. bioh., student doktorskih studija, Agencija za hemikalije Republike Srbije, Beograd, Srbija; mr sc. Marijana Ćurčić, asistent, Katedra za toksikologiju „Akademik Danilo Soldatović“, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, Srbija; Saša Janković, dipl. pharm. – med. bioh. istraživač saradnik; Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, Srbija; dr sc. Vesna Jačević, viši naučni saradnik; dr sc. Slavica Vučinić, vanredni profesor, Centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd, Srbija

mitera, promene u prenosu signala i izazivanje apoptoze, kao i na pojavu metaboličkih poremećaja.

Ključne reči: polihlorovani bifenili, polibromovani difenil etri, mehanizmi toksičnosti, interakcije, rizik

Uvod / Introduction

Jedinjenja iz grupe dugotrajnih organskih zagađivača (POPs) su široko rasprostranjena u životnoj sredini kao posledica antropogenih aktivnosti, postojanosti i otpornosti na hemijsku, fotolitičku i biološku degradaciju. Dve kvantitativno dominantne grupe organo-halogenih zagađivača životne sredine su polihlorovani bifenili (PCBs) i bromovani usporivači gorenja, među kojima najširu primenu danas imaju polibromovani difenil etri (PBDEs). Nasuprot PCBs, čija je proizvodnja zabranjena Stokholmskom konvencijom, pojedini PBDEs se i dalje proizvode za upotrebu kao usporivači gorenja za različite proizvode široke potrošnje kao što su električni i elektronski uređaji, materijali za različite namene (građevinska, auto i avio industrija i sl.). Supstance koje pripadaju ovim grupama zbog svoje lipofilnosti imaju sposobnost bioakumulacije i biomagnifikacije, pa u tkivima ljudi i životinja mogu da dostignu određene merljive koncentracije. Njihova zastupljenost u tkivima dovodi se u vezu sa efektima na zdravlje ljudi i životinja. Iako nivo pojedinačnog jedinjenja ne mora da dovede do pojave štetnog efekta, zbirni efekat ovih jedinjenja može da bude od toksikološkog značaja (Janković i sar., 2010; Ćurčić i sar., 2010).

U ispitivanjima na životinjama efekti PCBs se manifestuju prvenstveno posle hronične ekspozicije njihovim smešama ili pojedinačnim kongenerima. U štetne efekte PCBs spadaju neurotoksičnost, karcinogenost, reproduktivni poremećaji, kao i delovanje na endokrini sistem. Kod eksperimentalnih životinja ekspozicija PCBs dovodi do poremećaja menstrualnog ciklusa i utiče na produkciju i morfologiju spermatozoida. Ovi efekti imaju za posledicu teškoće u začeću, povećanje incidence abortusa i prevremenih porođaja, kao i neplodnost. PCBs mogu uticati na endokrini sistem na više načina – direktno na hormone, na određene enzime, transportne proteine, receptore, endokrine žlezde i regulacione sisteme. Navedeni efekti vode poremećajima razvoja nervnog sistema, reprodukcije i indukovanju hormon-senzitivnih tumora. Najznačajniji endokrini efekti PCBs su poremećaj hormona štitne žlezde i mogućnost izazivanja agonističkog ili antagonističkog estrogenskog odgovora. U zavisnosti od položaja hlora u molekulu kongenera, a naročito u orto položajima, PCBs pokazuju veliku različitost u mehanizmima štetnog dejstva. Kongeneri koji sadrže jedan ili ne sadrže supstituente hlora u orto položaju mogu da zauzmu planarnu konfiguraciju i pokazuju toksičnost sličnu 2,3,7,8-tetrahlorodibenzo-*p*-dioksinu (TCDD). Kongeneri sa manjim brojem atoma hlora u orto položajima smatraju se neplanarnim i imaju različitu toksičnost od planarnih. Većina ispitivanja mehanizama toksičnosti

PCBs je fokusirana na planarne, dioksinu slične kongenere, iako u životnoj sredini dominiraju neplanarni, orto supstituisani PCBs. Pojedini orto supstituisani, neplanarni PCBs kongeneri takođe pokazuju značajnu biološku aktivnost i igraju bitnu ulogu u citotoksičnosti (ATSDR, 2000).

Pojedini bromovani usporivači gorenja strukturno su slični PCBs, pa većina ispitivanja njihove toksičnosti ima komparativni pristup u odnosu na studije toksičnosti PCBs i drugih organohalogenata, kao što su dioksini. Pored toga, njihova toksičnost nije u potpunosti istražena, pa je i broj podataka o toksičnosti PBDEs još uvek relativno mali u odnosu na PCBs. Jedinjenja iz grupe PBDEs takođe se mogu pojaviti u obliku 209 različitih kongenera, od kojih su u životnoj sredini najzastupljeniji PBDE 47, 99, 100, 153 i 154. Na osnovu strukturne sličnosti i efekata koje izazivaju pojedini PCBs i PBDEs mogu se pretpostaviti moguće interakcije jedinjenja iz ovih grupa. U ovom smislu, najviše su ispitivani efekti na endokrini i nervni sistem.

S obzirom na jednovremeno prisustvo PCBs i PBDEs u životnoj sredini, cilj ovog rada bio je da se prikažu mehanizmi toksičnog dejstva i da se ukaže na moguća ciljna mesta njihovih interakcija u organizmu.

Mehanizam toksičnog dejstva preko receptora za aromatične ugljovodonike/ *Mechanism of toxic effects through receptors for aromatic hydrocarbons*

Najveći broj štetnih efekata koplanarnih PCBs je posledica njihovog vezivanja za receptor za aromatične ugljovodonike (AhR). Ovaj receptor je multifunkcionalni protein koji dovodi do promena u ekspresiji gena i prenosu signala, podstičući promene u proliferaciji i diferencijaciji ćelija. Planarni kongeneri PCBs vezuju se sa visokim afinitetom za ovaj receptor, slično afinitetu koji pokazuju polihlorovani dibenzo-*p*-dioksini (PCDDs) i polihlorovani dibenzofurani (PCDFs). Step supstitucije u bifenilnom mostu takođe utiče na sposobnost aktivacije AhR. Međutim, pokazano je da jedinjenja vrlo različite strukture mogu biti aktivatori AhR. Takođe se pretpostavlja da postoji nekoliko istovremenih mehanizama aktivacije ovog receptora i da dejstvo najaktivnijih jedinjenja verovatno uključuje više različitih mehanizama. Smatra se da je indukcija aktivnosti enzima P450 zavisna od aktivacije AhR. Kongeneri PCBs koji pokazuju veliki afinitet vezivanja za AhR mogu da budu potentni induktori familije CYP1 (A1, A2, B1), a oni koji imaju orto supstituisanu strukturu indukuju enzime iz familija CYP2 i CYP3 (Safe, 1990; Safe, 1994).

Zbog strukturne sličnosti sa dioksinima, pojedini autori pripisuju polibromovanim difenil etrima ispoljavanje toksičnih efekata preko receptora za aromatične ugljovodonike (Čurčić i sar., 2010). Ispitivanjem na pacovima pokazano je da PBDE 47 može da bude antagonist receptora za aromatične ugljovodonike (Hamers i sar., 2006). Na hepatocitima majmuna primećena je dozno-zavisna antagonistička aktivnost PBDEs na indukciju CYP1A pri koncentracijama od 0,1 do 10 μ M (Peters i sar., 2006).

Smatra se i da je receptor za aromatične ugljovodonike uključen u transkripciju zavisnu od estrogena, da kontroliše ciljno-specifičnu nishodnu regulaciju estrogenskog receptora i da učestvuje u nekoliko drugih važnih puteva prenosa signala. Pojedini PCBs kongeneri su toksični za endokrini i reproduktivni sistem. Pored bioloških i toksičnih efekata osnovnog jedinjenja, uloga hidroksilovanih i metil-sulfon metabolita PCBs u endokrinim poremećajima je od posebnog toksikološkog interesa. Rezultati ispitivanja na ćelijama karcinoma dojke ukazuju na to da AhR ima važnu ulogu u posredovanju antiestrogenog odgovora. Nuklearni translokator receptora za aromatične ugljovodonike (ARNT) se pominje kao važan faktor u dijabetesu tipa 2. Naime, smanjenje nivoa ARNT dovelo je do značajnog poremećaja oslobađanja insulina nakon stimulacije glukozom, kao i do promena u ekspresiji gena za humane β -ćelije pankreasa. Pretpostavlja se da bi AhR i ARNT mogli da predstavljaju vezu između faktora životne sredine i pojave ove bolesti kod ljudi. Međutim, da bi se okarakterisali efekti koje na zdravlje imaju zagađivači životne sredine koji remete endokrini sistem, potrebna su dalja ispitivanja na ovom polju.

Citotoksičnost polihlorovanih bifenila i polibromovanih difenil etara /
Cytotoxicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenylethers

Citotoksičnost pojedinih kongenera PCBs potvrđena je *in vitro* ispitivanjima (Antonijević i sar., 2010). Na Vero ćelijskoj liniji orto supstituisani PCB 153 je indukovao veći gubitak vijabilnosti ćelija nego planarni PCB 126. Ovom efektu je prethodilo oštećenje strukture i funkcije mitohondrija, smanjenje potencijala membrane i veličine ćelija, pa se apoptoza smatra važnim mehanizmom ćelijske smrti kod ekspozicije PCB 153 (Shen i sar., 2010). Takođe je pokazano da voluminozni, neplanarni PCB 52 izaziva veći poremećaj funkcije ćelijske membrane nego planarni PCB 77 (Chen i sar., 2010). Mogućim mehanizmom razvoja tumora izazvanog PCBs smatra se inhibicija unutarćelijskog prenosa signala (De Haan i sar., 1994). Kongeneri 52 i 77 su pokazali stimulaciju proliferacije Vero ćelijske linije pri niskim dozama (Chen i sar., 2010). I planarni i neplanarni kongeneri u niskim koncentracijama mogu da indukuju izmene u p53 prenosu signala, a ovi efekti bi mogli da budu povezani sa karcinogenezom u jetri pacova (Al Anati i sar., 2009). Neki autori su predložili mehanizme citotoksičnosti ovih jedinjenja posredovane oksidativnim stresom. Citotoksičnost izazvana planarnim PCBs je posredovana prvenstveno aktivacijom mikrozomalnih monooksigenaza, koje konvertuju PCBs u reaktivne metabolite koji mogu da reaguju sa N- i S-nukleofilima, uključujući aminokiseline, proteine i peptide. Za koplanarni PCB 126 je pokazano da posreduje u apoptozi i remećenju potencijala membrane mitohondrija putem stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (Parka i sar., 2010).

Citotoksičnost polibromovanih difenil etara je takođe pokazana u *in vitro* ispitivanjima (Durgo i sar., 2010). PBDE 209 je inhibirao vijabilitet ćelija humanog hepatoma u zavisnosti od vremena i koncentracije. Mehanizmom ove cito-

toksičnosti smatra se izazivanje apoptoze preko stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (Hua i sar., 2007). Pokazano je da PBDE 47 može da izazove oksidativni stres, oštećenje DNK i apoptozu u primarnim neuronima hipokampusu pacova. PBDE 47 utiče na porast koncentracije intracelularnog kalcijuma, a poznato je da promene u homeostazi kalcijuma mogu dovesti do apoptoze (He i sar., 2009). Za metabolit 6-OH-PBDE 47 je pokazano da je potentniji u remećenju homeostaze kalcijuma i oslobađanja neurotransmitera nego polazno jedinjenje, PBDE 47 (Dingemans i sar., 2008).

Interakcije polihlorovanih bifenila i polibromovanih difenil etara /
Interactions of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenylethers

Pregledom mehanizama dejstva i toksičnih efekata PCBs i PBDEs moguće je otvoriti pitanje mogućih interakcija ove dve grupe jedinjenja. Za PCBs, naročito neplanarne, i za PBDEs se smatra da remete endokrini sistem. Difenilna struktura molekula PCBs, PBDEs i metabolita ovih jedinjenja slična je strukturi tiroidnog hormona i zbog toga oni mogu da deluju preko receptora i/ili transportnog proteina za tiroidne hormone (Cheek, 1999). Tiroidni sistem se pokazao osetljivim na pojedine zagađivače životne sredine naročito tokom ranog rasta i razvoja i kritičan je za razvoj centralnog nervnog sistema. PCBs, naročito metaboliti OH-PCB, vezuju se za proteine koji prenose T4 i mogu da istisnu prirodni hormon iz veze sa transportnim proteinom. Prenos hidroksilovanih PCBs sa majke na fetus olakšan je *in vivo* vezivanjem za transtiretin. Ovaj mehanizam može dovesti do snižavanja nivoa T4 u mozgu fetusa (Meerts i sar., 2002). PCBs indukuju abnormalni razvoj mozga delujući direktno preko sistema tiroidnih hormona i posle akutne i subakutne ekspozicije. U periodu rasta i razvoja, kao i kod odraslih životinja ekspozicija PCBs može dovesti do uvećanja štitne žlezde i smanjenje nivoa ukupnog T4 u serumu (Porterfield, 2000). Pojedini kongeneri PCBs indukuju ekspresiju mikrozomalnih enzima, uridin difosfat glukuronil-transferaze, koji metaboliše T4 do glukuronida, čime se olakšava ekskrecija (Barter i Klaassen, 1994). U ispitivanju efekata PBDEs na endokrini sistem kod miševa pokazano je da je prenatalno izlaganje PBDE 209 uzrokovalo promene na štitnoj žlezdi i u koncentracijama T3 u serumu (Tseng i sar., 2008). Pokazano je da PBDE 47 može da izmeni transport T4 putem transtiretina kod glodara (Richardson i sar., 2008). Pretpostavlja se da se hidroksilovani metaboliti PBDEs nalik hidroksilovanim metabolitima PCBs vezuju za transtiretin (Hallgren i Damerud, 2002) zbog čega jetra u većoj meri preuzima T4, koji se eliminiše putem žuči. PCBs su potentnije supstance od PBDEs, jer PBDEs treba da budu aktivirani do hidroksi metabolita pre nego što kompetitivno inhibiraju vezivanje T4. Smatra se, takođe, da mnogi hidroksilovani PCBs i PBDEs imaju veći afinitet za transportni protein transtiretin nego sam T4 (Kitamura i sar., 2005). Efekti obe grupe jedinjenja na transport i metabolizam hormona štitne žlezde otvaraju pitanje mogućih interakcija ovih jedinjenja pri istovremenoj ekspoziciji.

Neurotoksičnost / Neurotoxicity

U kohortnoj studiji zaključeno je da su koncentracije mono-orto supstituisanih PCBs u serumu majki značajno povezane sa nižim indeksima psihomotornog i mentalnog razvoja dece. Prenatalna ekspozicija ovim PCBs može da utiče na rast i razvoj mozga *in utero*. Neka ispitivanja navode da mono i di orto supstituisani PCBs imaju izraženiji štetni efekat na razvoj nervnog sistema nego planarni. Zbog toga se smatra da je ova toksičnost posredovana mehanizmom koji ne uključuje receptor za aromatične ugljovodonike. Kao mehanizmi funkcionalnih promena nervnog sistema po ekspoziciji PCBs navode se efekti na sisteme neurotransmitera (dopamina, serotonin, glutamata, γ -aminobuterne kiseline (GABA), uključujući njihov transport, i receptore (GABA-A receptor, N-metil-D-aspartatni (NMDA) receptor, muskarinski, nikotinski) (Maurissen i Fonnum, 2006). Osim toga, PCBs remete homeostazu kalcijuma, sisteme hormona i dovode do oksidativnog stresa. Ove efekte prate aktivacija ili inhibicija određenih enzima prenosa signala kao što je protein kinaza C i smanjena vijabilnost ćelija (Royland i sar., 2008). Na pacovima je dokazano da ekspozicija neplanarnim PCBs tokom graviditeta i laktacije uzrokuje dugotrajan poremećaj kognitivne funkcije ili motorne koordinacije kod potomstva. Različiti kongeneri uzrokuju različite poremećaje ponašanja. PCB 52 remeti motornu koordinaciju čemu doprinosi povećanje ekstracelularne γ -aminobuterne kiseline u malom mozgu. S druge strane, PCB 138 i 180 remete sposobnost učenja zbog poremećene funkcije glutamat-NO-cGMP puta u mozgu i smanjenje broja NMDA receptora (Boix i sar., 2010).

Smatra se da je u mehanizme neurotoksičnosti PBDEs uključena apoptoza kao posledica remećenja homeostaze kalcijuma. U ispitivanju na ćelijama malog mozga dokazana je neurotoksičnost smeše polibromovanih difenil etara DE 71 (Reistad i sar., 2006). Na primarnim neuronima hipokampusa pacova je pokazano da PBDE 209 povećava učestalost apoptoze, ekspresiju p38 mitogenom aktivirane proteinske (MAP) kinaze, koncentraciju jona kalcijuma, nivoe parametara oksidativnog stresa i snižava nivoe ukupne metilacije gena DNK. Navedene promene do kojih dovodi PBDE 209 mogu da doprinesu neurotoksičnosti u periodu rasta i razvoja (Chen i sar., 2010). Takođe je pokazano da PBDE 209 ireverzibilno smanjuje prolazak natrijuma kroz voltažno zavisne kanale pri vrlo niskim koncentracijama. Ovaj efekat bi mogao da bude jedan od mehanizama za pojavu neuroloških simptoma pri intoksikaciji (Xing i sar., 2010). Na humanim ćelijama neuroblastoma dokazana je interakcija PBDE 47 i PBDE 99. PBDE 47, PBDE 99 i PCB 47 dozno-zavisno inhibiraju preuzimanje kalcijuma u mikrozome i mitohondrije pri mikromolskim koncentracijama. Kongeneri PBDE 47 i 99 inhibiraju preuzimanje kalcijuma pri koncentracijama sličnim onima koje su ranije utvrđene za PCBs. Inhibicija mitohondrijalnog preuzimanja jona kalcijuma nije ista u svim regijama mozga, i hipotalamus je u ovom smislu najosetljiviji (Coburn i sar., 2008). Pokazano je da je metabolit 6-OH-BDE 47 potentniji u re-

mećenju homeostaze kalcijuma i oslobađanja neurotransmitera nego polazno jedinjenje PBDE 47. Ovo govori u prilog tome da oksidativni metabolizam može značajno da doprinese neurotoksičnosti PBDEs (Dingemans i sar., 2008).

Još neka ispitivanja govore u prilog interakcijama u odnosu na neurotoksični efekat PCBs i PBDEs. Na ćelijama neuroblastoma potvrđeno je da PBDE 47 može da pojača neurotoksičnost PCB 153. Ova interakcija je sinergistička u opsegu doza koje izazivaju neurotoksičnost (He i sar., 2009). Takođe je pokazano da ova interakcija postoji između PCB 52 i PBDE 99 (Eriksson i sar., 2006). Osim toga, primećen je značajan sinergistički efekat PCB 153 i PBDE 47 na ekspresiju kaspaze 3 i iRNK citohroma C ukazujući na indukciju apoptotičke smrti. Takođe je uočeno da ova dva kongenera, u različitom odnosu koncentracija, učestvuju u indukciji ekspresije drugih proteina uključenih u proces apoptoze (He i sar., 2009).

Predložena ciljna mesta dejstva PCBs, PBDEs i njihovih metabolita u nervnim ćelijama su mitohondrijalna homeostaza kalcijuma, aktivacija rijanodinskih receptora u endoplazmatičnom retikulumu, aktivacija NMDA receptora, smanjen influks kalcijuma i inhibicija izmene natrijuma i kalcijuma (Pessah i sar., 2010). Pored toga, zajednička mesta dejstva su i aktivacija sintetaze azot(II)-oksida, inhibicija transporta dopamina, autooksidacija dopamina praćena stvaranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta. PCBs i PBDEs doprinose stvaranju reaktivnih kiseoničnih vrsta, što je najverovatnije posledica poremećaja homeostaze kalcijuma. Osim navedenog, zajedničko mesto dejstva je i aktivacija MAP kinaza. Dodatno, ova jedinjenja deluju preko neuroendokrinih faktora, naročito sistema tiroidnih hormona, što može da utiče na neurološki razvoj, naročito na holinergički sistem (He i sar., 2009). Izmenjena aktivnost holin acetiltransferaze može delom da bude posledica hipotiroidizma udruženog sa ekspozicijom PCBs (Juarez de Ku i sar., 1994). Efekti smeše PCBs i PBDEs su uočeni i na kardiovaskularnom sistemu. Naime, pokazano je da komercijalne smeše PCBs i PBDEs značajno smanjuju oslobađanje vazopresina iz supraoptičkih neurona hipotalamusa pacova (Coburn i sar., 2007). Centralno oslobađanje vazopresina je odgovorno ne samo za endokrinu regulaciju telesnih tečnosti i kardiovaskularnu funkciju, već ima ulogu i u kognitivnim funkcijama kao što su učenje i pamćenje. Dodatno, ekspozicija PBDEs tokom rasta i razvoja dovodi se u vezu i sa pojavom autizma (Messer, 2010).

Mehanizmi dejstva i procena rizika / *Mechanisms of action and risk evaluation*

U proceni rizika za 12 koplanarnih PCBs i druga jedinjenja slična dioksinu primenjuje se metodologija kumulativne procene rizika korišćenjem faktora ekvivalenta toksičnosti (TEF), tako što se upoređuje potentnost pojedinačnih kongenera sa potentnošću 2,3,7,8-tetrahlordibenzo-p-dioksina (TCDD) (Van den Berg, 2006). Metodologija TEF se bazira na osobini kongenera da se vezuju za AhR i aktiviraju aktivnost enzima putem ovog receptora. Faktori ekvivalenta toksičnosti se koriste da se izračuna ekvivalent toksičnosti (TEQ) smeše koji pred-

stavlja zbir svih pojedinačnih TEF kongenera pomnožen sa koncentracijom određenog kongenera u smeši.

Polibromovani difenil etri koji su odnedavno priključeni grupi POPs, i PCBs, naročito neplanarni, imaju slične strukturne karakteristike i zbog toga pojedina ispitivanja toksičnosti PBDEs imaju upravo komparativni pristup. Pojedini PBDEs mogu da aktiviraju AhR, ali imaju manju relativnu potentnost od 2,3,7,8-TCDD (Chen i sar., 2001).

Za PCBs koji nisu slični dioksinu za sada nije predložena jedinstvena metodologija za određivanje i upoređivanje toksičnosti. Orto supstituisani PCBs imaju izražene mehanizme toksičnog dejstva različite od vezivanja za AhR, uključujući efekte na neurološki razvoj, nivo dopamina i promociju tumora. Osim toga, specifičniji efekti višestruko orto supstituisanih PCBs uglavnom su pokazani pri znatno višim dozama od onih koji su uočeni kod agonista AhR. Poznavanje relativne toksičnosti različitih kongenera u odnosu na druge mehanizme dejstva (različitim od aktivacije AhR) bi unapredilo razumevanje toksičnosti PCBs i sličnih jedinjenja, kao što su PBDEs, i omogućilo verodostojniju interpretaciju rizika pri istovremenoj ekspoziciji ovim jedinjenjima. Predložene su i drugačije šeme za izražavanje relativne toksičnosti, npr. NEQ (ekvivalent neurotoksičnosti), i mogući biomarker (smanjenje cirkulišućeg T4) (Yang i sar., 2010) za formiranje nove TEF šeme koja uključuje i orto kongenere. Ovaj novi TEF koncept bi bio koristan za orto supstituisane PCBs u proceni rizika u odnosu na poremećaj endokrine funkcije i neurotoksične efekte PCBs, ali i PBDEs koji deluju sličnim mehanizmima.

Kvantitativna procena toksičnosti neplanarnih kongenera PCBs u smeši (prema efektima različitim od aktivacije AhR) može značajno da poboljša buduću procenu rizika smeša PCBs i sličnih jedinjenja. Kumulativna procena rizika bi mogla da predstavlja metodološku osnovu za procenu interakcija jedinjenja koja pokazuju isti mehanizam štetnog dejstva, kao što su pojedini PCBs i PBDEs.

Zaključak / Conclusion

Ljudi su svakodnevno izloženi smešama potencijalno toksičnih supstanci kao što su PCBs i PBDEs. Ispitivanja pojedinačnih jedinjenja, međutim, često nisu dovoljna da bi se objasnila veza između ekspozicije i toksičnog efekta. Pri izloženosti smešama supstanci potrebno je identifikovati jedinjenja koja su odgovorna za toksične efekte, ispitati verovatnoću nastanka interakcija, njihovu prirodu i intenzitet. S obzirom na strukturnu sličnost PBDEs sa PCBs i njihove pojedinačne efekte moguće je pretpostaviti da su interakcije ovih grupa jedinjenja verovatne na nivou sistema hormona, naročito tiroidnih i reproduktivnih. Kao mehanizmi štetnog dejstva obe grupe supstanci na nervni sistem, uključujući funkcionalne promene, neurološke poremećaje i promene u ponašanju, u stručnoj i naučnoj literaturi se navode uticaji na sisteme neurotransmitera, promene u prenosu signala i izazivanje apoptoze. Ispitivanjem potencijalnih efekata jedinjenja u

smeši uključujući i savremene pristupe modelovanju odnosa doza-odgovor dolazi se do rezultata koji doprinose boljem razumevanju mehanizama i interpretaciji efekata kompleksnih smeša.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Ovaj rad je deo projekta broj III 46009, koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije, 2011-2014 /

This work is part of Project Number III 46009 financed by the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia

Literatura / References

1. Al-Anati L, Hogberg J, Stenius U. Non-dioxin-like-PCBs phosphorylate Mdm2 at Ser166 and attenuate the p53 response in HepG2 cells. *Chem Biol Interact* 2009;182(2-3): 191-8.
2. Antonijević B, Čurčić M, Durgo K, Vesković S, Stefanović S. Citotoksični efekti polihlorovanih bifenila. Knjiga sažetaka 10. kongresa toksikologa Srbije sa međunarodnim učešćem; 2010. sep 22-25.; Palić, Srbija. 2010: 164.
3. ATSDR. Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, November 2000.
4. Barter RA, Klaassen CD. Reduction of thyroid hormone levels and alteration of thyroid function by four representative UDP-glucuronosyltransferase inducers in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 128(1): 9-17.
5. Boix J, Cauli O, Felipo V. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 affects differentially learning or motor coordination in adult rats. *Mechanisms involved. Neuroscience*. 2010; 167(4): 994-1003.
6. Cheek. Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: Interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin. *Environ Health Perspect* 1999; 107(4): 273-8.
7. Chen J, Liufu C, Sun W, Sun X, Chen D. Assessment of the neurotoxic mechanisms of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in primary cultured neonatal rat hippocampal neurons includes alterations in second messenger signaling and oxidative stress. *Toxicol Lett* 2010; 192(3): 431-9.
8. Chen G, Konstantinov AD, Chittim BG, Joyce EM, Bols NC, Bunce NJ. Synthesis of polybrominated diphenyl ethers and their capacity to induce CYP1A by the Ah receptor mediated pathway. *Environ Sci Technol* 2001; 35(18): 3749-56.
9. Chen Y, Shen K, Shen C, Chen L, Chen X. Comparison of structure-dependent hormetic cytotoxicity induced by coplanar and non-coplanar PCB congeners. *J Hazard Mater* 2010; 180: 773-6.
10. Coburn CG, Curra's-Collazo MC, Kodavanti PRS. *In Vitro* Effects of Environmentally Relevant Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Congeners on Calcium Buffering Mechanisms in Rat Brain. *Neurochem Res* 2008; 33: 355-64.
11. Coburn CG, Curras-Collazo MC, Kodavanti PRS. Polybrominated Diphenyl Ethers and ortho-Substituted Polychlorinated Biphenyls as Neuroendocrine Disruptors of Vasopressin Release: Effects during Physiological Activation *In Vitro* and Structure-Activity Relationships. *Toxicol Sci* 2007; 98(1): 178-86.

12. Ćurčić M, Antonijević B, Durgo K, Janković S, Jačević V. Toksikološki značaj i potencijalni rizik pri ekspoziciji polibromovanim difenil etrima. *Arh Farm* 2010; 60: 311-22.
13. De Haan LH, Simons JW, Bos AT, Aarts JM, Denison MS, Brouwer A. Inhibition of intercellular communication by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and dioxin-like PCBs in mouse hepatoma cells (Hepa1c1c7): Involvement of the Ah receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 129(2): 283-93.
14. Dingemans MM, de Groot A, van Kleef RG, Bergman A, van den Berg M, Vijverberg HP, Westerink RH. Hydroxylation increases the neurotoxic potential of BDE-47 to affect exocytosis and calcium homeostasis in PC12 cells. *Environ Health Perspect* 2008; 116(5): 637-43.
15. Durgo K, Ćurčić M, Antonijević B, Franekić J, Janković S. Citotoksični efekti određenih kongenera polibromovanih difenil etara. *Knjiga sažetaka 10. kongresa toksikologa Srbije sa međunarodnim učešćem*. Palić, Srbija, 22-25. septembar, 2010: 13.
16. Eriksson P, Fischer C, Fredriksson A. Polybrominated diphenyl ethers, a group of brominated flame retardants, can interact with polychlorinated biphenyls in enhancing developmental neurobehavioral defects. *Toxicol Sci* 2006; 94(2): 302-9.
17. Hallgren S, Darnerud PO. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats – Testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. *Toxicology* 2002; 177(2-3): 227-43.
18. Hamers T, Kamstra JH, Sonneveld E, Murk AJ, Kester MHA, Andersson PL i sar. *In vitro* profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol Sci* 2006; 92:157-73.
19. He P, Wang AG, Xia T, Gao P, Niu Q, Guo LJ, Xu BY, Chen XM. Mechanism of the neurotoxic effect of PBDE-47 and interaction of PBDE-47 and PCB153 in enhancing toxicity in SH-SY5Y cells. *Neurotoxicology* 2009; 30: 10-5.
20. Hua XZ, Xua Y, Huc DC, Hui Y, Yang FX. Apoptosis induction on human hepatoma cells Hep G2 of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209). *Toxicol Lett* 2007; 171: 19-28.
21. Janković S, Ćurčić M, Radičević T, Stefanović S, Lenhardt M, Durgo K, Antonijević B. Non-dioxin-like PCBs in ten different fish species from the Danube river in Serbia. *Environ Monit Assess* 2010; 181(1-4): 153-63.
22. Juarez de Ku LM, Sharma-Stokkermans M, Meserve LA. Thyroxine normalizes polychlorinated biphenyl (PCB) dose-related depression of choline acetyltransferase (ChAT) activity in hippocampus and basal forebrain of 15-day-old rats. *Toxicology* 1994; 94(1-3): 19-30.
23. Kitamura S, Kato T, Iida M, Jinno N, Suzuki T, Ohta S, Fujimoto N, Hanada H, Kashiwagi K, Kashiwagi A. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci* 2005; 76(14): 1589-601.
24. Maurissen E, Fonnum F. Neurochemical targets and behavioral effects of organohalogen compounds: An update. *Crit Rev Toxicol* 2006; 36(3): 253-89.
25. Meerts IATM, Assink Y, Cenijn PH, van den Berg JHJ, Weijers BM, Bergman A i sar. Placental transfer of a hydroxylated polychlorinated biphenyl and effects on fetal

- and maternal thyroid hormone homeostasis in the rat. *Toxicol Sci* 2002; 68(2): 361-71.
26. Messer A. Mini-review: Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants as potential autism risk factors. *Physiol Behav* 2010; 100(3): 245-9.
27. Parka SH, Jangc JH, Chena CY, Nad HK, Surha YJ. A formulated red ginseng extract rescues PC12 cells from PCB-induced oxidative cell death through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1 and glutamate cysteine ligase. *Toxicology* 2010; 278(1): 131-9.
28. Pessah IN, Cherednichenko G, Lein PJ. Minding the calcium store: Ryanodine receptor activation as a convergent mechanism of PCB toxicity. *Pharmacology and Therapeutics*. 2010; 125(2): 260-85.
29. Peters AK, Sanderson JT, Bergman M, van den Berg M. Antagonism of TCDD-induced ethoxyresorufin-O-deethylation activity by polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in primary cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) hepatocytes. *Toxicol Lett* 2006; 164(2): 123-32.
30. Porterfield SP. Thyroidal dysfunction and environmental chemicals-potential impact on brain development. *Environ Health Perspect* 2000; 108(S3): 433-8.
31. Reistad T, Fonnum F, Mariussen E. Neurotoxicity of the pentabrominated diphenyl ether mixture, DE-71, and hexabromocyclododecane (HBCD) in rat cerebellar granule cells *in vitro*. *Arch Toxicol* 2006; 80(11): 785-96.
32. Richardson VM, Staskal DF, Ross DG, Diliberto JJ, DeVito MJ, Birnbaum LS. Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 226(3): 244-50.
33. Royland JE, Wu J, Zawia NH, Kodavanti PRS. Gene expression profiles in the cerebellum and hippocampus following exposure to a neurotoxicant, Aroclor 1254: Developmental effects. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 231(2): 165-78.
34. Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol* 1990; 21(1): 51-88.
35. Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 1994; 24(2): 87-149.
36. Shen K, Shen C, Yu J, Yu C, Chen L, Shi D, Chen Y. PCB congeners induced mitochondrial dysfunction in Vero cells. *J Hazard Mater* 2010.
37. Tseng LH, Li MH, Tsai SS, Lee CW, Pan MH, Yao WJ, Hsu PC. Developmental exposure to decabromodiphenyl ether (PBDE 209): Effects on thyroid hormone and hepatic enzyme activity in male mouse offspring. *Chemosphere* 2008; 70: 640-7.
38. Van den Berg. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2006; 93(2): 223-41.
39. Xing TR, Yong W, Chen L, Tang ML, Wang M, Chen JT, Ruan DY. Effects of Decabrominated Diphenyl Ether (PBDE 209) on Voltage-Gated Sodium Channels in Primary Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Environ Toxicol* 2010; 25(4): 400-8.
40. Yang JM, Salmon AG, Marty MA. Development of TEFs for PCB congeners by using an alternative biomarker – Thyroid hormone levels. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010; 56(2): 225-36.

ENGLISH

TOXICITY MECHANISMS AND INTERACTIONS OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS AND POLYBROMINATED DIPHENYLEETHERS

Biljana Antonijević, Vesna Milovanović, Marijana Ćurčić, S. Janković, Vesna Jačević, Slavica Vučinić

Polychlorinated biphenyls (PCBs) and brominated flame retardants, polybrominated diphenylethers (PBDEs), are widespread environmental contaminants as a result of anthropogenic activities and due to their persistency and resistance to degradation. Both groups of chemicals are placed on the list of persistent organic pollutants (POPs), covered by the Stockholm convention which is aimed to limit or ban the production, use, emission, import and export of POPs in order to protect human health and the environment. Taking into account the structural similarity between PCBs and PBDEs, and the known effects of PCBs, these two groups of chemicals could have similar mechanisms of action. Also, because of real simultaneous exposure to these compounds, an examination of possible interactions is of great importance. Interactions of the compounds from these groups are likely at the system level of hormones, particularly thyroid and reproductive ones. As there are mechanisms of adverse effects of both groups of chemicals on the nervous system, including functional, neurological and behavioral changes, there are influences on neurotransmitters, changes in signal transduction and apoptosis. There are interactions affecting the occurrence of metabolic disorders as well. Data on the toxicity of mixtures of PCBs and PBDEs, as well as interactions of these chemicals would contribute to the processes of risk evaluation and risk characterisation.

Key words: polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenylethers, mechanisms of action, interactions, risk

РУССКИЙ

МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ И ИНТЕРАКЦИИ ПОЛИХЛОРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ И ПОЛИБРОМОВАННЫХ ДИФЕНИЛ ЭФИРОВ

Билjana Антонијевић, Весна Миловановић, Мирjana Чурчић, Саша Јанковић, Весна Јачевић, Славица Вучинић

Полихлорованные бифенилы (ПХБ) и бромованные замедлители горения, полибромованные дифенил эфиры (ПБЭ) широко распространены в среде обитания как следствие антропогенных активностей и благодаря их постоянства и сопротивляемости на деградацию. Обе группы соединений находятся в списке персистентных органических полутанатов (ПОП) принятой Стокгольмской конвенцией с целью запретить или ограничить производство, употребление, эмиссию или ввоз и вывоз токсических субстанций, обозначенных как ПОП с целью охраны здоровья людей и среды обитания. Принимая во внимание структурное сходство между ПБДЭ и ПХБ, словно и факт, что реальная одновременная экспозиция этими соединениями, испытание их интеракций важны для предвидения результирующего эф-

фекта. Познания в области токсикологии смесей, тоже содействуют процессу исчисления и характеристики риска. Интеракции соединений из этих групп вероятные на уровне эндокринной системы, особенно щитовидной и репродуктивной. Имея в виду механизмы токсичности обеих групп субстанций на нервную систему, включая функциональные изменения, неврологические расстройства и изменения в поведении, возможно ожидать их интеракции и на системах нейротрансмиттеров, изменения в переносе сигналов и вызывание апоптоза, словно и явление метаболических расстройств.

Ключевые слова: полихлорованные бифенолы, полибромованные дифенил эфиры, механизмы токсичности, интеракции, риск

OKSIDATIVNI STRES* OXIDATIVE STRESS

Jelka Stevanović, Sunčica Borožan, Tatjana Božić, S. Jović,
Tatjana Đekić, B. Dimitrijević**

Neprekidna potreba za kiseonikom je kontradiktorna sa činjenicom da je on toksičan po sisare. Naime, njegova jednovalentna redukcija može imati za posledicu proizvodnju kratkoživećih, hemijski vrlo aktivnih, slobodnih radikala i nekih neradikalnih agenasa (azot-oksida, superoksid anjon-radikala, hidroksilnog radikala, peroksilnog radikala, singletnog kiseonika, peroksinitrita, vodonik-peroksida, hipohloraste kiseline i dr.). Neosporno je da oni imaju brojne poželjne uloge, ali kada im se proizvodnja pojača toliko da organizam ne može svojim antioksidansima (superoksid dismutaza, glutacion peroksidaza, katalaza, transferin, ceruloplazmin, redukovani glutacion i sl.) da ih ukloni, razvija se serija poremećaja koji se jednim imenom nazivaju „oksidativni stres“.

Reaktivne kiseonične vrste koje karakterišu oksidativni stres su sposobne da napadnu sve glavne klase bioloških makromolekula, odnosno proteine, DNK i RNK molekule, a naročito lipide. Pod uticajem slobodnih radikala dolazi do peroksidacije lipida ćelijskih membrana, oksidativnih oštećenja DNK i RNK molekula, razvoja genetskih mutacija, fragmentacije i promene funkcije najrazličitijih proteinskih molekula. Sve to ima za posledicu: narušavanje propustljivosti ćelijskih membrana, poremećaja ćelijske signalizacije i homeostaze jona, smanjenja ili gubitka funkcija oštećenih proteina i sl. Zato se slobodni radikali, koji se oslobađaju tokom oksidativnog stresa, smatraju patogenim agensima mnogih bolesti i starenja. Koja vrsta oštećenja će se desiti i kada, zavisi od prirode slobodnih radikala, mesta delovanja i njihovog izvora.

Ključne reči: oksidativni stres, peroksidacija lipida, proteini, DNK

* Rad primljen za štampu 01. 02. 2012. godine

** Dr sc. med. vet. Jelka Stevanović, redovni profesor, dr sc. Sunčica Borožan, redovni profesor, dr sc. med. vet. Tatjana Božić, redovni profesor, dr sc. med. vet. Slavoljub Jović, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sci Tatjana Đekić, docent, Prirodno-matematički fakultet, Niš; mr sc. med. vet. Blagoje Dimitrijević, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Uvod / Introduction

Naučni interes za izučavanje oksidativnog stresa potiče još iz 1954. godine, kada su Geršman i saradnici prvi objavili teoriju o slobodnim kiseoničnim radikalima. Oksidativni stres se odnosi na ćelijska oštećenja i patološke promene koji prate neuravnoteženost oksidansa nad antioksidansima u živom organizmu. Obuhvata sve fiziološke i patofiziološke procese tokom kojih dolazi do nagomilavanja slobodnih radikala, što ima za posledicu prevazilaženje kapaciteta antioksidativnih mehanizama, ne samo pojedinačnih ćelija, nego i ekstracelularnih tečnosti i kompletnih tkiva (Adams i sar., 1983; Jenkins, 1988; Sies, 1991).

Neprekidna potreba za kiseonikom u cilju održavanja života, kontradiktorna je sa činjenicom da je on toksičan po sisare (Sen, 1995; Halliwell i Gutteridge 1999; Božić i sar., 2003a; 2003b; 2004; Stevanović i sar., 2005). Naime, njegova jednovalentna redukcija može rezultirati produkcijom reaktivnih međuproizvoda, koji na kraju daju kratkoživeće, hemijski vrlo reaktivne, slobodne kiseonične radikale (ROS-Reactive Oxygene Species) i odgovarajuće neradikalske agense (Halliwell i sar., 1991; Halliwell i Gutteridge, 1999; Valko i sar., 2007; Stevanović i sar., 2011a; 2011b). Neki od njih su: azot-oksidi (NO^*), superoksid anjon-radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal ($^*\text{OH}$), peroksilni radikal (ROO^*), alkoksilni radikal (RO^*) i hidroperoksilni radikal (HO_2^*); zatim singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$), peroksinitrit (ONOO^-), vodonik-peroksid (H_2O_2), hipohlorasta kiselina (HOCl) i ozon (O_3). Slobodni radikali koji se oslobađaju tokom oksidativnog stresa smatraju se patogenim agensima mnogih bolesti i starenja (Harman, 1956; Bucala i Cerami, 1992; Finkel, 2003).

Za razliku od visokih koncentracija slobodnih radikala koje vode u razvoj oksidativnog stresa, koji je preduslov mnogobrojnih patoloških efekata, niske i umerene koncentracije ovih materija igraju višestruke značajne uloge u mnogim intracelularnim reakcijama, kao što su: normalan rast ćelija, održavanje i promena položaja i oblika ćelije, pomoć tokom adaptacije i oporavka ćelija od oštećenja izazvanih fizičkim radom, zatim učešće u programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi), ćelijskom starenju, regulaciji najrazličitijih signalnih puteva, moduliranju snage kontrakcija skeletnih mišića, sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja, proizvodnji energije, indukciji migracije leukocita i stimulaciji antimikrobne aktivnosti fagocitnih ćelija tokom respiratornog praska (Movat, 1985; Halliwell i Gutteridge, 1999; Božić i sar., 2003; 2003a; 2004; Stevanović i sar., 2011a).

Redoks regulacije privlače sve veću pažnju, a posebno kliničara s obzirom na ulogu oksidativnog stresa u patogenezi brojnih bolesti. Patološka stanja pokazuju biološku značajnost redoks regulacija. Fina ravnoteža između povoljnih i štetnih efekata slobodnih radikala je veoma značajana sa gledišta biologije življenja. Nauka o biološkim redoks regulacijama se brzo razvija i ima uticaj na razne discipline, uključujući fiziologiju, ćelijsku biologiju, patofiziologiju i kliničku medicinu.

Oksidativno oštećenje / *Oxidative damage*

Budući da se tokom aerobnog metabolizma neprekidno stvaraju slobodni radikali, oni se moraju stalno i uklanjati, kako bi se održala ravnoteža i izbeglo oštećenje ćelija. Funkciju uklanjanja i inaktiviranja slobodnih radikala u organizmu vrši sistem antioksidativne odbrane. Najvažniji enzimi ove odbrane su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GSH-Px). Superoksid dismutaza neutrališe stvoreni superoksidni radikal, pretvarajući ga u manje toksičan vodonik-peroksid, na koji deluje CAT, razlažući ga na vodu i kiseonik. Glutacion peroksidaza uglavnom deluje na H_2O_2 , uz učešće glutationa kao kopsupstrata (H_2O_2 se metaboliše u vodu, a glutation se u reakciji oksidiše), mada može da razloži i druge hidro i lipidne peroksidge.

Kada prooksidansi nadvladaju navedene mehanizme endogene antioksidativne odbrane organizma reaktivne kiseonične vrste koje se generišu tokom oksidativnog stresa „napadaju“ sve glavne klase bioloških makromolekula (Sen, 1995; Borozan i sar., 2009; 2011; Stevanović i sar., 2011b; Borozan i sar., 2004). Prvu ozbiljniju pretpostavku o štetnim efektima kiseonika i nagoveštaj da su ti efekti verovatno izazvani porastom koncentracije slobodnih kiseoničnih radikala izneo je Gilbert još 1987. godine.

Oštećenja bioloških makromolekula se manifestuju: peroksidacijom lipida ćelijske membrane i membrana unutarćelijskih organela, oksidativnim oštećenjima DNK i RNK molekula, kao i oksidativnim modifikacijama različitih proteina ćelijskih membrana. Peroksidacija membranskih proteina uzrokuje inhibiciju Na^+-K^+ pumpi, opadanje intracelularne pH vrednosti i povećanje volumena ćelije. Narušena biološka svojstva drugih proteinskih molekula (enzima, receptor-skih molekula, transportnih proteina i sl.), nastala kao posledica njihove oksidativne modifikacije, pri čemu se menja konformacija molekula, praćena je i serijom izmenjenih ćelijskih funkcija. Neke od njih su poremećaj signalizacije, usled promenjenog transporta jona kroz membrane ili oštećenja najrazličitijih receptora za hormone, neurotransmitere, citokine i druge signalne molekule. Oksidativno oštećenje DNK i RNK molekula dovodi do mutacija.

Sva pomenuta oštećenja, ponaosob i zajedno, narušavaju integritet ćelija, tako da su povezana sa razvojem nekih bolesti i sa starenjem (Finkel, 2003).

Oksidativno oštećenje membranskih i unutarćelijskih lipida / *Oxidative damage of membrane lipids and intracellular lipids*

Na delovanje slobodnih radikala su otpornije nezasićene masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu nego polinezasićene masne kiseline (PUFA – Poly unsaturated Fatty Acids). S obzirom na to da ćelijske membrane obiluju upravo polinezasićenim masnim kiselinama, na njih lako deluju ROS (Duthie i sar., 1990; Cheeseman i Slater, 1993), što je neminovno praćeno poremećajem

ćelijskih funkcija. Peroksidaciju lipida najčešće uzrokuju vrlo reaktivan hidroperoksilni radikal ($\text{OH}_2^\bullet$) i azot-oksidi ($\text{NO}^\bullet$). Ona ima za posledicu disfunkciju ćelija, a u slučaju jakih oštećenja, i njihovo razaranje (Evereklioglu i sar., 2003; Jović i sar., 2011).

Tokom peroksidacije lipida, iz polinezasićenih masnih kiselina nastaju slobodni lipidni radikali, kao što su: hidroksilni radikal ($\text{OH}^\bullet$), hidroperoksilni radikal ($\text{HO}_2^\bullet$), alkoksiradikal ($\text{RO}^\bullet$) i peroksiradikali ($\text{RO}_2^\bullet$). Svi oni, takođe, mogu oksidovati polinezasićene masne kiseline. Na opisani način se razvija krug grešaka (*Circulus vitiosus*), u kome metabolizam ovih reaktivnih vrsta omogućava dalju proizvodnju slobodnih radikala i, shodno tome, doprinosi pogoršavanju oksidativnog oštećenja (Slater, 1987; Halliwell i Gutteridge, 1999; Evereklioglu i sar., 2003). Tako na primer, peroksidacijom masnih kiselina iz fosfolipida koji ulaze u sastav svih membrana, nastaje i grupa toksičnih jedinjenja, poznata pod imenom izoprostani (izomeri prostaglandina). Smatra se da porast koncentracije F_2 -izoprostana u plazmi ima udela u razvoju hepatorenalnog sindroma (Moore, 2004.), ateroskleroze (Patrignani i Tacconelli, 2005), i neenzimatskih toksičnih oštećenja u plućima (Vacchiano i Tempel, 1994).

Osim mogućnosti za proizvodnju novih slobodnih lipidnih radikala, peroksidacija lipida dovodi i do nastanka novih slobodnih masnih kiselina, posebno polinezasićene arahidonske kiseline (Halliwell i sar., 1991; Evereklioglu i sar., 2003).

U prisustvu jona gvožđa i bakra, lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne razgradne produkte, kao i aktivne radikale. Tako na primer, gvožđe katalizuje peroksidaciju lipida, a iz njegove reakcije sa lipidnim hidroperoksidima (LOOH) nastaju reaktivni lipidni alkoksilni radikali ($\text{LO}^\bullet$), koji dalje učestvuju u produbljivanju oksidacije lipida (Domitrović i sar., 2006).

Najveće promene koje nastaju kao rezultat neprekidnog nastavljanja samoodržavajuće lančane reakcije peroksidacije lipida su razaranja PUFA. S obzirom na to da peroksidacija lipida oštećuje funkciju membrana, razlaganjem njihovih polinezasićenih masnih kiselina i nastankom citotoksičnih metabolita lipidnih peroksida (Pizato i sar., 2005; Domitrović i sar., 2006), opada fluidnost membranskih lipida. Istovremeno dolazi do prelaska stvorenih reaktivnih aldehida prvo u citosol, a zatim, i do svih ćelijskih delova koje takođe oštećuju. Reakcija se tu ne zaustavlja, već reaktivni aldehidi, difunduju u međućelijsku tečnost i raznose se po organizmu oštećujući i druge ćelije. To objašnjava sposobnost ROS da izazivaju oštećenja, ne samo na mestu svoje pojačane produkcije, autokrino/parakrino, već i na drugim mestima u organizmu (Matsuo i Kaneko, 2000; Close i sar., 2005).

Na delovanje slobodnih radikala su posebno osetljivi tkivo centralnog nervnog sistema i eritrociti (Clemens i Waller, 1987; Borozan i sar., 1995; 2004). Razlog je obilje polinezasićenih slobodnih masnih kiselina u njihovoj plazminoj membrani, kao i visoka koncentracija potencijalno snažnih pokretača oksidativnih procesa – kiseonika i hemoglobina u eritrocitima. Čak i pod normalnim uslovima,

eritrociti su izloženi slobodnim radikalima, koje sami proizvode ili ih preuzimaju od drugih ćelija, dok cirkulišu. Oni su posebno značajne mete oksidativnog oštećenja tokom pojačanog fizičkog angažovanja organizma. Međutim, ne treba gubiti iz vida da eritrociti, isto kao i ostale ćelije organizma, sadrže složen antioksidativni odbrambeni sistem. On obuhvata antioksidativne enzime, poput katalaze, superoksid dismutaze i glutathion peroksidaze, kao i neenzimske antioksidanse, kao što su tokoferol, askorbat, urat i glutathion (Popović i sar., 2011a; 2011b; Stevanović i sar., 2011b).

Peroksidacija membranskih lipida nije jedina štetna posledica delovanja slobodnih radikala, već se pod uticajem nekih njenih proizvoda provocira oštećenje i drugih ćelijskih molekula i struktura. Tako, pod fiziološkim uslovima, proizvodi peroksidacije lipida (hidroksialkenali) pokazuju afinitet prema amino grupama koje se nalaze u bazama DNK molekula i proteinima, imaju afinitet prema ostacima lizina, a u fosfolipidima prema fosfatidil-serinu i fosfatidil-etanol-aminu. Isto tako pokazuje i određenu selektivnost prema tiolnoj (Cys34-SH) grupi albumina, gradeći kovalentne tioetarske veze za koje je dokazano da su skupljači hidroksilnog radikala. Hidroksialkenal i 4-hidroksinonenal (HNE), koji su proizvod peroksidacije ω -6 PUFA izrazito su toksični u većim količinama, zato što inhibiraju ćelijski rast i modifikuju lipoproteine, tako da podstiču razvoj ateroskleroze (Leonarduzzi i sar., 2005; Popović i sar., 2011b).

Oksidativno oštećenje ćelijskih proteina i DNK molekula /

Oxidative damage to cellular proteins and DNA molecules

Oksidativno oštećenje ćelijskih proteina, izazvano slobodnim radikalima, podrazumeva seriju promena najrazličitijih proteinskih molekula. Neke od njih su: modifikacija aminokiseline, izmena sekundarne i tercijerne strukture proteina, indirektno oštećenje proteina aktivacijom proteolitičkih enzima pomoću hipohloraste kiseline i oksidativna oštećenja proteina produktima peroksidacije lipida.

Značajan vid sekundarne oksidacije proteina je razvoj karbonilnog stresa. Naime, oksidativnim razlaganjem proteina obrazuju se peptidi čije su N-terminalne aminokiseline blokirane α -ketoacilnim proizvodima. U sastavu proteina nalaze se aminokiseline: lizin, arginin, prolin i treonin, čijom oksidacijom mogu nastati karbonilni derivati (Baynes, 1991). Pored toga karbonilne grupe mogu biti uvedene u molekul proteina reakcijom sa aldehidima (malondialdehid), koji se sintetiše tokom lipidne peroksidacije ili sa reaktivnim karbonilnim derivatima (npr. ketoamini i ketoaldehidi). Ova jedinjenja se stvaraju u reakciji redukujućih šećera (glukoza) ili njihovih oksidacionih proizvoda sa lizinskim ostacima u proteinima (glikozilovanje). Iz tog razloga se prisustvo karbonilnih grupa u proteinima koristi kao marker proteinske oksidacije uzrokovane reaktivnim kiseoničnim vrstama. Ovi proizvodi su štetni jer menjaju konformaciju proteina, što se neminovno odražava i na njihove funkcije. Tako je ustanovljeno da je oksidacija proteina koju

procenjujemo na osnovu prisustva karbonilnih grupa povezana sa starenjem, oksidativnim stresom i brojnim bolestima (Xu i sar., 2000; Singh i sar., 2001; Leonar-duzzi i sar., 2005; Singh i Ishwarlal, 2006).

Jedna od promena biološke funkcije proteina je i izmena propustljivosti ćelijskih membrana, usled promenjene aktivnosti njihovih enzimskih struktura (npr. Na-K/ATP-aze), poremećaja funkcije transportnih proteina i sl. Sve ovo vodi u narušavanje različitih vidova ćelijske signalizacije i homeostaze jona. Tako, agregacija receptorskih proteina, koja je izazvana delovanjem slobodnih radikala, ima za posledicu njihovu inaktivaciju i nemogućnost prenošenja signala u ćeliju. Istovremeno, inaktivacija jonskih kanala menja polarnost plazmine membrane i, samim tim, narušava prenos signalnih biostruja. Nažalost, ovim se krug oštećenja ne završava, već se nastavlja, tako što nespecifična propustljivost za jone, posebno za Ca^{2+} , dalje destabilizuje biomembrane, aktivacijom kalcijum-zavisnih proteaza, uključujući i fosfolipazu A_2 (PLA_2). Njeno oslobađanje inicira kaskadne reakcije koje vode u proizvodnju sporednih produkata peroksidacionih procesa (lipidnih posrednika i neuropeptida) koji dalje pogoršavaju situaciju i mogu dovesti do propadanja kompletne ćelije (Slater, 1987; Halliwell i Gutteridge, 1999; Stevanović i sar., 2005; 2010).

Tokom oksidativnog stresa, lipidnom peroksidacijom, formira se malondialdehid koji se hemijski vezuje za molekule DNK. Time se DNK oštećuje pa je onemogućeno odvijanje biohemijski kompletne replikacije, kako bi se dobila normalna ćelija. Usled oksidativnih oštećenja molekula DNK može doći i do odvajanja i cepanja njenih lanaca ili hidrosilovanja konstitutivnih baza. Sva navedena oštećenja mogu da završe mutacijama ili mutagenezom (Valko i sar., 2007). Ove promene su praćene i nemogućnošću popravke DNK, koja je svojstvena zdravim ćelijama pod normalnim uslovima, tako da se mogu stvoriti uslovi i za kancerogenezu.

Osim jedarne DNK, oksidativnim oštećenjima je izložena i mitohondrijska DNK (MtDNK). To se dešava iz nekoliko razloga. Prvenstveno su to: blizina MtDNK izvoru generisanja ROS (unutrašnjoj membrani mitohondrija), nedostatak zaštitnih proteina sličnih histonima i veoma oskudna aktivnost DNK molekula u smislu popravke izmenjenih delova (Clayton, 1984). Oštećenja MtDNK konačno dovode do redukovanja mitohondrijske transkripcije i sinteze RNK, a time i do gubitka funkcije (Wallace, 1999; Ballinger i sar., 2000).

Zaključak / Conclusion

Kada proizvodnja slobodnih radikala nadvlada mehanizme antioksidativne odbrane organizma razvija se serija poremećaja, poznatih kao „oksidativni stres“. Reaktivne kiseonične vrste koje karakterišu oksidativni stres (superoksid anjon-radikal, hidroksilni radikal, vodonik-peroksid, azot-oksidi, peroksinitrit i dr.) su sposobne da napadnu sve glavne klase bioloških makromolekula, od-

nosno proteine, DNK i RNK molekule, a naročito oštećuju lipide. Tako, pod uticajem slobodnih radikala dolazi do peroksidacije lipida ćelijskih membrana, oksidativnih oštećenja DNK i RNK molekula, kao i do poremećaja ili prestanka funkcije najrazličitijih proteinskih molekula. Sve to ima za posledicu: narušavanje propustljivosti ćelijskih membrana, poremećaj najrazličitijih vidova ćelijske signalizacije i homeostaze jona, smanjenje ili prestanak funkcije oštećenih proteina, razvoj genskih mutacija i sl. Opisane promene remete funkcionisanje ćelije toliko da mogu čak dovesti u pitanje njen opstanak. Zato se slobodni radikali, koji se oslobađaju tokom oksidativnog stresa, smatraju patogenim agensima mnogih bolesti i starenja. Koja vrsta oštećenja će se desiti i kada zavisi od prirode slobodnih radikala, mesta delovanja i njihovog izvora.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENTS:

Ovaj rad je deo naučno istraživačkih projekata u oblasti osnovnih istraživanja, evidencioni broj: 173034, 175061 i 31085, finansiranih od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. /

This work is a part of scientific research projects in the area of elementary investigations listed under numbers 173034, 175061 and 31085, financed by the Ministry for Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Adams JD, Lauterberg BH, Mitchell JR. Plasma glutathione and glutathione disulphide in the rat: Regulation and response to oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 227: 749-54.
2. Ballinger S, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Runge MS. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 86: 960-6.
3. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40(4): 405-12.
4. Borozan S, Gađanski-Omerović G, Stajković S. Effects of ionizing radiation on antioxidant system in human erythrocytes. *Cent Eur J Occup Environ Health* 2004; 10(1): 12-7.
5. Borozan S, Gopčević K, Jović S, Gojgić-Cvijović G. Oxidative damage of human plasma proteins induced by benzene. 12th EuCheMS International Conference on Chemistry and Environment. Stockholm University, Stockholm, Sweden, 14-17 June, 2009: Tox 36.
6. Borozan S, Ivanović S, Mičić M, Dimitrijević B, Zicari M, Katić-Radivojević S, Čupić V. Paraoxonase activity, oxidative stress and toxic effects of diazinon in rats, *Toxicology Letters* 2011; 219.
7. Borozan S, Stojanović S, Djurdjić V. The influence of selenium on the erythrocyte metabolism in rats exposed to toluene. II Antioxidative response to oxidative stress, *Metal Elements in Environment. Medicine and Biology* 1995; 253-7.
8. Božić T, Stevanović J, Kovačević M, Jović S, Lukić S, Petakov M, Borozan S, Mijačević Z, Knežević M, Bulajić S. Toluene mediated oxidative stress and granulomonocitopoiesis. *Acta Vet* 2003a; 53(4): 201-10.

9. Božić T, Stevanović J, Kovačević-Filipović M, Borožan S, Popović D, Todorović D. Possible effects of depleted uranium (du): changes in cellular and biochemical values in peripheral blood of ruminants in exposed areas. *Cent Eur J Occup Environ Med* 2003b; 9(4): 267-71.
10. Božić T, Stevanović J, Popović D, Vlaški M, Fišter S, Kovačević-Filipović M. Possible health effects of depleted uranium (du): examination of peripheral blood of ruminants in exposed areas. 22nd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology. Olsztyn, Poland, 15-18 Sept, 2004: 56.
11. Bucala R, Cerami A. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol* 1992; 23: 1-34.
12. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-93.
13. Clayton D. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu Rev Biochem* 1984; 53: 573-94.
14. Clemens MR, Waller HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids* 1987; 45(2-4): 251-68.
15. Close GL, Ashton TA, McArdle A, MacLaren DP. The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2005; Part A 142: 257-66.
16. Domitrović R, Tota M, Milin Č. Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron. *Biol Trace Elem Res* 2006; 113(2): 177-91.
17. Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC. Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys* 1990; 282(1): 78-83.
18. Evereklioglu C, Hamdi E, Doganay S, Cekmen M, Turkoz Y, Otlu B, Ozerol E. Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Documenta Ophthalmologica* 2003; 106: 129-36.
19. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15: 247-54.
20. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WQ. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 1954; 119: 623-6.
21. Gilbert IA, Fouke JM, Mcfadden ER. Heat and water flux in the intrathoracic airways and exercise-induced asthma. *Journal of Applied Physiology* 1987; 63: 1681-91.
22. Halliwell B, Kaur H, Ingelman-Sundberg M. Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: a cautionary note. *Free Radic Biol Med* 1991; 10(6): 439-41.
23. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, Oxford 1999: 140-84.
24. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
25. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-70.
26. Jović S, Stevanović J, Borožan S, Trailović D. The development of oxidative stress in different types of physical activities of racehorses. Proceedings the thirteen regional symposium in animal clinical pathology and therapy Clinica Veterinaria. Subotica, Serbia, 16-18 Jun 2011: 97-102.
27. Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(11): 1044-9.

28. Matsuo M, Kaneko T. In: Radak Z (Ed.). The Chemistry of Reactive Oxygen Species and Related Free Radicals, Human Kinetics. Leeds, 2000: 1-34.
29. Moore K. Isoprostanes and the liver. Chem Phys Lipids 2004; 128(1-2): 125-33.
30. Movat HZ. The inflammatory Reaction. Amsterdam, Oxford: Elsevier Scientific Publications, 1985.
31. Patrignani P, Tacconelli S. Isoprostanes and other markers of peroxidation in atherosclerosis. Biomarkers 2005; 10(Suppl 1): 24-9.
32. Pizato N, Bonatto S, Yamazaki RK, Aikawa J, Nogata C, Mund R, Nunes EA, Piconcelli M, Naliwaiko K, Curi R, Calder PC, Fernandes LC. Ratio of ω -6 to ω -3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. Nutr Cancer 2005; 53(2): 194-201.
33. Popović T, Borozan S, Arsić A, Debeljak-Martačić J, de Luka S, Milovanović IA, Trbović A, Glibetić M. Effects of omega-3 supplementation on plasma phospholipid fatty acids profile and liver phospholipid fatty acids profile in aged wistar rats. Croatica Chemica Acta, 2011b; 84(1): 73-9.
34. Popović T, Borozan S, Arsić A, Martačić JD, Vučić V, Trbović A, Mandić L, Glibetić M. Fish oil supplementation improved liver phospholipids fatty acid composition and parameters of oxidative stress in male wistar rats. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2011a.
35. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. J Appl Physiol 1995; 79(3): 675-86.
36. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med 1991; 91: 31S-8S.
37. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. Diabetologia 2001; 44: 129-46.
38. Singh U, Ishwarlal J. Oxidative Stress and Metabolic diseases. Pathophysiology 2006; 13(3): 129-42.
39. Slater TF. Free radicals and tissue injury: fact and fiction. Br J Cancer Suppl 1987; 8: 5-10.
40. Stevanović J, Borozan S, Jović S, Ignjatović I. Antioksidativna odbrana. Vet glasnik 2011b; 58(3-4): 247-56.
41. Stevanović J, Borozan S, Jović S, Ignjatović I. Fiziologija slobodnih radikala. Vet glasnik 2011a; 58(1-2): 43-54.
42. Stevanović J, Borozan S, Jović S, Trailović D. Oxidative stress in racing horses. Horseville Science and Profession, First Regional Symposium „Breeding, re-production and health care horses”. Novi Sad, Serbia, 1-3 October 2010: 77-84.
43. Stevanović J, Kovačević-Filipović M, Vlaški M, Popović D, Borozan S, Jović S, Božić T. A study on oxidative stress and peripheral blood parameters of cows bred in the area exposed to depleted uranium ammunition. Acta Vet 2005; 55(4): 269-78.
44. Vacchiano CA, Tempel GE. Role of nonenzymatically generated prostanoid, 8-iso-PGF2 alpha, in pulmonary oxygen toxicity. J Appl Physiol 1994; 77(6): 2912-7.
45. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. Int J Biochem and C Biol 2007; 39: 44-84.
46. Wallace D. Mitochondrial diseases in man and mouse. Science 1999; 283(5407): 1482-8.

47. Xu J, He L, Ahmed SH, Chen SW, Goldberg MP, Beckman JS, Hsu CY. Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. Stroke 2000; 31: 1744-51.

ENGLISH

OXIDATIVE STRESS

Jelka Stevanović, Sunčica Borozan, Tatjana Božić, S. Jović, Tatjana Đekić, B. Dimitrijević

The unceasing need for oxygen is in contradiction to the fact that it is in fact toxic to mammals. Namely, its monovalent reduction can have as a consequence the production of short-living, chemically very active free radicals and certain non-radical agents (nitrogen-oxide, superoxide-anion-radicals, hydroxyl radicals, peroxy radicals, singlet oxygen, peroxynitrite, hydrogen peroxide, hypochlorous acid, and others). There is no doubt that they have numerous positive roles, but when their production is stepped up to such an extent that the organism cannot eliminate them with its antioxidants (superoxide-dismutase, glutathione-peroxidase, catalase, transferrin, ceruloplasmin, reduced glutathion, and others), a series of disorders is developed that are jointly called „oxidative stress.“

The reactive oxygen species which characterize oxidative stress are capable of attacking all main classes of biological macromolecules, actually proteins, DNA and RNA molecules, and in particular lipids. The free radicals influence lipid peroxidation in cellular membranes, oxidative damage to DNA and RNA molecules, the development of genetic mutations, fragmentation, and the altered function of various protein molecules. All of this results in the following consequences: disrupted permeability of cellular membranes, disrupted cellular signalization and ion homeostasis, reduced or loss of function of damaged proteins, and similar. That is why the free radicals that are released during oxidative stress are considered pathogenic agents of numerous diseases and ageing. The type of damage that will occur, and when it will take place, depends on the nature of the free radicals, their site of action and their source.

Key words: oxidative stress, lipid peroxidation, proteins, DNA

РУССКИЙ

ОКСИЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Елка Стеванович, Сунчица Борозан, Татьяна Божич, С. Йович, Татьяна Джекич, Б. Димитриевич

Непрерывная нужда для кислородом противоречивая с фактом, что он токсический за млекопитающими. А именно, его одновалентная редукция может иметь своим последствием производство короткоживущих, химически очень активных, свободных радикалов и некоторых нерадикальных агентов (азота окись, супер-окись-анион-радикала, гидроксильного радикала, пероксильного радикала, синглетного кислорода, пероксинитрита, водород-пероксида, гипохлористой кислоты и

пр.). Бесспорно, что они имеют численные желательные роли, но когда им производство усилится столько, что организм не может своими антиоксидантами (супер-окись-дисмутаза, глутатион-пероксидаза, каталаза, трансферин, церулоплазмин, редуцированный глутатион и т.п.) их убрать, развивается серия расстройств, которые одним именем называются "окислительный стресс".

Реактивные кислородные виды, характеризующие окислительный стресс способны напасть все главные классы биологических макромолекул, то есть протеинов ДНК и РНК молекул, а особенно липидов. Под влиянием свободных радикалов приходит до перокисления липидов клеточных мембран, окислительных повреждений ДНК и РНК молекул, развития генетических мутаций, фрагментации и изменения функции самых различных протеиновых молекул. Всё это имеет своим последствием: нарушение проницаемости клеточных мембран, расстройств клеточной сигнализации и гомеостаза ионов, уменьшения или потери функций повреждённых протеинов, и т.п. Потому свободные радикалы освобождаемые в течение окислительного стресса, считаются патогенными агентами многих болезней и старения. Который вид повреждения случится и когда, зависит от природы свободных радикалов, места действованиия и их источника.

Ключевые слова. окислительный стресс, перокисление липидов, протеины, ДНК

HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE MEKIH TKIVA POSLE IMPLANTACIJE BIOKERAMIČKIH MATERIJALA I PROCENA BIOKOMPATIBILNOSTI*

HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOFT TISSUE AFTER IMPLANTING BIOCERAMICAL MATERIALS AND ESTIMATION OF BIOCOMPATIBILITY

**Danica Marković, Anita Radovanović, Milica Kovačević-Filipović,
Jelena Francuski, Vera Todorović****

Histološko ispitivanje reakcije mekih tkiva u odnosu na biomaterijal je davno ustanovljena metoda procenjivanja biokompatibilnosti. To je istovremeno i veoma važna metoda koja je primenjiva na sve oblike biomaterijala, bilo da su namenjeni za kontakt sa mekim tkivom ili ne, ali i metoda koja ima ograničeni značaj za predviđanje kliničkih performansi. Rasprostranjenost korišćenja ove metode proizilazi iz činjenice da je potkožna ili intramuskularna implantacija potencijalnog biomaterijala na životinje jednostavna, a dalja ispitivanja reakcije osnovnog i susjednih tkiva su u principu jednostavan skrining test za određivanje iritacije tkiva i interakcije tkiva i biomaterijala.

Skrining tehnike (testovi procenjivanja) uključuju implantaciju materijala na različitim lokalizacijama, kao i različite načine obrade tkiva, primenu imunohistohemijskih metoda bojenja, transmisione, skening i konfokalne mikroskopije i primenu drugih sofisticiranih metoda u obradi i interpretaciji podataka.

Interakcija mekog tkiva sa biokeramikom i procena tkivnog i ćelijskog prikaza u procesu inflamacije i imunološkom odgovoru prvi je korak u određivanju njihove biokompatibilnosti.

*Ključne reči: biokeramika, biokompatibilnost, histologija,
regenerativna medicina*

* Rad primljen za štampu 12. 12. 2011. godine

** Dr sc. med. vet. Marković Danica, asistent, dr sc. med. vet. Radovanović Anita, docent, Katedra za histologiju i embriologiju; dr sc. med. vet. Milica Kovačević-Filipović, vanredni profesor, Katedra za patofiziologiju; Francuski Jelena, dipl. vet. doktorant, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sc med. Todorović Vera, profesor, Stomatološki Fakultet, Pančevo, Univerzitet privredna akademija, Novi Sad

Uvod / Introduction

Procenjeno je da godišnje više od milion bolesnika širom sveta ima potrebu za medicinskim tretmanom zbog koštano-zglobnih oboljenja, a zbog produženja životnog veka i povećane fizičke aktivnosti savremenog čoveka, smatra se da će se taj broj uskoro povećati na 10% ljudske populacije. Bez transplantacije tj. nadoknade kosti, danas se ne može zamisliti rad u oblasti rekonstruktivne, ortopedske i kraniofacijalne hirurgije, spinalne artrodeze i dentalne implantologije (Ozbas i sar., 2003; Zerbo i sar., 2005; Zaffe i sar., 2005; Danilović i sar., 2007; Le Nichouannen i sar., 2007; Vitala i sar., 2009).

Veliki napredak u nauci o materijalima i biologiji matičnih ćelija (Kovačević-Filipović i sar., 2011) omogućio je da se postupkom tkivnog inženjerstva, kombinacijom matičnih ćelija koje mogu da se diferenciraju u osteoblaste i umnože *ex vivo* u bioreaktorima i sintetskih trodimenzionalnih nosača, uključujući i one napravljene na bazi kalcijum-fosfatne biokeramike, u uslovima *in vitro* dobije adekvatan ekvivalent kosti i hrskavice (Vunjak-Novaković i sar., 2002; Guo i sar., 2006; Le Nihouannen i sar., 2007; Xu i sar., 2008; Macchetta i sar., 2009). Danas su u tkivnom inženjerstvu poznate tri strategije putem kojih se od sopstvenih matičnih ćelija iz koštane srži pacijenta može dobiti autologi osteogeni kalem. Prva mogućnost je da se ćelije izolovane iz koštane srži polože na sintetski nosač i brzo implantiraju u koštani defekt (Malard i sar., 2005). Kod druge mogućnosti, izolovane ćelije koštane srži kultivisu se u toku 1-2 nedelje u cilju izolacije mezenhimalnih matičnih ćelija, koje se potom postavljaju na sintetski nosač i neposredno nakon toga implantiraju (Arinzeh i sar., 2005). Treća strategija sastoji se u uzimanju koštane srži, izolaciji iz nje i ekspanziji osteoprogenitornih ćelija u toku 1-2 nedelje, nakon čega sledi njihovo postavljanje na sintetski nosač, gde se kultivisu u toku sledeće 2 nedelje, što dovodi do formiranja koštanog sloja na sintetskom nosaču, a tek potom se ovakav hibrid transplantira istom pacijentu/životinji (Maccacci i sar., 2007).

Mogućnosti korišćenja matičnih ćelija, sa biomaterijalom ili bez njega, još uvek su u najvećem delu u eksperimentalnoj fazi istraživanja, gde je nužno odrediti njihove osnovne biološke karakteristike (Kovačević-Filipović i sar., 2007). Veoma je vazno utvrditi i mogućnosti njihove konzervacije (Kovačević-Filipović i sar. 2008), pre nego se one deklarišu kao bezbedne za kliničku upotrebu.

Biokompatibilnost / Biocompatibility

Utvrđivanje biokompatibilnosti je bitna stepenica u nauci o biomaterijalima. S obzirom na specifičnost svakog materijala i njegovog pojedinačnog uticaja na živu materiju, biokompatibilnost se uvek definiše i prilagođava pojedinačnim slučajevima. Postoji nekoliko ravnopravno prihvaćenih definicija biomaterijala. Jedna od njih je „**biomaterijal** je neživa materija korišćena u medicinskim napravama, namenjena da reaguje sa biološkim sistemom“, a „**biokompatibil-**

nost je mogućnost materijala da pokaže karakterističnu reakciju u određenoj primeni“ (Williams, 1986).

Prva testiranja biokompatibilnosti bila su tzv. skrining testiranja (testovi procenjivanja). Skrining testovi mogu da se koriste za procenu podobnosti primene materijala sa gledišta biokompatibilnosti i tada se niz jednostavnih i standardizovanih postupaka sprovode *in vitro* ili *in vivo* testovima (Marković, 2011). Druga funkcija ovih testova je *in vivo* evaluacija koja opisuje promene u tkivima indukovane biomaterijalima, ali i uticaj tkiva na materijale, a isto tako i *in vitro* ponašanje materijala u simuliranim fiziološkim uslovima u odnosu na okolinu ili pojedine njene komponente.

Biomaterijal – biokeramički materijali hidroksiapatit (HAP) i trikalcijumfosfat (TCP) / *Biomaterial-Bioceramic material hydroxyapatite (HAP) and tricalciumphosphate (TCP)*

Hidroksiapatit je kao veštački zamenik za koštani kalem najčešće upotrebljavan i najbolje proučen polikristalni kalcijum-fosfatni keramički mineral. Već je istaknuto da kost odraslih osoba sadrži 60–70% kalcijum-fosfata u odnosu na suhu masu. HAP je glavni sastojak mineralne koštane supstance skeletnog sistema kod vertebrata, u koju je inkorporisan organski matriks.

U kostima se minerali HAP indirektno vezuju za kolagen preko nekolagenih proteina, kao što su osteokalcin, osteopontin ili osteonektin. Ovi nekolageni proteini čine 3–5% mase kosti i predstavljaju aktivna mesta mineralizacije, ali i vezivanja ćelija (Šupova, 2009).

Poznato je da je sintetski HAP apsolutno biokompatibilan, netoksičan i osteokonduktivan. Međutim, iako je HAP bioaktivan, on u *in vivo* uslovima pokazuje sporu osteokondukciju. Stoga je u poslednjoj dekadi usmerena pažnja na proizvodnju visokoporoznog HAP/TCP u vidu blokova ili granula, koji će imati sposobnost da bolje indukuje urastanje kosti, stvori prisniji kontakt sa okolnim tkivom i pojača osteoindukciju. (Hsu i sar., 2007; Macchetta i sar., 2009).

U cilju reparacije koštanog defekta, tj. stimulacije regeneracije i reparacije, postupkom **tkivnog inženjerstva** moguće je kombinovati ćelije koje imaju osteogeni potencijal (mezenhimalne adultne matične ćelije) i odgovarajuće nosače. Naime, dokazano je da ukoliko se HAP, kao i TCP ili BCP kombinuju sa ćelijama koštane srži, dolazi do razvoja osteogeneze na heterotopičnom mestu (npr. u supkutisu ili u mišiću) (Zhang i sar., 2005).

Veoma ohrabruju prvi klinički podaci o uspešnoj primeni mezenhimalnih matičnih ćelija poreklom iz koštane srži i nosača od makroporozne hidroksiapatitne keramike u dugotrajnom lečenju pacijenata sa velikim koštanim defektima dijafize. Već je u ranijem tekstu istaknuto da kod ovih pacijenata nisu primećene rane ni pozne postoperativne komplikacije, a sedmogodišnje praćenje je pokazalo da postoji dobra integracija implanta i da nema fraktura u zoni implantacije (Marcacci i sar., 2007). Takođe, pokazana je uspešna primena kombinovanja hu-

manih mezenhimalnih matičnih ćelija (hMSC) sa keramičkim nosačem od BCP, u kombinaciji 60% HAP – 40% TCP, u lečenju velikih koštanih defekata. Međutim, u ovim slučajevima je nemoguća potpuna reparacija zbog lošeg remodelovanja materijala od HAP/TCP. Studija Arinze i sar. (2005) na mišjem ektopičnom modelu je pokazala da kombinacija 20% HAP – 80% TCP indukuje osteogenu diferencijaciju hMSC *in vivo* sporije u odnosu na druge kombinacije materijala, a da u *in vitro* uslovima stimuliše osteogenu diferencijaciju ovih ćelija determinacijom ekspresije osteokalcina. Međutim, rezultati drugih studija su pokazali da u uslovima *in vitro* direktna interakcija hMSC i partikula BCP ili hidroksiapatita siromašnog u kalcijumu, čija je veličina takva da mogu da se fagocituju, inhibira sazrevanje osteoblasta, putem modifikacije koncentracije solubilnih faktora u medijumu, pre svega jona Ca^{2+} , koji iz medijuma ulazi u hMSC (Saldana i sar., 2008).

U novije vreme razvijena je nova biokeramika – kalcijum fosfatni cement, tj. α TCP (Janačković i sar., 2003; Jokić i sar., 2007). Ovaj cement je dobijen modifikovanom hidrotermalnom metodom, pa osim α TCP sadrži i malu količinu kalcijum-hidroksiapatita, kao zaostale faze, koja može da deluje kao centar stvaranja novog HAP. U svakom slučaju, HAP/ α -TCP jedinjenje utiče na bržu regeneraciju kosti od samog HAP (Jokić i sar., 2007).

Za razliku od β -TCP koji je dobro poznat kao bioaktivni i biodegradibilni materijal u koštanoj regeneraciji (Chazono i sar., 2004; Jensen i sar., 2006; Ni i sar., 2009), α -TCP je slabo proučen materijal (Durukan i Brown, 2000; Marković i sar 2009 b).

Standard / Standard

U prekliničkim eksperimentalnim istraživanjima na pacovima primenjene su preporuke Međunarodne organizacije za standardizaciju – Biološke evaluacije biološke opreme (ISO 10993), pre svega odeljak ISO 10993-6, **za lokalne efekte** posle implantacije (ANSI/AAMI), kao i ISO 10993-10, uz određene modifikacije (tabela 1). Na taj standardizovan način je procenjen tzv. iritacioni indeks (tabela 2). Međutim, osim ovog standarda za histološku procenu biokompatibilnosti koriste se i druge metode (imunohistohemijske, stereološke i morfolometrijske, automatska kompjuterizovana obrada podataka) (Marković, 2009c; 2011) uz pomoć kojih se na precizan način određuje stepen inflamatornog/imunološkog odgovora, angiogeneze i reparativnih procesa.

Tabela 1. Semikvantitativna procena histoloških promena u koži pacova s implantatom /
Table 1. Semiquantitative evaluation of histological changes in skin of rats with implants

Reakcija / <i>Reaction</i>	Numeričko ocenjivanje / <i>Numerical evaluation</i>
Epitel / <i>Epithelium</i> normalni, intaktni / <i>normal, intact</i> ćelijska degeneracija ili stanjivanje / <i>cellular degeneration or thinning</i> metaplazija / <i>metaplasia</i> fokalna erozija / <i>focal erosion</i> generalizovana erozija / <i>general erosion</i>	 0 1 2 3 4
Leukocitna infiltracija / <i>Leucocyte infiltration</i> (na velikom uveličanju) / <i>(with large magnification)</i> odsutna / <i>absent</i> minimalna (manje od 25 ćelija) / <i>minimal (less than 25 cells)</i> blaga (od 26 do 50 ćelija) / <i>slight (26-50 cells)</i> umerena (od 51 do 100 ćelija) / <i>moderate (51-100 cells)</i> izrazita (preko 100 ćelija) / <i>extreme (more than 100 cells)</i>	 0 1 2 3 4
Vaskularna kongestija / <i>Vascular congestion</i> odsutna / <i>absent</i> minimalna / <i>minimal</i> blaga / <i>slight</i> umerena / <i>moderate</i> izrazita, sa pucanjem krvnog suda / <i>extreme, with burst blood vessel</i>	 0 1 2 3 4
Edem / <i>Oedema</i> odsutan / <i>absent</i> minimalan / <i>minimal</i> blagi / <i>slight</i> umeren / <i>moderate</i> izrazit / <i>extreme</i>	 0 1 2 3 4
Kapsula / <i>Capsule</i> odsutna / <i>absent</i> minimalna / <i>minimal</i> tanka / <i>thin</i> umereno debela / <i>moderately thick</i> debela / <i>thick</i>	 0 1 2 3 4

Tabela 2. Procena iritacionog indeksa kože pacova nakon implantacije biokeramičkog materijala /

Table 2. Evaluation of irritation index in rat skin following implantation of bioceramical material

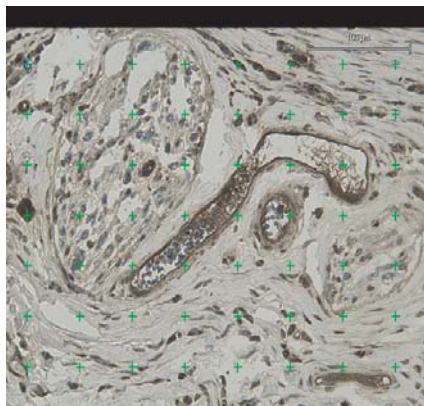
Iritacioni indeks (Iri) / <i>Irritation index (Iri)</i>	
Prosečan odgovor / <i>Average response</i>	Opis odgovora <i>Response description</i>
0	nema / <i>none</i>
1-5	minimalan / <i>minimal</i>
6-10	blag / <i>slight</i>
11-15	umeren / <i>moderate</i>
16-20	snažan / <i>strong</i>

Interakcije ćelija i tkiva sa biokeramikom /

Interaction of cells and tissue with bioceramics

Interakcija ćelija sa biomaterijalima počinje od momenta ugradnje. U prvim minutima već počinju da se adsorbuju proteini na površinu stranog tela i stvaraju proteinski monosloj na većem delu površine. Adhezija proteina se odigrava pre adhezije ćelija na površinu biomaterijala, pri čemu ćelije pre prepoznaju i prihvataju proteine kao podlogu za svoje pričvršćivanje, nego kao pravu površinu biomaterijala. Pošto ćelije specifično odgovaraju na proteine, ovaj međupovršinski proteinski film može biti faktor koji kontroliše narednu bioreakciju na implantatu (Ratner i sar., 2004).

Nakon razmeštanja ćelija na površini implantata, one se mogu diferencirati, umnožavati, komunicirati sa ostalim vrstama ćelija i organizovati u tkiva izgrađena od jedne ili više vrsta ćelija. Ćelije ekstracelularnog matriksa (ECM) luče molekule koji popunjavaju prostore između ćelija i služe kao strukturna veza za proteine i ćelije. Pojavljuju se novoformirani mali krvni sudovi (*angiogenesis*) (Marković, 2009d), a zatim i veći (*vasculogenesis*) kao ključni momenat za ishranu ovog novog tkiva i njihovo širenje na veća područja (slika 1).



Slika 1. *Prikaz merenja volumenske gustine krvnih sudova u vezivnom tkivu ispod kutanog mišića, oko implantiranog hidroksiapatita-HAP*
Imunohistohemija-IHH-eNOS, obeležavanje angiogeneze; x 40

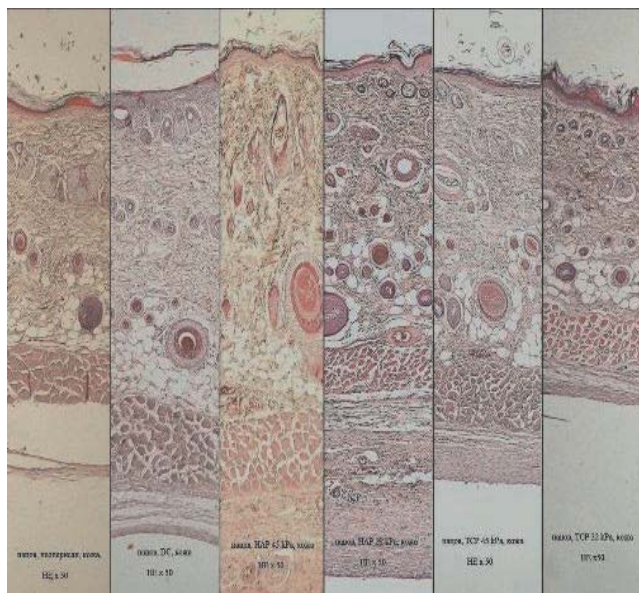
Figure 1. Measurements of volumetric density of blood vessels in connective tissue under cutaneous muscle, around implanted hydroxyapatite-HAP
Immunohistochemistry-IHH-eNOS, marking angiogenesis; x 40

Ovakvo povezivanje ćelija u okviru ECM potpomognuto je preko integrinskih receptora i na taj način je ostvarena kontrola ćelijskog rasta putem mehaničkih sila koje menjaju oblik ćelije vršeći pritisak na citoskelet (Ingber, 2002). Integrinski receptori na površini ćelije olakšavaju ćelijsko pričvršćivanje za supstrate, a posebno one obložene sa ekstracelularnim proteinima fibronektinom i vitronektinom (Schoen, 2004). Ovi receptori prenose biohemijske signale do jezdra aktivacijom istih intracelularnih signalnih puteva koje koriste receptori za faktore rasta. Sposobnost proliferacije direktno zavisi od stepena fizičke raširenosti, a ne od aktuelne površine za vezivanje supstrata. Karakteristike sastava i oblika površinski vezanog ECM za supstrat i svojstva supstrata mogu regulisati interakcije ćelija sa biomaterijalom. Kruti supstrati olakšavaju ćelijsko širenje i rast u

prisustvu solubilnih mitogena. Suprotno tome, fleksibilni skeleti, koji ne mogu pružati otpor citoskeletnim silama, pospešuju ćelijsku retrakciju, inhibišu rast, a pospešuju diferencijaciju (Ingber, 2002).

Lokalne interakcije tkiva sa biomaterijalima dešavaju se na mestu kontakta tkiva sa biomaterijalom i odnose se na efekte materijala na tkiva domaćina i njihovo povezivanje; moguće zapaljenje, moguću toksičnost materijala, probleme u zarastanju rane, infekcije ili mogućnost tumorogeneze. Tkivo, takođe deluje na materijal preko fizičkih efekata (habanje, zamor, korozija, stres-korozivno lomljenje) i bioloških efekata (adsorpcija tkivnih komponenata na implantat, enzimska razgradnja, kalcifikacija) (Shoen, 2004).

Sistemske interakcije tkiva sa biomaterijalima odnose se na opšte reakcije organizma na prisustvo stranog tela. One obuhvataju veliki broj reakcija, od kojih su najvažnije: 1) tromboembolijske reakcije; 2) alergijske reakcije ili reakcije hipersenzibiliteta; 3) povećanje nivoa implantnih elemenata u krvi; i 4) transport implantatnih čestica limfotokom (Shoen, 2004).



Slika 2. Uporedni prikaz kompletnog preseka kože i potkožnih tkiva oko implantata od različitih biokeramičkih materijala

K – kontrolna neoperisana životinja; DC, HAP45, HAP22, TCP45, TCP22 – životinje sa implantatima;
ed – epidermis; d – dermis, hd – hipodermis; km – kutani mišić, vkm – vezivno tkivo ispod kutanog mišića, c – kapsula

Figure 2. Comparative figures of complete section of skin and subcutaneous tissue around implants made of different bioceramical materials

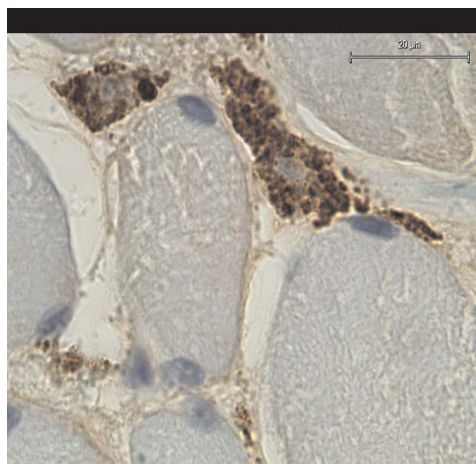
K – control unoperated animal; DC, HAP45, HAP22, TCP45, TCP22 – animals with implants;
ed – epidermis; d – dermis, hd – hypodermis; km – cutaneous muscle, vkm – connective tissue under cutaneous muscle, c – capsule

Pridružene komplikacije interakcija tkiva sa biomaterijalima su prateći elementi ugradnje biomaterijala i predstavljaju mešavinu lokalnih i sistemskih reakcija, koje se mogu pažljivom pripremom i odgovarajućim preventivnim merama svesti na minimum. Najčešće se u praksi susreću sledeće komplikacije: tromboza i/ili tromboembolija; infekcija; neadekvatno zarastanje rane; odbacivanje biomaterijala; sporedne lokalne tkivne reakcije; i sporedni sistemski efekti (Shoen, 2004).

Ćelije u interakciji sa biokeramikom detektovane skeniranjem elektronskom mikroskopijom u našem istraživanju ukazuju na adherirane elemente vezivnog tkiva sa приметnim strukturama kolagenih vlakana i ćelijama koje odgovaraju morfoloiji fibrocita, limfocita, makrofaga i džinovskih ćelija (Marković, 2009a).

Inflamacija i imunološki odgovor / *Inflammation and immunological response*

Specifičan odgovor na strano telo vidno se razlikuje nakon implantacije različitih biokeramičkih materijala i analizira se na histološkim uzorcima (slika 2). Takve specifičnosti su posledica imunološkog odgovora koji počinje stadijumom zapaljenja ili inflamacije, nastavlja se u stadijum zarastanja rane sa učešćem raznih tipova ćelija kao specifičnih indikatora u kojoj fazi oporavka se tkivo nalazi (Todorović, 2008). Neutrofili i mononuklearne ćelije neposredno, nakon adhezije onih proteina, infiltriraju kontaktne površine tkivo-material i pridružuju se akutnom zapaljenju. Već nakon petog-šestog dana ovu ćelijsku postavku udruženu sa edemom tkiva, narušenim integritetom vlakana, i promenama na nivou vaskularne mreže smeniće hronično zapaljenje praćeno smanjenjem broja neutrofila i pojavom monocita koji adheriraju na površinu implantata i diferenciraju se u makrofage. Limfociti takođe postaju dominantni tokom hronične faze zapaljenja. Ukupan broj inflamatornih ćelija opada sa smanjenjem zapaljenskog procesa, dok proces zarastanja rane ide ka stvaranju granulacionog tkiva i fibrozne inkapsula-



Slika 3. CD68+ ćelije u koži i potkožnom tkivu pacova sa implantatom oko trikalcijumfosfata-TCP
Imunohistohemija, IHH, x100.
Zreli makrofazi oko mišićnih vlakana

*Figure 3. CD68+ cells in skin and subcutaneous tissue of rat with implant around tricalciumphosphate - TCP
Immunohistochemistry, IHH, x100.
Mature macrophage around muscle fibres*

cije implantiranog materijala. Mada je formiranje ove kapsule oko stranog tela korisno za implantat, ćelije već adherirane na njegovoj površini mogu u nekim okolnostima prouzrokovati disfunkciju biomaterijala. Ove adherentne ćelije sastoje se od transformisanih monocita u makrofage (slika 3), koji se mogu spojiti u gigantske multinuklearne ćelije, koje koncentrišu degradaciona i fagocitna svojstva težeći da dovedu do fizikohemijskih i strukturnih oštećenja implantata (Saidan i sar., 2003; Schilling i sar., 2004; Rouahi i sar., 2006; Vallés i sar., 2008).

Zaključak / Conclusion

Kalcijumfosfatni biomaterijali (DC/dentalna keramika, α TCP/trikalcijumfosfat i HAP/hidroksiapatit) obrađeni skrining testom pokazuju različite stepene biokompatibilnosti, ali su sve vrednosti dobijene proverom iritacionog indeksa u granicama dozvoljenim standardom i ne dovode do oštećenja tkiva, pa su pogodni za različite kliničke upotrebe u veterinarskoj i humanoj medicini.

U naučno istraživačkom radu i industriji implantata teži se razvijanju brojnih metoda kojima se na minimum svodi korišćenje životinja u eksperimentima. Zbog toga se biokompatibilnost materijala određuje brojnim *in vitro* tehnikama kao i sve razvijenijim matematičkim modelovanjem. Ipak u pretkliničkoj proceni reakcije tkiva i organizma na ugrađeni implantat, histološke karakteristike reakcije tkiva su nezaobilazan korak koji mora da da definitivnu procenu kvaliteta ugrađenog materijala.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Ovaj rad je pripremljen u sklopu projekta 175061. /
This work was prepared within Project 175061

Literatura / References

1. Arinzech TL, Tran T, McAlary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cells-induced bone formation. *Biomaterials* 2005; 26: 3631-8.
2. Chazono M, Tanaka T, Komaki H, Fujii K. Bone formation and bioresorption after implantation of injectable b-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *Int J Biomed Mat Res* 2004; 70: 542-9.
3. Danilovic V, Krsljak E, Lackovic V. Histological evaluation of odontoblast-like cells response after capping application of calcium hydroxide and hydroxiapatite in dogs pulp. *Acta Vet* 2007; 6: 573-84.
4. Durucan C, Brown PW. α -Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature. *J Mater Sci Mater Med* 2000; 11: 365-71.
5. Guo X, Zheng Q, Kulbatski I, Yuan Q, Yang S, Shao Z, Wang H, Xiao B, Pan Z, Tang S. Bone regeneration with active angiogenesis by basic fibroblast growth factor gene transfected mesenchymal stem cells seeded on porous β -TCP ceramic scaffolds. *Biomed Mater* 2006; 1: 93-9.

6. Hsu YH, Turner IG, Miles AW. Mechanical characterization of dense calcium phosphate bioceramics with interconnected porosity. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18: 2319-29.
7. Ingber DE. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Cir Res* 2002; 91: 877-87.
8. Janačković Đ, Janković I, Petrović R, Kostić-Gvozdenović LJ, Milonjić S, Uskoković D. Surface properties of HAP particles obtained by Hydrothermal decomposition urea and calcium-EDTA chelates. *Key Engineering Materials* 2003; 240: 437-40.
9. Jensen SS, Broggini N, Hjørtting - Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and b-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Impl Res* 2006; 17: 237-43.
10. Jokić B, Janković-Castvan J, Veljović Đ, Bučevac D, Obradović-Đuričić K, Petrović R, Janačković Đ. Synthesis and settings behaviour of α -TCP from calcium deficient hydroxyapatite obtained by hydrothermal method. *J Optoelect Adv Mater* 2007; 9: 1904-10.
11. Kovacević-Filipović M, Petakov M, Hermitte F, Debeissat C, Krstic A, Jovcic G, Bugarski D, Lafarge X, Milenkovic P, Praloran V, Ivanovic Z. Interleukin-6 (IL-6) and low O-2 concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (Pre-CSF). *J Cell Physiol* 2007; 212 (1): 68-75.
12. Kovačević-Filipović M, Radovanović A, Francuski J, Božić T. Matične ćelije – fiziološke osnove kliničke primene, Zbornik predavanja XXXIII Seminara za inovacije znanja veterinara, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 18. februar 2011, 79-93.
13. Kovačević-Filipović M, Michel Jeanne, Sizporta M, Vlaski M, Lafarge X, Duchez P, Boiron JM, Praloran V, Ivanovic V. Pozitivan efekat hipoksije i hiperkapnije na kratkotrajnu konzervaciju (4°C) CD34+ ćelija iz produkata citafereze. XIII Hematološki dani "Transplantacija izazov ili neophodnost". Kragujevac, 26. 11. 2008.
14. Le Nihouannen DL, Duval L, Lecomte A, Julien M, Guicheux J, Daculsi G, Layrolle P. Interactions of total bone marrow cells with increasing quantities of macroporous calcium phosphate ceramic granules. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18: 1983-90.
15. Macchetta A, Turner IG, Bowen CR. Fabrication of HA/TCP scaffolds with a graded and porous structure using a camphene-based freeze-casting method. *Acta Material* 2009 (in press); DOI: 10.1016/j.actbio.2008.11.009.
16. Malard D, Guicheux J, Boulter JM, Gauthier O, de Montreuil CB, Aquado E, Pilet P, LeGeros R, Daculsi G. Calcium phosphate scaffold and bone marrow reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 2005; 36: 323-30.
17. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007; 13: 947-55.
18. Marković D, Kojić Z, Marinković D, Danilović V, Radovanović A, Janačković Đ. Histological and immunohistochemical evaluations of rat soft tissue response to bioceramical implants. *Acta Veterinaria* 2009a; 59(2-3): 231-43.
19. Marković D, Kojić Z, Todorović V, Mičić M, Manojlović-Stojanoski M, Roksandić D, Aleksić-Kovačević S, Janačković Đ. The using of animal model in histological

- investigation to biocompatibility of bioceramical materials implanted in subcutis. Osmi kongres veterinara Srbije (sa međunarodnim učešćem), Veterinarska medicina, život i zdravlje. Beograd, 15-19. septembar, 2009b.
20. Marković D, Kojić Z, Todorović V, Lačković V, Petrović V, Stojanović D, Janačković Đ. The using of histological techniques in screening test evaluations at biocompatibility to bioceramical implants. The first International Symposium of clinical and applied Anatomy. Novi Sad, 17-19. septembar, 2009c.
21. Marković D, Kojić Z, Todorović V, Manojlović-Stojanoski M, Danilović V, Kuburović G, Radovanović A, Janačković Đ. Angiogenesis following the subcutaneous implantation of bioceramical materials (BCM). The first International Symposium of clinical and applied Anatomy. Novi Sad, 17-19. septembar, 2009d.
22. Marković D, Kojić Z, Kovačević-Filipović M, Radovanović A, Andrić N, Francuski J, Todorović V. Napredak u veterinarskoj regenerativnoj medicini: mogućnosti korišćenja biomaterijala na bazi kalcijum fosfata na eksperimentalnom modelu pacova. 16. savetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske. Teslić, 01-04 juni 2011: 70.
23. Ni SCJ. *In vitro* degradation bioactivity and ctocompatibility of calcium silacte dimagnesium silicace and tricalcium phosphate bioceramics. J Biomater Appl 2009 (in press).
24. Ozbas H, Yalitic M, Bilgic B, Issever H. Reactions od connective tissue to compomers, composite and amalgam root/end filling materials. Int Endod J 2003; 36: 281-7.
25. Ratner BD. Background Concepts, in: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (editors), Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier, Amsterdam, 2004.
26. Rouahi M, Champion E, Gallet O, Jada A, Anselme K. Physico-chemical characteristics and protein adsorption potencial of hydroxiapatite particles: influence on in vitro biocompatibility of ceramics after sintering. Colloids Surf B Biointerfaces 2006; 47: 10-9.
27. Saidan J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg L. Cell and tissue reaction to mineral trioxide aggregate and portland cement. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; 95: 483-9.
28. Saldaña L, Sánchez-Salcedo S, Izquierdo-Barba I, Bensiamar F, Munuera L, Vallet-Regí M, Vilaboa N. Calcium phosphate-based particles influence osteogenic maturation of human mesenchymal stem cells. Acta Biomater 2008; doi: 10.1016/j.actbio.2008.11.022.
29. Schilling FA, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. Biomaterials 2004; 25: 3963-72.
30. Schoen FJ, Mitchell RN. Tissue, the extracellular matrix, and cell-biomaterial interactions. In: Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (editors). Elsevier, Amsterdam, 2004.
31. Šupova M. Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. J Mater Sci Mater Med 2009 (in press); DOI: 10.1007/s10856-009-3696-2.
32. Todorović V, Peško P, Micev M, Bjelović M, Mičić M, Brašanac D, Ilić-Stojanović O. Insulin-like growth factor-1 in wound healing of rat skin. Res Pept 2008; 150: 7-13.

33. Valles G, Gonyalez-Melendi P, Gonzalez-Carrasco JLI, Saldana L, Sanchez-Sabate E, Munuera L, Vilabba N. Differential inflammatory macrophage response to rutile and titanium particles. *Biomaterials* 2006; 27: 5199-211.
34. Vitala R, Franklin V, Green D, Liu C, Lloyd A, Tighe B. Towards a synthetic osteo-odonto-keratoprosthesis. *Acta Biomater* 2009; 5: 438-52.
35. Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Freed LE. Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage. *Biorheology* 2002; 39: 259-68.
36. Williams DF. Analysis of soft tissue response to biomaterials (Chapter 4). In: *Technique of Biocompatibility Testing*. Williams DF (editors). Boca Raton, Florida: CRC Press 1986; 84-115.
37. Xu J, Khor KA, Sui J, Zhang J, Tan TL, Chen WN. Comparative proteomics profile of osteoblasts cultured on dissimilar hydroxyapatite biomaterials: an iTRAQ-coupled 2-D LC-MS/MS analysis. *Proteomics* 2008; 8: 4249-58.
38. Zaffe D, Lehisca GC, Pradelli J, Boticelli AR. Histological study on sinus lift grafting by fysiograft and BIO-DSS. *J Mater Sci Mat Med* 2005; 16: 789-93.
39. Zerbo IR, Bronckers ALJ, de Lange G, Burger EH. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous (beta)-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials* 2005; 26: 1445-51.
40. Zhang Z, Kurita H, Kobayashi H, Kurashina K. Osteoinduction with HA/TCP ceramics of different composition and porous structure in rabbits. *Oral Sci Int* 2005; 2: 85-95.

ENGLISH

**HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOFT TISSUE AFTER IMPLANTING
BIOCERAMICAL MATERIALS AND ESTIMATION OF BIOCOMPATIBILITY**

**Danica Marković, Anita Radovanović, Milica Kovačević-Filipović,
Jelena Francuski, Vera Todorović**

Histological evaluations of soft tissue reactions in implanted biomaterials is a long established method of investigating their biocompatibility. It is a very important procedure convenient for various biomaterials, as appropriate for soft as for hard tissue, but at the same time this method is not sufficient for a prediction of their clinic performance. The wide spread practice of this method is in the simplicity of its use in subcutaneous or intramuscular implantations on the animal model, and consequently exploring principal and surrounding tissue is very simple with screening tests for estimating the irritation index and interaction between tissue and biomaterials.

The screening tests (evaluation tests) involve implantation of biomaterials in various locations in the body, different tissue treatment as immunohistochemical tissue analysis, transmissional, scanning and confocal microscopy.

Interactions among soft tissue with bioceramics and the evaluation of their cellular and tissue performance in inflammation and immunological response are the first step in the estimation of biocompatibility.

Key words: bioceramics, biocompatibility, histology, regenerative medicine

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕАКЦИИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ НА
ИМПЛАНТИРОВАННЫЙ БИОКЕРАМИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ И ОЦЕНКА
БИОСОВМЕСТИМОСТИ**

**Даница Маркович, Анита Радванович, Милица Ковачевич-Филипович,
Елена Француски, Вера Тодорович**

Гистологическое испытание реакции мягких тканей в отношении биоматериала давно установленный метод оценивания биосовместимости. Это одновременно и очень важный метод, применяемый на все формы биоматериала, либо назначены для контакта с мягкой тканью или нет, но и метод, имеющий ограниченное значение для предвидения клинических производительностей. Распространённость пользования этого метода и происходит из факта, что подкожная или внутримышечная имплантация потенциального биоматериала на животных простая, а дальнейшие испытания реакции основной и соседних тканей в принципе простой скрининг тест для определения ирритации тканей интеракции тканей и биоматериала.

Скрининг техники (тесты оценивания) включают имплантацию материала на различных локализациях, словно и различные способы обработки тканей, применение иммуногисто-химических методов крашения трансмиссионной, скенинг и конфокальной микроскопии и применение других софистицированных методов в обработке и интерпретации данных.

Интеракция мягкой ткани с биокерамикой и оценка тканевого и клеточного показа в процессе инфламации и иммунологическом ответе первый шаг в определении их биосовместимости.

Ключевые слова: биокерамика, биосовместимость, гистология, регенеративная медицина

**EPIZOOTIOLOŠKO-EPIDEMIOLOŠKI ZNAČAJ PARAZITSKIH
INFEKCIJA DIVLJIH KANIDA******EPIZOOTIOLOGICAL-EPIDEMIOLOGICAL IMPORTANCE OF
PARASITIC INFECTIONS IN WILD CANIDS*****Tamara Ilić, Sara Savić, Sanda Dimitrijević****

Familija divljih kanida pripada redu Carnivora (mesojedi) i obuhvata 16 rodova, koji su rasprostranjeni u većini zemalja sveta. Najznačajnije endoparazitoze divljih kanida su toksokaroza, uncinarioza, kapilarioza, trihineloz, ehinokokoza, cestodoze, opistorhoza i alarioza. Ektoparaziti koji najčešće parazitiraju kod divljih kanida su krpelji, buve, pavaši i šugarci. Divlje kanide imaju veliki epizootiološko-epidemiološki značaj, s obzirom na to da kod njih parazitiraju uzročnici izvesnih vektorskih bolesti, od kojih su najvažnije lajšmanioza, erlihioza, babezioza, borelioz, dirofilarioza, bartoneloza i hepatozoonoz. Povećanje učestalosti interakcije između domaćih i divljih kanida, povećava i rizik za pojavu, širenje i održavanje bolesti kod populacije domaćih pasa. Posmatrano sa aspekta biološkog i ekološkog rizika, koji može biti prouzrokovan zoonoznim infekcijama, poznavanje etiologije i epizootiologije parazitskih infekcija divljih kanida, od posebnog je značaja za region države Srbije.

Ključne reči: divlje kanide, endoparaziti, ektoparaziti, vektorske bolesti

Uvod / Introduction

Divljač iz reda Carnivora (mesojedi) podeljena je u četiri familije: Canidae, Felidae, Mustelidae i Ursidae. Predstavnici familije Canidae su vuk (*Canis lupus*), lisica (*Vulpes vulpes*) i šakal (*Canis aureus*). Predstavnici familije Felidae su divlja mačka (*Felis silvestris*) i ris (*Lynx lynx*), predstavnik familije Mustelidae je jazavac (*Meles meles*), a familije Ursidae medved (*Ursus arctos*).

* Rad primljen za štampu 08. 11. 2011. godine

** Dr sc. med. vet. Tamara Ilić, docent, Katedra za parazitske bolesti, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; Savić Sara, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad; dr sc. med. vet. Dimitrijević Sanda, red. profesor, Katedra za parazitske bolesti, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Familija divljih kanida obuhvata 16 rodova, koji su rasprostranjeni u većini zemalja sveta. Od 36 vrsta, 9 je ugroženo. Kritično ugrožene vrste su Darwinove lisice, ostrvska lisica i crveni vuk, dok su etiopijski vuk, afrički divlji pas i vrsta psa *Cuon aplinus* dovedeni u opasnost. Neke vrste divljih kanida, kao što su kojoti, prenosioci su bolesti i napadači na stoku. Mnoge vrste mogu da posluže kao čuvari ekološkog zdravlja, s obzirom na to da su rezervoari ili vektori potencijalno patogenih uzročnika (Aguirre, 2009).

U pogledu geografske distribucije vukovi su najrasprostranjeniji na području Severne Amerike, na azijskom kontinentu (bivši Sovjetski Savez, Kina, Koreja, Indija, Pakistan, Liban, Sirija, Afganistan, Irak i Iran), u zemljama zapadne i severne Evrope (Norveška, Švedska, Finska, Turska, Grčka, Italija, Španija i Portugalija), kao i u zemljama istočne Evrope (Poljska, Slovačka, Mađarska, Rumunija i zemlje bivše Jugoslavije). Vuk najčešće obitava u mirnim, neprohodnim i tihim predelima, ali u potrazi za hranom prilazi i naseljenim mestima. Za vreme ratova, kada ne važe pravila lovnog zakonodavstva, plemenita divljač strada, a populacija vukova dobija priliku da se razmnoži u većem broju nego pod uobičajenim okolnostima (Honghai, 1999).

Na teritoriji bivše Jugoslavije posle Prvog i Drugog svetskog rata brojno stanje vukova se znatno povećalo. Godine 1950. u Jugoslaviji je registrovano oko 6000 vukova, koji su u našim uslovima sinantropna vrsta (hrane se stokom) i ispoljavaju značajne negativne efekte na brojno stanje populacije različitih domaćih životinja (Bojović i Čolić, 1974). Procenjuje se da je u svetu populacija vukova najbrojnija po jedinici površine na Deliblatskoj peščari, pri čemu populacije plena (divlja svinja, srna, jelen) opstaju i pokazuju trend povećanja (Milenković i sar., 2006).

Lisica je veoma prilagodljiva vrsta divljači, a njena staništa su obično livade, šume, polja, kamenjari i močvarni predeli (Teacher i sar., 2011). Rasprostranjena je u Severnoj Americi (primarno u severnim šumama Kanade i Aljaske), Aziji i čitavoj Evropi (Aubry i sar., 2009). Šakal naseljava sušne predele Afrike, subtropske i tropske predele Azije, Mađarsku, Slovačku, Austriju i Italiju, kao i delove južne Evrope (Grčka, Dalmacija) (Krystufek i Tvrtkovic, 1990; Arnold i sar., 2011). Ovaj pripadnik familije kanida je posle Drugog svetskog rata praktično nestao iz naših krajeva kao kolateralna šteta masovnog trovanja vukova. Poslednjih decenija njegova brojnost se povećava u okvirima svog ranijeg areala boravka – Karpati, jugoistočna Srbija, južni Banat i Srem (Milenković i sar., 2006; Zachos i sar., 2010).

Endoparazitoze divljih kanida / *Endoparasitoses in wild canids*

Divlje kanide mogu biti inficirane različitim vrstama parazita, koji najčešće nisu od posebnog značaja za zdravlje divljih životinja, ali u nekim slučajevima mogu biti vektori zoonoza ili su uzročnici klinički manifestnih oboljenja kod mladih i imunokompromitovanih jedinki.

Divlje kanide su važni pravi domaćini za cestode *Echinococcus granulosus* i *E. multilocularis*. Šilvatični ciklus ovih tenia uključuje divlje kanide i njihov plen (lanad, jelenčad). Čovek se najčešće inficira vrstom *E. granulosus* kada preko kontaminiranog povrća unese u svoj digestivni trakt jaja eliminisana fecesom psa, odnosno vrstom *E. multilocularis*, jaja eliminisana fecesom lisice. U većem broju zemalja frekvencija cista *E. alveolaris* koincidira sa frekvencijom broja inficiranih lisica. Od značaja je i vrsta *E. vogeli* za koju su pravi domaćin divlji psi, a prelazni domaćini su glodari i čovek (Williams i Thorne, 1996).

Lisica je pravi domaćin (isto kao pas, mačka i čovek) za trematodu *Opisthorchis felineus*, koja parazitira na području evroazijskih zemalja. Za infekciju ljudi, lisica može da obavlja indirektnu ulogu isto kao pas i mačka. Jaja ove trematode dospevaju u vodu, gde se razvojni ciklus obavlja preko pužića iz roda *Bythinia* i dalje nastavlja u ribama iz familije *Cyprinidae*. Opistorhoza je helmintoza hepatobilijarnog sistema i pankreasa, koja kod ljudi može da se iskomplikuje razvojem malignih procesa na inficiranim organima (Mordvinov i Furman, 2010). Na našem epizootiološkom području ovaj parazit nije ustanovljen.

Kod vukova i lisica je opisana infekcija vrstom *Trichinella spiralis*. Ove životinje se najčešće inficiraju trihinelom jedući šumske glodare. Šumski glodari se inficiraju jedući jedni druge ili konzumirajući leševe ubijenih i uginulih lisica, koje su bile inficirane larvama ove nematode (Williams i Thorne, 1996).

Shimalov i Shimalov (2003) su istraživali helmintsku faunu crvenih lisica u južnoj Belorusiji, kada su ustanovili vrste helminata koji imaju važnost kako za veterinarsku tako i za humanu medicinu. Dijagnostikovane su *Alaria alata* (42,6%), *Pearsonema plica* (21,3%), *Taenia crassiceps* (27,7%), *Toxocara canis* (25,5%), larve *Trichinella spiralis* (22,3%) i *Uncinaria stenocephala* (40,4%).

Veoma značajna parazitoza divljih kanida, koja predstavlja potencijalnu opasnost po zdravlje ljudi je kapilarioza, oboljenje koje prouzrokuje *Capilaria aerophila*. Ova nematoda je primarno parazit respiratornog trakta lisica, ali je takođe zabeležena kod pasa, mačaka i drugih karnivora u Severnoj i Južnoj Americi i Evropi. Infekcija domaćih i divljih životinja ovom nematodom veoma je učestala, tako da iznenađuje činjenica što još nije došlo do njenog masovnijeg prenošenja na ljude (Dimitrijević i sar., 2007; Lalošević i sar., 2008; Ilić i sar., 2009).

Krone i sar. (2007) su saopštili podatke sa područja Nemačke, za period od 1993. do 2002. godine, o prisustvu endoparazita kod domaćih i divljih mačaka, među kojima je bila ustanovljena i infekcija nematodama *C. aerophila*, *C. feliscati* i *C. plica*. Visoka prevalencija infekcije (66%) vrstom *C. aerophila* dokazana je kod crvenih lisica u Mađarskoj (Szell i sar., 2003). Ispitivanjima parazitske faune crvenih lisica u Norveškoj, u periodu od 2002. do 2005. godine, ustanovljena je prevalencija infekcije nematodom *C. aerophila* od 88% (Davidson i sar., 2006). Istraživanja obavljena 2005. godine kod crvenih lisica u Kanadi (Prince Edward Island) pokazala su da je *C. aerophila* bila zastupljena u 68,6% slučajeva (Nevarez i sar., 2005). U centralnoj Poljskoj, u periodu od 2005. do 2007. godine,

ustanovljena je prevalencija infekcije vrstom *C. aerophila* od 0,3% (Borecka i sar., 2009)

Lalošević i sar. (2008) su opisali slučaj kapilarioze, dijagnostikovano početkom 2006. godine u Institutu za plućne bolesti u Sremskoj Kamenici, kod pacijentkinje iz Bačke Palanke. Pretpostavlja se da su jedan od rezervoara ove zoonoze u Srbiji upravo lisice sa teritorije Vojvodine, što dijagnostikovani slučaj plućne kapilarioze kod osobe iz Bačke Palanke, samo dodatno potvrđuje.

Pavlović i sar. (2008) iznose rezultate istraživanja dobijene kod ulovljenih lisica sa područja Srbije u periodu od 1994. do 2006. godine, kada je dijagnostikovano 11 vrsta cestoda: *Mesocostoides lineatus* (37,98%), *Taenia pisiiformis* (13,06%), *Dipylidium caninum* (11,93%), *Mesocostoides litteratus* (10,95%), *T. polycantha* (6,00%), *Hydatigera taeniaeformis* (5,27%), *T. crassiceps* (4,13%), *Multiceps multiceps* (3,65%), *T. hydatigena* (2,92%), *Multiceps serialis* (2,59%) i *Spirometra erinacei europeii* (1,54%). U okviru ovog istraživanja *Multiceps litteratus* je prvi put ustanovljen kod lisica u Vojvodini. Nalaz ove cestode je od velikog epidemiološkog značaja s obzirom na to da postoji mogućnost infekcije ljudi, putem mesa prelaznog domaćina (jarebice, fazani, zečevi), u kome se nalaze cisticercoidi ove pantljičare.

Ektoparazitose divljih kanida / *Ectoparasitoses in wild canids*

Najznačajniji ektoparaziti divljih kanida su krpelji, buve, pavaši i šugarci. Istraživanjima sprovedenim kod divljih kanida u Teksasu i Luizijani dijagnostikovane su različite vrste ektoparazita: krpelji *Amblyomma americanum* (7%), *A. maculatum* (80%) i *Ixodes scapularis* (1,3%), zatim pavaš *Trichodectes canis* (7%), a od šugaraca *Sarcoptes scabiei* (9%) i *Demodex canis* (0,3%) (Danny i sar., 1981). Ovo je prvi izveštaj o detekciji šugarca iz roda *Demodex* kod divljih kanida i prvi izveštaj o nalazu šugaraca iz roda *Sarcoptes* kod ovih domaćina u Teksasu. Šugarci roda *Sarcoptes* prouzrokuju oboljenje epizootskog karaktera među populacijom divljih kanida u Severnoj Americi, Evropi i Australiji (Pence i Ueckermann, 2002; Balestrieri i sar., 2006). Kod vukova u Severnoj Americi takođe je dijagnostikovana pavaš psa *T. canis* (Jimenez i sar., 2010). Najnovija istraživanja sprovedena u Brazilu, pokazuju da su najzastupljeniji ektoparaziti divljih kanida na ovom području krpelji iz roda *Amblyomma* (*A. cajennense* i *A. tigrinum*) i buva *Pulex irritans* (Almeida Curi i sar., 2010).

Vektorske bolesti divljih kanida / *Vector diseases in wild canids*

Divlje kanide imaju veliki epizootiološko-epidemiološki značaj, s obzirom na to da kod njih parazitiraju uzročnici izvesnih vektorskih bolesti, koje se pojavljuju, održavaju i šire sledeći neke globalne obrasce. Na primer, lajšmanioza u Americi prouzrokovana vrstom *Leishmania braziliensis* tesno je povezana sa procesom krčenja šuma i naseljavanjem ljudi. Lajšmanioza pasa prouzrokovana

vrstom *L. infantum* ranije je smatrana za egzotičnu bolest, a nedavno je ustanovljena kod pasa lisičara u Sjedinjenim Državama i nekim delovima Kanade (Aguirre, 2009).

Kod divljih kanida u endemskim regionima Evrope nedavno je registrovana visceralna lajšmanioza pasa. Serološkim ispitivanjem zarobljenih vukova u jugozapadnoj Evropi ustanovljena je niska seroprevalencija na prisustvo *L. infantum* (9%). Epizootiološka ispitivanja lajšmanioze, sprovedena kod lisica u Španiji, dokazala su prevalenciju infekcije navedenom vrstom, koja je iznosila 74%. Visceralna lajšmanioza se javlja u mnogim delovima sveta i psi se smatraju glavnim rezervoarom infekcije za ljude. Bolest je dokumentovana kod velikog broja divljih kanida u Brazilu (Luppi i sar., 2008). U periodu između 1999 i 2003. godine, parazitološki i serološki testovi obavljeni kod domaćih i divljih šakala u Iranu pokazuju da je 10% populacije divljih kanida bilo inficirano vrstom *L. infantum*. Primenom molekularnih i biohemijskih tehnika, 10 od 11 izolovanih *Leishmania* spp. kod divljih pasa identifikovane su kao *L. infantum*, a jedna kao *L. tropica* (Mohebbi i sar., 2005).

Anaplasma phagocytophilum (ranije označavana kao *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* i *Anaplasma phagocytophila*) prouzrokuje granulocitnu erlihiozu kod (anaplazmozu) ljudi, konja, ovaca, goveda, pasa i mačaka. Od crvenih lisica u Mađarskoj prikupljeno je preko 450 evropskih krpelja (*Ixodes ricinus*), koji su ispitivani na prisustvo ove rikecije, kada je PCR tehnikom dijagnostikovano 6 inficiranih lisica (Sreter, 2004). Epidemiološke posledice navedenih nalaza nisu poznate.

U Izraelu su obavljena istraživanja sa ciljem da se utvrdi moguća uloga šakala (*Canis aureus siriacus*) u epidemiologiji erlihioze. Tom prilikom ustanovljena je pozitivna seroprevalencija na prisustvo *E. canis* (36%), *E. chaffeensis* (26%) i *A. phagocytophilum* (26%). Crvena lisica može biti i potencijalni rezervoar vrste *E. chaffeensis* za kičmenjake. Pošto je navedena vrsta uzročnik erlihioze ljudi, neophodno je serološki dokazati infekciju ovom erlihijom populacije divljih životinja (Waner i sar., 1999). Druga studija sprovedena na kojotima iz Kalifornije pokazala je da ove životinje mogu imati važnu ulogu u epidemiologiji granulocitne erlihioze, s obzirom na to da je kod njih ustanovljena pozitivna seroprevalencija na prisustvo *A. phagocytophilum* (46%) i *E. risticii* (novi naziv *Neorickettsia risticii*) (1%) (Pusterla i sar., 2000).

Evers i sar. (2003) su izvršili eksperimentalnu infekciju mladih kojota (*Canis latrans*) protozoom *Babesia gibsoni*, što je kod inficiranih jedinki prouzrokovalo bledilo sluzokoža, splenomegaliju i hemoglobinuriju. Kod jednog kojota je zabeležena blaga depresija i anoreksija. Blagi klinički simptomi, zajedno sa visokim nivoom i dugim trajanjem parazitemije, ukazuju na to da kojoti mogu da posluže kao rezervoari infekcije za ovu vrstu babezije.

Još jedno epidemiološki značajno oboljenje divljih kanida je bartone-loza. *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* je prvobitno izolovana kod psa sa infektivnim endokarditisom i nedavno je identifikovana kao zoonozni agens, koji može

da prouzrokuje endokarditis kod ljudi. U Kaliforniji je sprovedena epidemiološka studija na detetu koje je ujeo kojot i kod koga su se pojavili klinički znaci koji odgovaraju infekciji prouzrokovanoj bartonelom. Među kojotima iz centralne primorske Kalifornije utvrđena je prevalencija infekcije ovim uzročnikom od 28% i nalaz antitela kod 76% ispitivanih životinja, što ide u prilog tvrdnji da kojoti mogu biti rezervoar ove infekcije u populaciji divljih životinja (Chang i sar., 2000). Ipak, neophodna su dodatna istraživanja kako bi se razjasnio način prenošenja, kako bi se identifikovali potencijalni vektori i kako bi se utvrdili put i način prenošenja infekcije na ljude.

Ispitivanjima različitih vrsta i serotipova bakterije *Borrelia burgdorferi*, vukovi su identifikovani kao mogući rezervoari infekcije u prirodi (Bhide i sar., 2005). U Nemačkoj je ustanovljena prevalencija infekcije crvenih lisica ovom bakterijom od 7% (Heidrich i sar., 1999). Godine 1988. kod krpelja (*Dermacentor variabilis*) koji se nalazio na kojotu otkrivena je nova vrsta *Candidatus B. texasensis* (Lin i sar., 2005). Istraživanjima koja su obavljena kod pasa i kojota u San Dijegu, potvrđeni su pozitivni serološki nalazi kod 2,3% pasa i 1,2% kojota. Niske seroprevalencije ispitivanih vrsta kanida, ukazuju na to da je u Kaliforniji rizik za pojavu Lajmske bolesti minimalan (Olson i sar., 2000). Nakon višegodišnje analize krpelja u regionu Vojvodine, došlo se do zaključka da je Lajmska bolest definitivno zastupljena u populaciji krpelja. Zato i predstavlja opasnost za domaće životinje i ljude na ovom epizootiološkom području, u kome je bilo i prijavljenih kliničkih slučajeva kod pasa, koji su dijagnostikovani kao Lajmska bolest (Savić-Jevđenić i sar., 2007).

Dirofilarioza je zastupljena kod divljih kanida koje vode poreklo sa lokaliteta na kojima je ovo oboljenje registrovano i kod domaćih pasa. Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja u Srbiji to su epizootiološko područje Vojvodine i Braničevskog okruga (Savić-Jevđenić i sar., 2004; Dimitrijević i sar., 2007). Kojoti mogu služiti kao potencijalni rezervoar za prenos uzročnika *Dirofilaria immitis* na domaće pse. Kod kojota iz Ilinoisa ustanovljena je prevalencija infekcije ovim parazitom od 16% na nivou savezne države. Zaključeno je da dirofilarioza predstavlja samo minorni faktor koji utiče na dinamiku populacije kojota u Ilinoisu i da ove divlje kanide predstavljaju nizak rizik za zdravlje pasa (Aguirre, 2009). Detaljna ekološka studija obavljena kod jedne vrste vukova (*Chrysocyon brachyurus*) i drugih vrsta kanida u nacionalnom parku na severoistoku Bolivije i u selima koja se sa njim graniče dokazala je postojanje umerenog do visokog nivoa infekcije virusom besnila, vrstom *Ehrlichia canis* i kokcidijom *Toxoplasma gondii*, kao i značajan nivo infekcije vrstom *D. immitis*. U ispitivanim selima dolazilo je do kontakata divljih kanida i pasa, zbog čega ovi psi verovatno predstavljaju značajan rizik za divlje kanide u svom okruženju (u parku i njegovoj blizini). Zato je neophodno sve potrebne mere u ovom regionu osmisliti tako da se smanji rizik od širenja infekcije sa domaćih na divlje kanide (Bronson i sar., 2008).

Vukovi su neotoporna vrsta divljih kanida, sa najvećom distribucijom zaraze u Argentini, Brazilu, Boliviji i Paragvaju. Primarne pretnje opstanku i slo-

bodnom kretanju vukova su gubitak staništa, drumski akcidenti i ubijanje od strane farmera. Dodatnu opasnost predstavlja rizik od morbiditeta i mortaliteta, koji mogu biti prouzrokovani bolestima zarazne i parazitske etiologije. Dokazano je da su zarobljeni vukovi podložni infekcijama od kojih oboljevaju i uginjavaju i domaći psi (korona virus pasa, virus besnila, *Leptospira interrogans* spp, *T. gondii* i *D. immitis*). Na taj način kod vukova se povećava rizik za nastanak, širenje i održavanje onih bolesti, čiji su uzročnici poreklom iz populacije domaćih pasa (Deem i Emmons, 2005).

Hepatozoonoza je oboljenje koje ima endemski karakter u populaciji crvenih lisica u Izraelu, pri čemu lisice mogu da posluže kao rezervoar za infekciju domaćih pasa i nekih vrsta divljih pasa (Fishman i sar., 2004). Hepatozoonozu mesojeda prouzrokuje *Hepatozoon canis*, a pretpostavlja se da se infekcija izazvana ovim uzročnikom širi preko inficiranih krpelja *Rhipicephalus sanguineus*. Prva molekularna detekcija *H. canis* obavljena je kod prirodno inficiranih crvenih lisica iz Slovačke. Na ovo područje inficirane krpelje su doneli putnici, zlatni šakali ili lisice (koje su migrirale zbog širenja populacije zlatnog šakala), kao i klimatske promene (Majláthová i sar., 2007).

Populacija divljih kanida može da pretrpi ozbiljne epizootije, koje mogu biti prouzrokovane vrstama koje parazitiraju kod domaćih pasa. Šakali, lisice i kojoti su vrste veoma prilagodljive na promene u ekosistemu i na uticaj čoveka. Povećanje učestalosti interakcije domaće kanide i divlje kanide dovodi i do povećanja rizika za pojavu, širenje i održavanje bolesti kod populacije domaćih pasa (Dimitrijević i sar., 2005).

Oskudni rezultati dosadašnjih istraživanja parazitskih infekcija divljih kanida na području Srbije ukazuju na potrebu za daljim sistematičnijim istraživanjima. Ova istraživanja bi imala za cilj da identifikuju rezervoare pojedinih parazitskih infekcija u populaciji divljih kanida, da utvrde prijemčive domaćine i zoonozne interakcije za sve vektorske bolesti pasa. Takođe, od značaja bi bilo da se uspostave adekvatne mere zaštite za sve vrste divljih kanida čija je populacija u opadanju i da se obezbedi njihovo dugoročno preživljavanje. Poznavanje etiologije i epizootiologije parazitskih infekcija divljih kanida u svetu, od posebnog je značaja za region države Srbije. Naročito ako se uzmu u obzir faktori biološkog i ekološkog rizika koje možemo da očekujemo, a uslovljeni su zoonoznim infekcijama divljači u zemljama iz okruženja.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad realizovan po projektu „Praćenje zdravstvenog stanja divljači i uvođenje novih biotehnoloških postupaka u detekciji zaraznih i zoonoznih agenasa – analiza rizika za zdravlje ljudi, domaćih i divljih životinja i kontaminaciju životne sredine“ (broj TR31084) i projektu „Primena EIIP/ISM bioinformatičke platforme u otkrivanju novih terapijskih targeta i potencijalnih terapijskih molekula“ (broj 173001), koje je finansiralo Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije. /

This work was realized within Project Monitoring the health of wild game and the introduction of new biotechnological procedures in the detection of infectious and zoonotic agents – risk analysis regarding the health of humans, domestic and wild animals and environmental contamination“ (Number TR31084) and Project „Implementation of EIIP/ISM bioinformatic platform in detecting new therapeutic targets and potential therapeutic molecules“ (Number 173001), financed by the Ministry for Education and Science of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Aguire AA. Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasites Vectors* 2009; 2(1): 7.
2. Almeida Curi N, Araújo A, Campos F, Lobato Z, Gennari S, Marvulo M, Silva J, Talamoni S. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. *Biodiversity and Conservation* 2010; 19(12): 3513-24.
3. Arnold J, Humer A, Haltai M, Murariu D, Spassov N, Hackländer K. Current status and distribution of golden jackals *Canis aureus* in Europe. *Mammal Rev* 2011.
4. Aubry KB, Statham JM, Sacks NB, Perrine DJ, Wisley MS. Phylogeography of the North American red fox: vicariance in Pleistocene forest refugia. *Molecular Ecology* 2009; 18: 2668-86.
5. Balestrieri A, Ferrari N, Ferrari A, Valvo LT, Robetto S, Orusa R. Sarcoptic mange in wild carnivores and its co-occurrence with parasitic helminths in the Western Italian Alps. *Europ J Wildl Res* 2006; 52(3): 196-201.
6. Bhide MR, Travnicsek M, Levkutova M, Culik J, Revajova V, Levkut M. Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship. *Fems Immunol Med Microbiol* 2005; 43(2): 165-72.
7. Bojović D, Čolić D. Vuk (*Canis lupus* L.) u Jugoslaviji. Zbornik kratkih sadržaja. III simpozijum o lovstvu. Beograd, 1974: 31-42.
8. Borecka A, Gawor J, Malczewska M, Malczewski A. Prevalence of zoonotic helminth parasites of the small intestine in red foxes from central Poland. *Medycyna Wet* 2009; 65(1): 33-5.
9. Bronson E, Emmons LH, Murray S, Dubovi EJ, Deem SL. Serosurvey of pathogens in domestic dogs on the border of Noel Kempff Mercado National Park, Bolivia. *J Zoo Wildl Med* 2008; 39(1): 28-36.
10. Chang CC, Kasten RW, Chomel BB, Simpson DC, Hew CM, Kordick DL, Heller R, Piemont Y, Breitschwerdt EB. Coyotes (*Canis latrans*) as the reservoir for a human pathogenic *Bartonella* spp: molecular epidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* infection in coyotes from central coastal California. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11): 4193-200.
11. Danny PB, Custer WJ, Carley CJ. Ectoparasitets of wild canids from the gulf coastal prairies of Texas and Louisiana. *J Med Entomology* 1981; 4(30): 400-12.
12. Davidson RC, Gjerde B, Vihoren T, Lillehaug A, Handerland H. Prevalence of *Trichinella* larvae and extra-intestinal nematodes in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet Parasitol* 2006; 136 (3-4): 307-16.
13. Deem SL, Emmons LH. Exposure of free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) to infectious and parasitic disease agents in the Noel Kempff Mercado National Park, Bolivia. *J Zoo Wildl Med* 2005; 36(2): 192-7.
14. Dimitrijević S, Ilić T, Bečkei Ž. Epizootiološki značaj parazitskih infekcija mesojeda. Zbornik referata i kratkih sadržaja VII simpozijuma epizootioloških dana, Jagodina, 2005: 127-8.
15. Dimitrijević S, Tasić A, Tasić S, Adamović V, Ilić T, Miladinović-Tasić N. Filariosis in dogs in Serbia. *Mappe parassitologiche 8 - Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections* 2007; 201.

16. Dimitrijević S, Lalošević V, Ilić T, Lalošević D. Kapilarioza – oboljenje životinja i potencijalna zoonoza. Zbornik radova i kratkih sadržaja 9. simpozijuma Epizootiološki dani. Srebrno Jezero, 2007: 119-21.
17. Evers HV, Kocan AA, Reichard MV, Meinkot JH. Experimental Babesia gibsoni infection in coyotes (*Canis latrans*). J Wildl Dis 2003; 39(4): 904-8.
18. Fishman Z, Gonen L, Harrus S, Strauss-Ayali D, King R, Baneth G. A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodies in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. Vet Parasitol 2004, 119(1): 21-6.
19. Heidrich J, Schonberg A, Steuber S. Investigation of skin samples from red foxes (*Vulpes vulpes*) in eastern Brandenburg (Germany) for the detection of *Borrelia burgdorferi* s.l. Zbl Bakt-Int J Med Microbiol 1999; 289: 666-72.
20. Honghai Z. Population and distribution of wolf in the world. J Forestry Res 1999; 10(4): 247-50.
21. Ilić T, Dimitrijević S, Mitrović S, Džamić A, Đurić B. Kapilarioza – oportuna zoonoza. Zbornik kratkih sadržaja 14. godišnjeg savetovanja veterinara Republike Srpske (Bosna i Hercegovina). Jahorina, 2009: 78.
22. Jimenez DM, Bangs EE, Drew M, Nadeau S, Asher JV, Sime C. Dog lice (*Trichodectes canis*) found on wolves (*Canis lupus*) in Montana and Idaho. Northwestern Naturalist 2010; 91(3): 331-3.
23. Krone O, Guminsky O, Meinig H, Herrmann M, Trinzen M, Wibelt G. Endoparasite spectrum of wild cats (*Felis silvestris* Schreber, 1777) and domestic cats (*Felis catus* L.) from the Eifel, Pfalzregion and Saarland, Germany. E J Wild Res, 2007; SpringerLink.
24. Krystufek B, Tvrtkovic N. Variability and identity of the jackals (*Canis aureus*) of Dalmatia. Ann Naturhist Mus Wien 1990; 91(B): 7-25.
25. Lalošević D, Lalošević V, Klem I, Stanojev-Jovanović D, Pozio E. Pulmonary capillariasis miming bronchial carcinoma. Am J Trop Med Hyg 2008; 78(1): 14-6.
26. Lin T, Gao LH, Seyfang A, Oliver Jr JH. „*Candidatus Borrelia texasensis*“, from the American dog tick *Dermacentor variabilis*. Int J Syst Evolut Microbiol 2005; 55: 685-93.
27. Luppi MM, Malta MCC, Silva TMA, Silva FL, Motta ROC, Miranda I, Ecco R, Santos RL. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. Vet Parasitol 2008; 155(1-2): 146-51.
28. Majláthová V, Hurniková Z, Majláth I, Petko B. *Hepatozoon canis* infection in Slovakia: imported or autochthonous? Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2007; 7(2): 199-202.
29. Milenković M, Habijan-Mikeš V, Matić R. Cases of spontaneous interbreeding of wolf and domestic dog in the region of southeast Banat (Serbia). Arch Biol Sci 2006; 58(4): 225-30.
30. Mohebbali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhar M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. Vet Parasitol 2005; 129(3-4): 243-51.
31. Mordvinov VA, Furman DP. The digenea parasite *Opisthorchis felineus*: A target for the discovery and development of novel drugs. Infectious Disorders - Drug Targets (Formerly Current Drug Targets - Infectious 2010; 10(5): 385-401(17).
32. Nevarez A, Lopez A, Conboy G, Ireland W, Sims D. Distribution of *Crenosoma vulpis* and *Eucoleus aerophilus* in the lung of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*). J Vet Diagn Invest 2005; 17: 486-9.

33. Olson PE, Kallen AJ, Bjorneby JM, Creek JG. Canines as sentinels for Lyme disease in San Diego County, California. J Vet Diagn Invest 2000; 12(2): 126-9.
34. Pavlović I, Tambur Z, Doder R, Kulišić Z, Jakić-Dimić D. The cestodes of the fox (*Vulpes vulpes* L.) caught in the Serbia in the period 1994-2006. Veterinaria 2008; 57(1-2): 100-8.
35. Pence DB, Ueckermann E. Sarcoptic mange in wildlife. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2002; 21 (2): 385-98.
36. Pusterla N, Chang CC, Chomel BB, Chae JS, Foley JE, DeRock E, Kramer VL, Lutz H, Madigan JE. Serologic and molecular evidence of *Ehrlichia* spp. in coyotes in California. J Wildl Dis 2000; 36(3): 494-9.
37. Savić-Jevđenić S, Vidić B, Grgić Ž, Milovanović A. Brza dijagnostika dirofilarioze pasa u regionu Novog Sada. Veterinarski glasnik 2004; 58(5-6): 693-8.
38. Savić-Jevđenić S., Grgić Ž., Vidić B., Petrović A. Lyme disease - the great imitator = Lajmska bolest - veliki imitator. Biotechnology in animal husbandry, 2007; 23 (5-6): 215-21.
39. Shimalov V, Shimalov V. Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in south Belarus. Parasitol Res 2003; 1: 77-8.
40. Sréter T, Sréterné LZ, Széll Z, Egyed L. *Anaplasma phagocytophilum*: an emerging tick-borne pathogen in Hungary and central eastern Europe. Ann Trop Med Parasitol 2004; 98(4): 401-5.
41. Szell Z, Marucci G, Pozio E, Vorgi I. Extraintestinal nematode infections of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary. Vet Parasitol 2003; 115 (4): 329-34.
42. Teacher GFA, Thomas AJ, Barnes I. Modern and ancient red fox (*Vulpes vulpes*) in Europe show an unusual lack of geographical and temporal structuring, and differing responses within the carnivores to historical climatic change. BMC Evolutionary Biology 2011, 11:214-23.
43. Waner T, Baneth G, Strenger C, Keysary A, King R, Harrus S. Antibodies reactive with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* genogroup antigens and the spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (*Canis aureus syriacus*) from Israel. Vet Parasitol 1999; 82(2): 121-8.
44. Williams ES, Thorne ET. Infectious and parasitic diseases of captive carnivores, with special emphasis on the black-footed ferret (*Mustela nigripes*). Rev Sci Tech Off Int Epiz 1996; 15(1): 91-114.
45. Zachos EF, Cirovic D, Kirschning J, Otto M, Hartl BG, Petersen B, Honnen A. Genetic Variability, Differentiation, and Founder Effect in Golden Jackals (*Canis aureus*) from Serbia as Revealed by Mitochondrial DNA and Nuclear Microsatellite Loci. Biochemical Genetics 2010; (3-4): 241-50.

ENGLISH

EPIZOOTIOLOGICAL-EPIDEMIOLOGICAL IMPORTANCE OF PARASITIC INFECTIONS IN WILD CANIDS

Ilić Tamara, Savić Sara, Dimitrijević Sanda

The family of wild canids belongs to the order *Carnivora* and comprises 16 genera that are distributed in most countries all over the world. The most important endoparasitic diseases of wild canids are toxocariasis, uncinariasis, capillariasis, trichinellosis, echinococcosis, cestodiasis, opisthorchiasis, and alariasis. Ectoparasites that most often exist as parasites in wild canids are mites, fleas, ticks and scabies. Wild canids have a large epizootiological-epidemiological significance since they are hosts to parasites that cause certain vector diseases, the most important of which are leishmaniasis, ehrlichiosis, babesiosis, borreliosis, dirofilariasis, bartonellosis, and hepatozoonosis. The increased frequency of interaction between domestic and wild canids steps up the risk of the appearance, spread, and maintaining of the disease in domestic dog populations. Observed from the aspect of the biological and ecological risk, that can be caused by zoonotic infections, the knowledge of the etiology and epizootiology of parasitic infections of wild canids is of particular importance for the region of the Republic of Serbia.

Key words: wild canids, endoparasites, ectoparasites, vector diseases

РУССКИЙ

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПАРАЗИТАРНЫХ ИНФЕКЦИЙ ДИКИХ СОБАК

Илич Тамара, Савич Сара, Дмитриевич Санда

Семейство диких собак принадлежит ряду мясоядных и охватывает 16 родов, распространённые в большинстве стран мира. Наиболее значительные эндопаразитозы диких собак токсокариоз, унцинариоз, капилляриоз, трихинеллёз, эхинококкоз, цестодозы, описторхоз и алариоз. Эктопаразиты, которые чаще всего паразитируют у диких собак - клещи, блохи, павши и чесоточные паразиты. Дикие собаки имеют большое эпизоотологическо-эпидемиологическое значение с учётом, что у них паразитируют возбудители известных векторных болезней, из которых самые важные лейшманиоз, эрлихиоз, бабезиоз, диروفилариоз, бартонеллоз и гепатозооноз. Увеличение учащения интеракции среди домашних и диких собак, увеличивает и риск для явления, расширения и содержания болезни у популяции домашних собак. Смотрено в аспекте биологического и экологического риска, который может быть причинен зоонозными инфекциями, познание этиологии и эпизоотологии паразитарных инфекций диких собак, особенно важно для региона государства Сербии.

Ключевые слова: дикие собаки, эндопаразиты, эктопаразиты, векторные болезни

**HEMIJSKI SASTAV POTPUNIH SMEŠA ZA ISHRANU SVINJA
ANALIZIRANIH U PERIODU 2007–2009. GODINE***
*CHEMICAL COMPOSITION OF COMPLETE FODDER MIXES FOR PIG
DIET DURING 2007–2009*

D. Šefer, B. Petrujkić, Radmila Marković, Svetlana Grdović, S. Radulović,
D. Jovanović**

Intenzivan uzgoj svinja između ostalog podrazumeva i upotrebu potpunih smeša u njihovoj ishrani, prilagođenu starosnoj dobi i nameni. Tokom trogodišnjeg perioda (2007 – 2009. god.) u akreditovanoj laboratoriji Katedre za ishranu i botaniku, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu analizirano je 65 uzoraka smeša sa teritorije Srbije, namenjenih za ishranu svih kategorija svinja i to: 6 uzoraka potpunih smeša za ishranu suprasnih krmača i nazimica, 9 uzoraka potpunih smeša za ishranu krmača dojara i nerasta, 4 uzorka potpune smeše za prihranjivanje prasadi, 13 uzoraka potpunih smeša za prasad do 15 kg, 12 uzoraka potpunih smeša za prasad od 15 do 25 kg, 10 uzoraka potpunih smeša za svinje u porastu i tovu od 25 do 60 kg i 11 uzoraka potpunih smeša za svinje u porastu i tovu od 60 do 100 kg.

Analiziran je sadržaj osnovnih hranljivih materija, a dobijeni rezultati upoređeni su sa uslovima kvaliteta propisanim Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010).

Utvrđena su odstupanja od vrednosti propisanih Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010), u prosečnom sadržaju proteina u potpunim smešama za ishranu prasadi od 15 do 25 kg ($17,89 \pm 1,19\%$) i smeši za ishranu svinja u porastu i tovu od 60 do 100 kg ($13,95 \pm 0,53\%$). Utvrđeni prosečni sadržaj masti bio je niži u smešama za prihranjivanje prasadi ($5,99 \pm 0,72\%$) i smešama za ishranu prasadi do 15 kg ($4,95 \pm 1,41\%$). Veći prosečan sadržaj celuloze ($4,08 \pm 0,73\%$) utvrđen je u smešama za prihranjivanje prasadi.

* Rad primljen za štampu 29. 12. 2012. godine

** Dr sc. med. vet. Dragan Šefer, profesor; dr sc. med. vet. Branislav Petrujkić, asistent; dr sc. med. vet. Radmila Marković, docent; dr sc. Svetlana Grdović, profesor; Stamen Radulović, dipl. vet., asistent; mr sc. Dragoljub Jovanović, stručni saradnik, Katedra za ishranu i botaniku, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Sa druge strane, utvrđena su značajna odstupanja pojedinačnih uzoraka u odnosu na vrednosti koje su propisane Pravilnikom.

Utvrđena odstupanja u hemijskom sastavu pojedinačnih uzoraka ispitivanih smeša nesumnjivo ukazuju na potrebu stalnog i višestepenog monitoringa sirovina i gotovih proizvoda, a u cilju očuvanja zdravlja i što optimalnijeg iskorišćenja proizvodnog potencijala životinja.

Ključne reči: krmivo, svinje, hemijski sastav, kvalitet

Uvod / Introduction

Intenziviranje svinjarske proizvodnje usled povećanja genetskog potencijala, promene u načinu držanja i rasnom sastavu svinja, dovele su i do promena u njihovim potrebama u hranljivim materijama tj. do promena u ishrani. U cilju zadovoljenja potreba organizma u hranljivim materijama, očuvanja zdravlja i postizanja optimalnih proizvodnih rezultata hrana za životinje mora da sadrži sve potrebne elemente (NRC, 1998). Intenzivni uzgoj svinja podrazumeva i upotrebu potpunih smeša za ishranu svih kategorija, prilagođenu njihovoj starosnoj dobi, nameni i genetskom potencijalu.

Proizvodi industrije hrane za životinje, tj. potpune smeše, proizvodi su dobijeni utvrđenim tehnološkim postupkom i upotrebom odgovarajućih sirovina (AEC, 1987).

Hemijski sastav, odnosno hranljiva vrednost krmiva bitan je preduslov za postizanje optimalnih rezultata u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji (Šefer i sar., 1998). Neodgovarajući kvalitet sirovina izaziva dalje promene u pogledu kvaliteta finalnih proizvoda (potpunih smeša), tako da se striktnim pridržavanjem utvrđenih receptura ne postiže uvek i zadovoljavajući kvalitet smeša. Sve ovo nameće potrebu konstantnog praćenja kvaliteta krmiva.

Smeše neodgovarajućeg hemijskog sastava negativno utiču na proizvodne rezultate, a time dovode i do ekonomskih gubitaka u proizvodnji. Odstupanja u hemijskom sastavu mogu uticati na sposobnost očuvanja hraniva pa se upotrebom takvih hraniva mogu očekivati ne samo lošiji proizvodni rezultati već i poremećaji uslovljeni razvojem patogenih mikroorganizama ili njihovih produkata.

Cilj rada je bio da se na osnovu analiza hranljive vrednosti uzoraka smeša za ishranu svinja izvršenih tokom trogodišnjeg perioda (2007–2009. god.), u akreditovanoj laboratoriji Katedre za ishranu i botaniku, ustanovi da li postoje odstupanja od propisanih uslova kvaliteta. Analiziran je sadržaj osnovnih hranljivih materija, a dobijeni rezultati poređeni su sa uslovima kvaliteta propisanim Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010).

Materijal i metode rada / *Material and methods*

U akreditovanoj laboratoriji Katedre za ishranu i botaniku u periodu od 2007. do 2009. godine ukupno je analizirano 65 uzoraka smeša za ishranu svinja sa teritorije Srbije i to: 6 uzoraka potpunih smeša za ishranu suprasnih krmača i nazimica, 9 uzoraka potpunih smeša za ishranu krmača dojara i nerasta, 4 uzorka potpune smeše za prihranjivanje prasadi, 13 uzoraka potpunih smeša za prasad do 15 kg, 12 uzoraka potpunih smeša za prasad od 15 do 25 kg, 10 uzoraka potpunih smeša za svinje u porastu i tovu od 25 do 60 kg i 11 uzoraka potpunih smeša za svinje u porastu i tovu od 60 do 100 kg.

Uzimanje uzoraka za analizu je obavljeno u skladu sa procedurom AS-1064 (1993).

U smešama je određivan sadržaj sirove vlage, pepela, proteina, masti, celuloze i BEM (bezazotnih ekstraktivnih materija).

Priprema uzoraka za analizu obavljena je prema proceduri opisanoj od strane AOAC (1990).

Analiza sadržaja osnovnih hranljivih materija obavljena je prema sledećim procedurama i to: vlaga SRPS ISO 6496/2001; pepeo SRPS ISO 5984/2002; proteini SRPS ISO 5983/2001a; masti SRPS ISO 6492/2001b; celuloza prema dokumentovanoj akreditovanoj metodi laboratorije (DM1); dok je sadržaj BEM određivan kalkulatивно. Sve navedene metode u skladu su sa Pravilnikom o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane (Sl. list SFRJ br. 15/87), Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010) i Propisima Instituta za standardizaciju Srbije.

Rezultati i diskusija / *Results and Discussion*

Rezultati hemijskih analiza sedam tipova najčešće ispitivanih smeša za ishranu svinja u periodu od 2007. do 2009. godine su prikazani u tabeli 1.

Na osnovu prosečne vrednosti hemijskog sastava ispitivanih smeša (tabela 1) može se zaključiti da je kvalitet ispitivanih uzoraka bio zadovoljavajući. Odstupanja od vrednosti propisanih Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010), utvrđena su u prosečnom sadržaju proteina u potpunim smešama za ishranu prasadi od 15 do 25 kg ($17,89 \pm 1,19\%$) i smešama za ishranu svinja u porastu i tovu od 60 do 100 kg ($13,95 \pm 0,53\%$). Utvrđeni prosečni sadržaj masti bio je niži u smešama za prihranjivanje prasadi ($5,99 \pm 0,72\%$) i smešama za ishranu prasadi do 15 kg ($4,95 \pm 1,41\%$). Veći prosečan sadržaj celuloze ($4,08 \pm 0,73\%$) utvrđen je u smešama za prihranjivanje prasadi.

Sa druge strane, utvrđena su značajna odstupanja pojedinačnih uzoraka u odnosu na vrednosti koje su propisane Pravilnikom. Procenat odstupanja hemijskog sastava pojedinačnih uzoraka prikazan je po vrsti ispitivanih smeša i dat u grafikonima 1-7.

Tabela 1. Hemijski sastav smeša za ishranu različitih kategorija svinja ispitivanih u akreditovanoj laboratoriji Katedre za ishranu i bo-
taniku, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu (period 2007–2009. godine) /
Table 1. Chemical composition of mixes for the diet of different categories of pigs examined at the accredited laboratory of the Department for Nutrition and
Botanics of the Faculty for Veterinary Medicine, University of Belgrade (for the period 2007–2009)

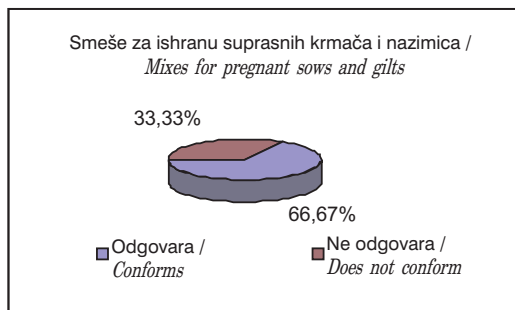
Potpuna smeša za ishranu / Complete diet mix	Smeša za ishranu suprasnih krmača Mix for diet of pregnant sows and gilts $\bar{X} \pm SD$ (%VSM*)	Smeša za ishranu krmača dojara i nerasta Mix for diet of nursing sows and boars $\bar{X} \pm SD$ (%VSM*)	Smeša za ishranu prasadu / Mix for supple- menting diet of piglets $\bar{X} \pm SD$ (%VSM*)	Smeša za ishranu prasadu do 15 kg / Mix for diet of piglets up to 15 kg $\bar{X} \pm SD$ (%VSM*)	Smeša za ishranu prasadu od 15 kg do 25 kg / Mix for diet for piglets from 15–25 kg $\bar{X} \pm SD$ (%VSM*)	Smeša za ishranu svinja u porastu i tovu od 25 do 60 kg / Mix for fattening diets for growing pigs from 25–60 kg $\bar{X} \pm SD$ (%VSM*)	Smeša za ishranu svinja u porastu i tovu od 60 do 100 kg / Mix for fattening diet II for growing pigs from 60–100 kg $\bar{X} \pm SD$ (%VSM*)
Sirova vlaga / Raw moisture	11,78±0,76	11,58±0,59	11,36±2,32	11,11±1,21	11,52±1,02	11,28±0,62	11,83±1,04
Vrednost def. Pravilnikom / Regulations value	Maksimalno / Max 13,5	Maksimalno / Max 13,5	Maksimalno / Max 12,0	Maksimalno / Max 12,0	Maksimalno / Max 13,5	Maksimalno / Max 13,5	Maksimalno / Max 13,5
Sirovi pepeo / Raw ash	5,54±0,64	6,27±1,04	7,49±1,52	6,43±0,78	5,62±0,43	5,27±1,02	5,12±0,82
Vrednost def. Pravilnikom / Regulations value	Maksimalno / Max 8,0	Maksimalno / Max 8,0	Maksimalno / Max 8,0	Maksimalno / Max 8,0	Maksimalno / Max 8,0	Maksimalno / Max 8,0	Maksimalno / Max 8,0
Sirovi proteini / Raw proteins	13,43±0,76	16,28±0,78	24,30±0,31	20,61±0,85	17,89±1,19	16,42±0,62	13,95±0,53
Vrednost def. Pravilnikom / Regulations value	Minimalno / Min 13,0	Minimalno / Min 16,0	Minimalno / Min 22,0	Minimalno / Min 20,0	Minimalno / Min 18,0	Minimalno / Min 16,0	Minimalno / Min 14,0
Sirove masti / Raw fat	3,08±0,25	3,03±0,41	5,99±0,72	4,95±1,41	4,57±1,29	3,63±0,96	3,54±1,06
Vrednost def. Pravilnikom / Regulations value	Nije definisano / Not defined	Nije definisano / Not defined	Minimalno / Min 7,0	Minimalno / Min 5,0	Nije definisano / Not defined	Nije definisano / Not defined	Nije definisano / Not defined

nastavak tabele 1. / cont. Table 1

Potpuna smeša za ishranu / Complete diet mix	Smeša za ishranu suprasnih krmača i nazimica / Mix for diet of pregnant sows and gilts X ± SD (%VSM*)	Smeša za ishranu krmača dojara i nerasta Mix for diet of nursing sows and boars X ± SD (%VSM*)	Smeša za ishranu prihranjivanje prasadi / Mix for supple- menting diet of piglets X ± SD (%VSM*)	Smeša za ishranu prasadi do 15 kg / Mix for diet of piglets up to 15 kg X ± SD (%VSM*)	Smeša za ishranu prasadi od 15 kg do 25 kg / Mix for diet for piglets from 15-25 kg X ± SD (%VSM*)	Smeša za ishranu svinja u porastu i tovu od 25 do 60 kg / Mix for fattening diets for growing pigs from 25-60 kg X ± SD (%VSM*)	Smeša za ishranu svinja u porastu i tovu od 60 do 100 kg / Mix for fattening diet II for growing pigs from 60-100 kg X ± SD (%VSM*)
Sirova celuloza / Raw cellulose	4,14±0,55	4,28±0,62	4,08±0,73	3,81±0,67	3,54±1,33	3,94±0,76	3,70±0,93
Vrednost def. Pravilnikom / Regulations value	Maksimalno / Max 9,0	Maksimalno / Max 7,0	Maksimalno / Max 4,0	Maksimalno / Max 5,0	Maksimalno / Max 6	Maksimalno / Max 7,0	Maksimalno / Max 7,0
BEM	62,03±1,68	58,56±1,91	46,77±1,08	53,09±2,84	56,86±2,66	59,46±2,07	61,87±1,89
Vrednost def. Pravilnikom / Regulations value	Nije definisano / Not defined	Nije definisano / Not defined	Nije definisano / Not defined	Nije definisano / Not defined	Nije definisano / Not defined	Nije definisano / Not defined	Nije definisano / Not defined

% VSM – procenat vazdušno suve materije hrane / percentage of air dry matter of feed

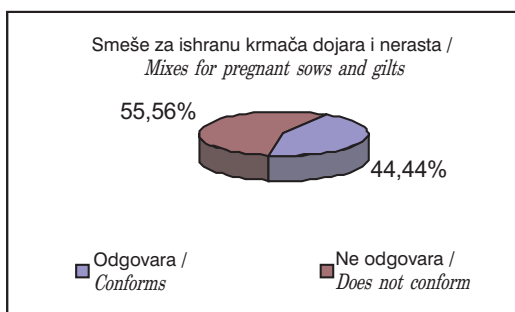
Sadržaj proteina u pojedinačnim uzorcima smeša za ishranu suprasnih krmača i nazimica bio je niži u 2 uzorka tj. 33,33% ispitivanih uzoraka u odnosu na minimalne vrednosti propisane Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010) i prikazan je u grafikonu 1.



Grafikon 1. Procenat uzoraka smeša za ishranu suprasnih krmača i nazimica koje su odstupale od uslova propisanih Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010)

Graph 1. Percentage of samples of mixes for the diet of pregnant sows and gilts that deviated from the conditions prescribed under the Regulations on the quality of animal feed (Official Gazette of the Republic of Serbia No. 4/2010)

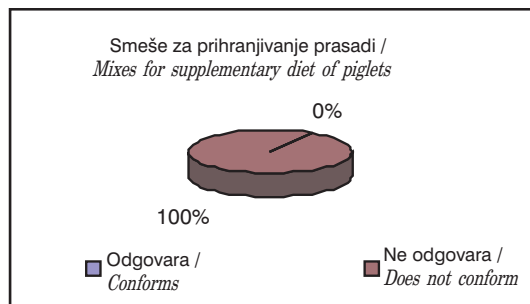
Procenat odstupanja u sadržaju hranljivih materija u pojedinačnim uzorcima smeša za ishranu krmača dojara i nerasta je bio značajan, tako da je procenat proteina bio niži u 5, a procenat pepela viši u jednom ispitivanom uzorku. Sumiranjem rezultata analize može se zaključiti da 55,56 % ispitivanih uzoraka smeša za ishranu krmača dojara i nerasta nije odgovaralo propisanim uslovima, što je i prikazano u grafikonu 2.



Grafikon 2. Procenat uzoraka smeša za ishranu krmača dojara i nerastova koje su odstupale od uslova propisanih Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010)

Graph 2. Percentage of samples of mixes for the diet of nursing sows and boars that deviated from the conditions prescribed under the Regulations on the quality of animal feed (Official Gazette of the Republic of Serbia No. 4/2010)

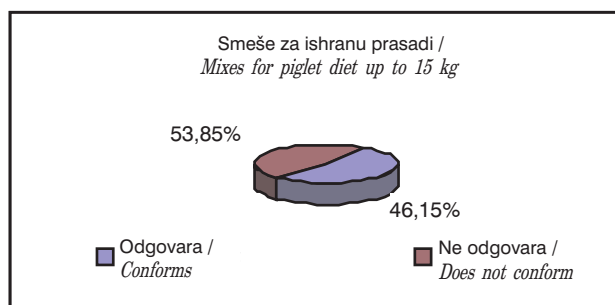
Ispitivanjem uzoraka smeša za prihranjivanje prasadi ustanovljena su najveća odstupanja u odnosu na uslove propisane Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010). Sadržaj masti bio je niži a sadržaj celuloze viši u po 3 uzorka, uz pomenut viši sadržaj vlage u jednom uzorku, što je uslovalo da nijedan od ispitivanih uzoraka nije u potpunosti odgovarao uslovima propisanim Pravilnikom o kvalitetu (grafikon 3).



Grafikon 3. Procenat uzoraka smeša za prihranjivanje prasadi koje su odstupale od uslova propisanih Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010)

Graph 3. Percentage of samples of mixes for the supplementary diet of piglets that deviated from the conditions prescribed under the Regulations on the quality of animal feed (Official Gazette of the Republic of Serbia No. 4/2010)

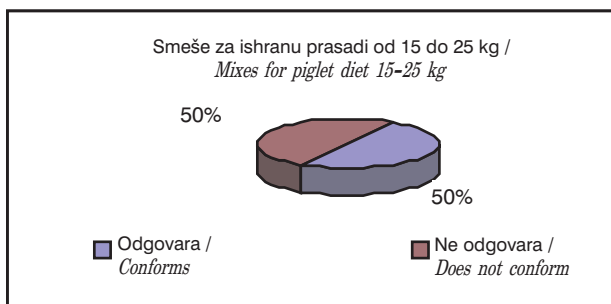
Analizom sadržaja hranljivih materija u pojedinačnim uzorcima smeša za ishranu prasadi do 15 kg utvrđen je niži sadržaj masti u 4 uzorka, niži sadržaj proteina u 2 uzorka i viši sadržaj vlage u jednom uzorku. Opisana odstupanja su uslovala to da 53,85% ispitanih uzoraka nije odgovarao uslovima propisanim Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010), što je i prikazano u grafikonu 4.



Grafikon 4. Procenat uzoraka smeša za ishranu prasadi do 15 kg koje su odstupale od uslova propisanih Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 41/2010)

Graph 4. Percentage of samples of mixes for diet of piglets up to 15 kg that deviated from the conditions prescribed under the Regulations on the quality of animal feed (Official Gazette of the Republic of Serbia No. 4/2010)

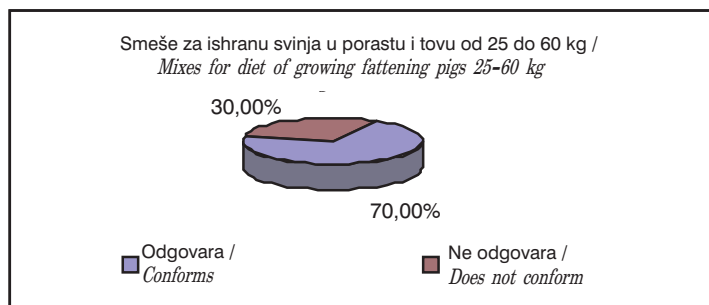
Prosečan sadržaj proteina u 12 uzoraka ispitanih smeša za ishranu prasadi od 15 do 25 kg je bio ispod propisanog minimuma. Sadržaj proteina bio je niži u 6 uzoraka, a sadržaj vlage viši u jednom od ispitivanih uzoraka. Ova odstupanja su uslovlila da kvalitet 50% ispitivanih uzoraka nije bio u skladu sa uslovima kvaliteta propisanim Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010), što je i prikazano u grafikonu 5.



Grafikon 5. Procenat uzoraka smeša za ishranu prasadi od 15 do 25 kg koje su odstupale od uslova propisanih Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010)

Graph 5. Percentage of samples of mixes for diet of piglets from 15 to 25 kg that deviated from the conditions prescribed under the Regulations on the quality of animal feed (Official Gazette of the Republic of Serbia No. 4/2010)

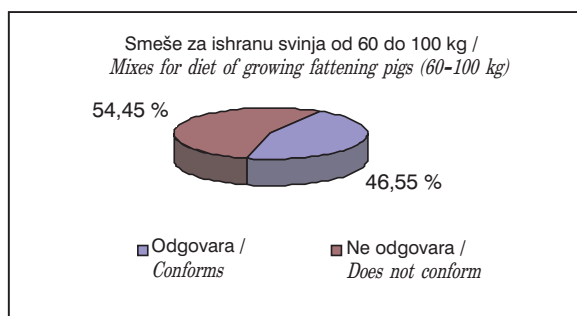
Procenat proteina u 3 od ukupno 10 analiziranih uzoraka smeša za ishranu svinja u porastu i tovu od 25 do 60 kg je bio ispod propisanog minimuma, što je i uslovlilo da 30 % uzoraka ne odgovara uslovima kvaliteta propisanih Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010), što je prikazano u grafikonu 6.



Grafikon 6. Procenat uzoraka smeša za ishranu svinja u porastu i tovu od 25 do 60 kg koje su odstupale od uslova propisanih Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010)

Graph 6. Percentage of samples of mixes for diet I for growing fattening pigs from 25 to 60 kg that deviated from the conditions prescribed under the Regulations on the quality of animal feed (Official Gazette of the Republic of Serbia No. 4/2010)

Analizom sadržaja hranljivih materija u pojedinačnim uzorcima hrane za ishranu svinja u porastu i tovu od 60 do 100 kg, utvrđeno je odstupanje u sadržaju proteina u 6 od ukupno 11 ispitivanih uzoraka tj. da je procenat proteina u 54,45 % pojedinačnih uzoraka bio ispod Pravilnikom propisanog minimuma, što je prikazano u grafikonu 7.



Grafikon 7. Procenat uzoraka smeša za ishranu svinja u porastu i tovu od 60 do 100 kg koje su odstupale od uslova propisanih Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010)

Graph 7. Percentage of samples of mixes for diet of growing fattening pigs from 60 to 100 kg that deviated from the conditions prescribed under the Regulations on the quality of animal feed (Official Gazette of the Republic of Serbia No. 4/2010)

Analizom dobijenih rezultata uočava se da u proizvodnji smeša za ishranu svinja postoje izvesne greške koje se ogledaju u odstupanjima u sadržaju hranljivih materija u pojedinačnim uzorcima i mogu uticati na proizvodne rezultate životinja. Utvrđena odstupanja se uglavnom odnose na niži sadržaj proteina i masti i viši sadržaj celuloze.

Greške mogu nastati u svim segmentima proizvodnje, a zasnivaju se na razlikama u kvalitetu sirovina, ljudskom faktoru i greškama u tehnologiji proizvodnje. Posebnu pažnju treba obratiti na kvalitet sirovina, jer kvalitet sirovina uslovljava kvalitet proizvoda. Zato se kao prioritet nameće kontrola ulaznih sirovina u fabrikama hrane za životinje. Kontrola gotovih proizvoda u fabrikama stočne hrane je drugo mesto na kome se potvrđuje kvalitet stočne hrane, a tek onda na red dolazi kontrola gotovih proizvoda direktno u prometu, sa čime se slažu i Jakić-Dimić i sar. (1997).

Rezultati ovih ispitivanja u skladu su sa nalazima Mašića i sar. (2002), koji su analizom hemijskog sastava 455 uzoraka smeša za ishranu svinja ustanovili odstupanja u čak 185 uzoraka odnosno 40,66% ispitivanih uzoraka. Autori navode da su najveća odstupanja utvrđena u smešama za ishranu prasadi. Do sličnih rezultata su došli i Šefer i sar. (1998) koji su ispitujući kvalitet krmnih smeša za ishranu živine uočili značajna odstupanja u hranljivoj vrednosti velikog broja ispitivanih uzoraka i tom prilikom skrenuli pažnju na značaj monitoringa. Sa druge strane, rezultati ovih ispitivanja se ne slažu sa rezultatima Bengin i sar. (2008), koji

su na osnovu ispitivanja 257 uzoraka smeša za ishranu različitih kategorija svinja sa područja Srbije zaključili da je kvalitet odgovarao propisanoj zakonskoj regulativi u skoro svim uzorcima. Pomenuti autori su ustanovili odstupanja u sadržaju proteina u 7,69% uzoraka smeša za ishranu prasadi do 15 kg, 28,57% uzoraka smeša za ishranu prasadi od 15 do 25 kg i 1,64% uzoraka smeša za ishranu svinja u tovu od 60 do 100 kg.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Analizom ispitivanih smeša utvrđena su odstupanja u hemijskom sastavu pojedinačnih uzoraka potpunih smeša u odnosu na vrednosti propisane Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010) uz napomenu da su navedena odstupanja minimalna i da uglavnom nisu uticala na ukupan prosečan kvalitet krmnih smeša.

2. Sadržaj proteina u potpunim smešama za ishranu prasadi od 15 do 25 kg i smešama za ishranu svinja u porastu i tovu od 60 do 100 kg u većem broju uzoraka bio je niži u odnosu na vrednosti propisane Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010).

3. Niži sadržaj masti u odnosu na vrednosti koje su propisane Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010) utvrđen je u smešama za prihranjivanje prasadi i smešama za ishranu prasadi do 15 kg, dok je viši sadržaj celuloze utvrđen u smešama za ishranu prasadi do 15 kg.

4. Dobijeni rezultati nesumljivo ukazuju na potrebu stalnog i višestepenog monitoringa sirovina i gotovih proizvoda, a u cilju očuvanja zdravlja i optimalnog iskorišćenja proizvodnog potencijala životinja.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je finansirao sredstvima projekta Ministarstva nauke, Republike Srbije, Molekularno-genetička i ekofiziološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnji bezbedne hrane, Ev. br. III 46002 / *This work was financed by funds from Project No. III 46002 Molecular-genetic and ecophysiological investigations in the protection of autochthonous animal genetic resources, the preservation of welfare, health and reproduction of breeding animals, and the production of safe food of the Ministry of Science of the Republic of Serbia.*

Literatura / References

1. AEC. Tables AEC: Recomendações para Nutrição Animal. 5 ed, Rhone-Poulenc Animal Nutrition, Commeny, 1987.
2. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Thirteenth Edition, Association of Official Analytical Chemists (publisher), Washington, DC 20044, USA, 1018, 1990.
3. AS-1064, Sampling Feed for Analysis, 1993.

4. Bengin D, Katić I, Pupavac S, Kosić M, Protić N. Kvalitet i mikrobiološka ispravnost hrane i smeša u 2007. godini. Zbornik naučnih radova Savetovanja veterinara i agronoma PKB 2008; 14(3-4): 19-24.
5. DM1. Određivanje sadržaja celuloze - dokumentovana akreditovana metoda Laboratorije Katedre za ishranu i botaniku.
6. Jakić-Dimić D, Panin M, Sinovec Z, Vladić S, Keserović B. Pregled kvaliteta krmnih smeša za ishranu domaćih životinja na teritoriji Srbije. VII simpozijum tehnologa stočne hrane "Advances in feed technology" 1997; 292-9.
7. Mašić Z, Jakić-Dimić D, Stanačević V, Sinovec Z. Pregled kvaliteta smeša za ishranu svinja. Veterinarski glasnik 2002; 56(1-2): 41-52.
8. NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of swine, 10th ed, National Academy Press, Washington, D.C. USA, 1998.
9. Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje (Službeni glasnik RS br. 4/2010).
10. Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane (Sl. list SFRJ br. 15/87).
11. Šefer D, Jovanović N, Marković R, Krnjajić D, Nedeljković Trailović J, Sinović Z. Pregled kvaliteta krmnih smeša za ishranu živine. Veterinarski glasnik 1998; 52(7-8): 425-35.
12. SRPS ISO 5983/2001. Određivanje sadržaja azota i izračunavanje sadržaja proteina (volumetrijski). Institut za standardizaciju Srbije, 2001a.
13. SRPS ISO 5984/2002. Određivanje sadržaja sirovog pepela (gravimetrijski). Institut za standardizaciju Srbije, 2002.
14. SRPS ISO 6492/2001. Određivanje sadržaja masti (gravimetrijski), Institut za standardizaciju Srbije, 2001b.
15. SRPS ISO 6496/2001. Određivanje sadržaja vlage (gravimetrijski), Institut za standardizaciju Srbije, 2001c.

ENGLISH

CHEMICAL COMPOSITION OF COMPLETE FODDER MIXES FOR PIG DIET DURING 2007-2009

D. Šefer, B. Petrujković, Radmila Marković, Svetlana Grdović, S Radulović, D. Jovanović

Intensive pig breeding implies, among other things, the use of complete mixes in their diet in correspondence with the animals' age and purpose. In the course of a three-year period (2007-2009) the accredited laboratory of the Department for Nutrition and Botany of the Faculty for Veterinary Medicine, University of Belgrade, analysed 65 fodder mix samples from the territory of Serbia intended for the diet of all categories of pigs, namely: 6 samples of complete mixes for the diet of pregnant sows and gilts, 9 samples of complete mixes for the diet of nursing sows and boar, 4 samples of complete mixes for enhanced diet of piglets, 13 samples of complete mixes for piglets in programme I up to 15 kg, 12 samples of complete mixes for piglets in programme II from 15-25 kg, 10 samples of complete mixes for growing pigs in fattening programme I from 25-60 kg, and 11 samples of complete mixes for pigs in fattening programme II from 60-100 kg.

The analyses covered the contents of the elementary nutritive matter and the obtained results were compared with the quality conditions prescribed under the Regulations on the quality of animal feed (Official Gazette of the Republic of Serbia No. 41/09).

It was established that there were certain deviations with regard to the values presented in the Regulations on the quality of animal feed (Official Gazette of the Republic of Serbia No. 41/09) in the average protein content in complete mixes for piglet diet II, 15-25 kg ($17.89 \pm 1.19\%$) and in the mixes for growing pig diet II, 60-100 kg ($13.95 \pm 0.53\%$). The established average fat content was lower in the mixes for enhanced piglet diet ($5.99 \pm 0.72\%$) and in mixes for piglet diet I, up to 15 kg ($4.95 \pm 1.41\%$). A higher average cellulose content ($4.08 \pm 0.73\%$) was established in mixes for enhanced piglet diet.

Furthermore, significant differences from the values prescribed under the Regulations were established in certain samples.

The established differences in the chemical composition of certain samples of the examined mixes without a doubt indicate the need for constant and multilevel monitoring of raw materials and finished products in order to preserve health and to ensure the best possible utilization of the production potential of animals.

Key words: fodder mixes, pigs, chemical composition, quality

РУССКИЙ

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПОЛНЫХ КОРМОВЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ КОРМЛЕНИЯ СВИНЕЙ, АНАЛИЗИРОВАННЫХ В АККРЕДИТОВАННОЙ ЛАБОРАТОРИИ КАФЕДРЫ КОРМЛЕНИЯ И БОТАНИКИ В ПЕРИОДЕ 2007-2009 ГОДА

Д. Шефер, Б. Петруйкич, Р. Маркович, С. Грдович, С. Радулович, Д. Йованович

Интенсивное разведение свиней между прочим подразумевает и употребление полных смесей в их кормлении, приспособленное возрасту и назначению. В течение трёхлетнего периода (2007-2009 г.) в аккредитованной лаборатории Кафедры кормления и ботаники, Факультета ветеринарной медицины, Университета в Белграде анализировано 65 образчиков смесей с территории Сербии, назначенных для кормления всех категорий свиней а именно: 6 образчиков полных смесей для кормления супоросных свиноматок и зимних свиней, 9 образчиков полных смесей для подкармливания поросят, 13 образчиков полных смесей для поросят 1 до 15 кг, 12 образчиков полных смесей для поросят 11 от 15 до 25 кг, 10 образчиков полных смесей для свиней в росте и откорме 1 от 25 до 60 кг и 11 образчиков полных смесей для свиней в росте и откорме 11 от 60 до 100.

Анализировано содержание основных питательных веществ, а полученные результаты сравнены с условиями качества, предписанным Инструкцией о качестве корма для животных (Службени гласник РС бр. 41/09).

Утверждены отступления от стоимостей, предписанных Инструкцией о качестве корма для животных (Службени гласник РС бр. 41/09), в среднем содержании протеинов в полных смесях для кормления поросят 11 от 15 до 25 кг ($17.89 \pm 1.19\%$) и смесей для кормления свиней в росте и откорме 11 от 60 до 100 кг ($13.95 \pm 0.53\%$). Утверждённое среднее содержание жира было ниже в смесях для подкармливания поросят (5.99 ± 0.72) и смесях для кормления поросят 1 до 15 кг

($4,95 \pm 1,41\%$). Бóльшее среднее содержание целлюлозы ($4,08 \pm 0,73\%$) утверждено в смесях для подкармливания поросят.

С другой стороны утверждены значительные отступления отдельных образчиков в отношении стоимостей, предписанные Инструкцией.

Утверждённые отступления в химическом состав отдельных образчиков испытанных смесей несомненно указывают на нужду постоянного многостепенного мониторинга сырья и готовых изделий, а с целью сохранения здоровья и что более оптимального использования производственного потенциала животных.

Ключевые слова: кормовые смеси, свиньи, химический состав, качество

**FORENZIČKA ANALIZA KOSTIJU U *REGIO ANTEBRACHII*
SRNE (*Capreolus capreolus*) I OVCE (*Ovis aries*) U CILJU
UTVRĐIVANJA PRIPADNOSTI ŽIVOTINJSKOJ VRSTI***
***FORENSIC ANALYSIS OF BONE IN REGIO ANTEBRACHII OF
DEER (Capreolus capreolus) AND SHEEP (Ovis aries) IN ORDER TO
DETERMINE ORIGIN OF ANIMAL SPECIES***

M. Blagojević, Jelena Aleksić**

Česti su slučajevi krivolova u kojima je potrebno da se na osnovu morfoloških karakteristika kostiju utvrdi kojoj životinjskoj vrsti pripadaju.

U ovom prikazu je Katedri za sudsku veterinarsku medicinu i zakonske propise dostavljen materijal za ekspertizu koga su činili leva i desna podlakatna kost (*Ossa antebrachii*) i 12 delova rebara (*Costae*). Rebra su bila potpuno izlomljena, tako da su u cilju identifikacije pripadnosti kostiju određenoj životinjskoj vrsti korišćene samo podlakatne kosti.

Obavljena je forenzička analiza metodom komparacije osteoloških karakteristika dostavljenih kostiju sa muzejskim uzorcima kostiju srne i ovce.

Podlakatne kosti (*Ossa antebrachii*) srne su vitke i tanke, a kod ovce su jače i teže. Kod srne postoje dva međukoštana prostora (*Spacium interosseum antebrachii*), a kod ovce je jedan. Lakatna kvruga (*Tuber olecrani*) je kod ovce više trouglastog oblika, a kod srne je podeljena na kranijalnu i kaudalnu kvržicu. *Tuberositas radii* je kod ovce bolje izražen.

Na osnovu morfoloških karakteristika spornih kostiju utvrdili smo da je dostavljeni materijal poreklom od srne.

Ključne reči: komparativna forenzička osteologija, podlakatne kosti, srna, ovca

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

** Dr sc. vet. med. Miloš Blagojević, docent, Katedra za anatomiju; mr sc. vet. med. Jelena Aleksić, asistent, Katedra za sudsku veterinarsku medicinu i zakonske propise, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Uvod / Introduction

Metoda određivanja pripadnosti kostiju određenoj životinjskoj vrsti na osnovu morfoloških karakteristika je jedna od najčešće korišćenih u forenzičkim slučajevima (krivolov, prevare, krađe, falsifikovanje namirnica animalnog porekla). U nekim slučajevima može da bude i najsigurnija, posebno kada nedostaje materijal potreban za sprovođenje drugih laboratorijskih metoda u cilju identifikacije životinjskih vrsta.

Da bismo ustanovili kojoj životinjskoj vrsti pripadaju sporne kosti uporedili smo delove kostiju sa kostima srne i ovce (Stanojević i Nikolić, 1975; Stanojević i sar., 1976), jagnjeta i kunića (Stanojević i sar., 1981; Stanojević i sar., 1983), kunića i zeca (Stanojević i sar., 1981; Stanojević i sar., 1983), domaćih životinja sisara (König i Liebich, 2004).

Kosti srne i ovce su slične, ali se istovremeno i razlikuju. Na osnovu razlika može relativno jednostavno, brzo i egzaktno da se odredi vrsta životinje kojoj kosti ili njihovi delovi pripadaju.

Cilj ovog rada je da se opišu uporedne razlike podlaktanih kostiju (*Ossa antebrachii*) srne i ovce, na osnovu kojih je moguće nesumnjivo utvrditi poreklo spornih kostiju.

Materijal i metode rada / Material and methods

Katedri za sudsku veterinarsku medicinu i zakonske propise dostavljena je leva i desna podlaktatna kost i 12 delova rebara, nepoznatog porekla, sa zahtevom da se forenzičkom ekspertizom ustanovi kojoj životinjskoj vrsti pripadaju. Na osnovu pregleda rebara to nije bilo moguće, jer su nedostajali proksimalni i distalni delovi, a rebra su bila u fragmentima. Zahvaljujući očuvanosti leve i desne podlaktatne kosti sprovedena je detaljna forenzička osteološka analiza.

Sa podlaktanih kostiju grubo su odstranjeni ostaci mišića, a zatim su termički obrađeni u autoklavu. Posle kuvanja, kosti su tretirane u 30% rastvoru H₂O₂ radi beljenja, osušene su i fotografisane. Za komparaciju sa kostima nepoznatog porekla korišćene su odgovarajuće kosti srne i ovce.

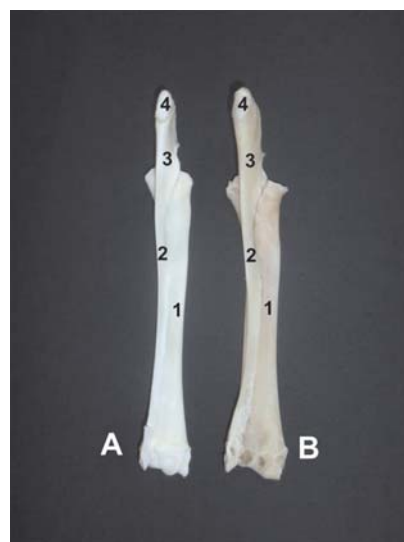
Rezultati i diskusija / Results and Discussion

U podlaktatne kosti ubrajaju se dve duge kosti, koje se pružaju skoro paralelno (Mrvić-Jovičić, 2003; König i Liebich, 2004): žbica – Radius (slike 1 A₁, B₁) i lakatna kost – Ulna (slike 2 A₂, B₂, 3 A₂, B₂, 4 A₃, B₃). Radius leži kraniomedijalno, a Ulna laterokaudalno. Ove dve kosti međusobno su vezane nepokretnom vezom, a između njih se nalazi međukoštani prostor (*Spatium interosseum antebrachii*) (Blagojević i sar., 1999; Ellenberger i Baum, 1973; Ellenberger i sar., 1977; Janković i Popović, 1985; Nikolić i sar., 2011; Popesko, 1980; Rebesko i Rigler, 1983; Rebesko i sar., 1986; Sisson, 1962).



Slika 1. Podlakatne kosti (*Ossa antebrachii* – Radius i Ulna) srne A i ovce B. Kranijalna strana, levi prednji ekstremitet
Figure 1. Forearm bones (*ossa antebrachii radius and ulna*) of deer A and sheep B. Cranial side, front left extremity

1-Radius, 2-Facies articularis carpea, 3-Tuber olecrani, 4-Processus anconeus, 5-Incisure trochlearis



Slika 2. Podlakatne kosti (*Ossa antebrachii*–Radius i Ulna) srne A i ovce B. Kaudalna strana, levi prednji ekstremitet
Figure 2. Forearm bones (*ossa antebrachii radius and ulna*) of deer A and sheep B. Caudal side, front left extremity

1-Radius, 2-Ulna, 3-Olecranon, 4-Tuber olecrani

Podlakatne kosti (*Ossa antebrachii*) srne su dve vitke, tanke kosti u odnosu na ovcu kod koje su te kosti mnogo jače i teže (Stanojević i Nikolić, 1975). Naročito treba istaći međukoštane prostore (*Spatium interosseum antebrachii*). Kod srne postoje dva (Stanojević i sar., 1975), a kod ovce jedan (König i Liebich, 2004; Nikolić i sar., 2011).

Kod srne je proksimalni međukoštani prostor (*Spatium interosseum antebrachii proximale*) dužine 5 cm i širine 0,1–0,3 cm (slike 3 A₅, 4 A₇), a distalni (*Spatium interosseum antebrachii distale*) dužine 3,5cm i širine 0,1cm (slika 3 A₆). Kod ovce je proksimalni (*Spatium interosseum antebrachii proximale*) dužine 2 cm i širine 0,3 cm (slike 3 B₅, 4 B₇).

Lakatna kost (*Ulna*) srne je tanka, vitka kost i naslanja se samo kranijalnim rubom na žbicu–Radius (slika 2 A₂). Kod ovce je ta kost jača i naslanja se celom svojom površinom (slika 2 B₂).

Lakatna kvruga (*Tuber olecrani*) je u ovce više trouglastog oblika (slike 3 B₃, 4 B₅), a u srne je podeljena na kranijalnu i kaudalnu kvržicu (slike 3 A₃, 4 A₅).

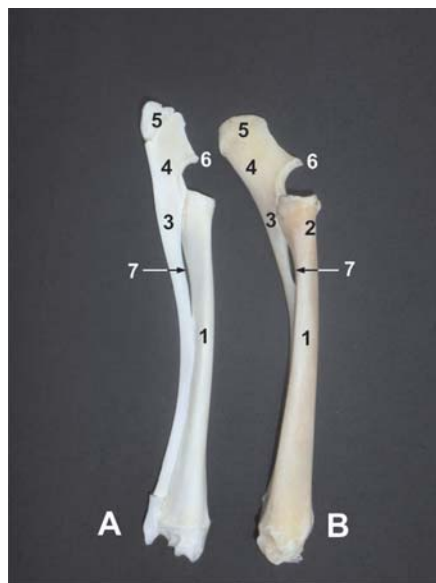
Na kranijomedijalnoj strani glave žbice (*Radius*) nalazi se kvržica sa rapavom površinom (*Tuberositas radii*), koja je kod ovce (slike 3 B₄, 4 B₂) bolje



Slika 3. Podlakatne kosti (*Ossa antebrachii* – Radius i Ulna) srne A i ovce B. Lateralna strana, levi prednji ekstremitet

Figure 3. Forearm bones (*ossa antebrachii* – radius and ulna) of deer A and sheep B. Lateral side, front left extremity

1-Radius, 2-Ulna, 3-Tuber olecrani, 4-Tuberositas radii, 5-Spatium interosseum antebrachii proximale, 6- Spatium interosseum antebrachii distale



Slika 4. Podlakatne kosti (*Ossa antebrachii* – Radius i Ulna) srne A i ovce B. Medijalna strana, levi prednji ekstremitet

Figure 4. Forearm bones (*ossa antebrachii* – radius and ulna) of deer A and sheep B. Medial side, front left extremity

1-Radius, 2-Tuberositas radii, 3-Ulna, 4-Olecranon, 5-Tuber olecrani, 6-Processus anconeus, 7-Spatium interosseum antebrachii proximale

izražena. Na distalnom delu žbice (Radius) i lakatne kosti (Ulna) srne i ovce teško je morfološki uočiti razliku (Stanojević i Nikolić, 1975).

Zaključak / Conclusion

Na osnovu poređenja morfoloških karakteristika dostavljenih podlakatnih kostiju (Ossa antebrachii) sa podlakatnim kostima srne i ovce, a u cilju identifikacije porekla dostavljenog materijala, utvrdili smo da su sporne kosti poreklom od srne.

Literatura / References

1. Blagojević Z, Mrvić V, Jovanović S. Praktikum za vežbe iz anatomije (Osteologija). Beograd, 1999.
2. Ellenberger W, Baum H. Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere. Verlag von Julius Springer, 1973.
3. Ellenberger W, Baum H. Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere. Berlin: Springer-Verlag, New York: Heidelberg, 1977.
4. Janković Ž, Popović S. Anatomija domaćih životinja, Osteologija i miologija. Veterinarski fakultet, Savez veterinara i veterinarskih tehničara Jugoslavije, Odbor za izdavačku delatnost, 1985.
5. König EH, Liebich GH. Veterinary anatomy of Domestic Mammals. Stuttgart: Schattauer-GmbH, 2004.
6. Mrvić-Jovičić V. Atlas komparativne anatomije domaćih životinja. Beograd: „LIR BG doo“, 2003.
7. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band I, Bewegungsapparat, Berlin und Hamburg: Paul Parey, 1968.
8. Nikolić Z, Blagojević Z, Mrvić V, Blagojević M. Praktikum za vežbe iz anatomije I. Beograd, 2011.
9. Nomina anatomica veterinaria. Fourth edition. Gent, Zürich and Ithaca, New York, 1994.
10. Nomina anatomica veterinaria. Fifth edition. Editorial Committee Hannover, Columbia, Gent, Sapporo, 2005.
11. Popesko P. Atlas topografske anatomije domaćih životinja. Treći svezak – zdjelica i udovi. Zagreb: „Jugoslovenska medicinska naklada“. 1980.
12. Rebesko B, Rigler L. Slikovni priručnik za anatomiju domaćih živali. Ljubljana: „Državna založba Slovenije“, 1983.
13. Rebesko B, Rigler L, Zobundžija M, Janković Ž. Slikovni priručnik anatomije domaćih živali. Ljubljana: „Državna založba Slovenije“, 1986.
14. Sisson S. The anatomy of the domestic animals. Philadelphia London: W. B. Saunders Company, 1962.
15. Stanojević D, Nikolić Z. Upporedne karakteristike pojedinih kostiju prednjeg ekstremiteta srne (*Capreolus capreolus*) i ovce (*Ovis aries*) u cilju utvrđivanja pripadnosti vrste životinja. Veterinarski glasnik 1975; 4: 291-5.
16. Stanojević D, Nikolić Z, Drekić D. Upporedne karakteristike pojedinih kostiju distalnog dela prednjeg i zadnjeg ekstremiteta srne (*Capreolus capreolus*) i ovce (*Ovis*

- aries*) u cilju utvrđivanja pripadnosti vrste životinja. Veterinarski glasnik 1976; 8: 701-8.
17. Stanojević D, Nikolić Z, Blagojević Z. Forenzički značaj morfoloških razlika kostiju prednjeg ekstremiteta jagnjeta i kunića. Veterinarski glasnik 1981; 35(5): 433-42.
18. Stanojević D, Nikolić Z, Blagojević Z. Forenzički značaj morfoloških razlika kostiju prednjeg i zadnjeg ekstremiteta kunića (*Oryctolagus cuniculus*) i zeca (*Lepus timidus*). Zbornik radova X seminara inovacija znanja veterinara. Beograd, 1981; 283-8.
19. Stanojević D, Nikolić Z, Blagojević Z. Forenzički značaj morfoloških razlika kostiju glave jagnjeta i kunića. Veterinarski glasnik 1983; 37(4): 311-6.
20. Stanojević D, Nikolić Z, Blagojević Z. Forenzički značaj morfoloških razlika kostiju kunića (*Oryctolagus cuniculus*) i zeca (*Lepus europeus*). Veterinarski glasnik 1983; 37(6): 455-63.
21. Šijački N, Jablan-Pantić O, Pantić V. Morfologija domaćih životinja. 5. izd. Beograd: „Nauka”, 1997.

ENGLISH

FORENSIC ANALYSIS OF BONE IN REGIO ANTEBRACHII OF DEER (*Capreolus capreolus*) AND SHEEP (*Ovis aries*) IN ORDER TO DETERMINE ORIGIN OF ANIMAL SPECIES

M. Blagojević, Jelena Aleksić

There are frequent cases of poaching in which it is necessary to determine to which animal species the prey belonged on the basis of morphological characteristics of the bone.

In this case, the Department of Forensic Medicine received material for giving an expert opinion on the left and right forearm (radius and ulna) and twelve pieces of the ribs. The ribs were completely broken, so in order to identify the bones as belonging to a particular animal species, only the radius and ulna were used. Forensic analysis was performed by comparing the osteological features of the delivered bones with those of museum specimens of deer and sheep bones.

The forearm (*ossa antebrachii*) of the deer is slender and thin, and it is massive and heavier in sheep. There are two interosseous spaces (*spatium interosseum antebrachii*) of the forearm in the deer and only one in the sheep. The olecranon tuber (*tuber olecrani*) of the sheep is triangular in shape, and in deer it is divided into cranial and caudal prominences. The radial tuberosity (*tuberositas radii*) of the sheep is better defined.

Based on morphological characteristics of the disputed bones we found that the submitted material originated from a doe.

Key words: forearm (radius and ulna), deer, sheep

СУДЕБНЫЙ АНАЛИЗ КОСТЕЙ В *PESIO ANTEBRACHII* СЕРНЫ (САМКИ) (*Capreolus capreolus*) И ОВЦЫ (*Ovis aries*) С ЦЕЛЮ УТВЕРЖДЕНИЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ЖИВОТНОМУ ВИДУ

М. Благоевич, Елена Алексич

Частые случаи браконьерства в которых нужно на основе морфологических характеристик костей утвердить которому животному виду принадлежат.

В этом показе Кафедре судебной ветеринарной медицины и законных порядков доставлен материал для экспертизы, кого составляли левая и правая подлоктевая кость (*Ossa antebrachii*) и 12 частей ребёр (*Costae*). Ребра были вполне выломанные, так, что с целью идентификации принадлежности костей определённому животному виду использованы только подлоктевые кости.

Сделан судебный анализ методом сравнения остеологических характеристик, доставленных костей с музейными образчиками костей серны (самки) и овцы.

Подлоктевые кости (*Ossa antibrachii*) серны (самки) гибкие и тонкие, а у овцы более сильные и более тяжёлые. У серны (самки) существуют два межкостных простора (*Spatium interosseum antibrachii*), а у овцы один. Локтевая шишка (*Tuber olecrani*) у овцы больше треугольной формы, а у серны (самки) разделена на краниальную и каудальную шишку. *Tuberositas radii* у овцы лучше выражена.

На основе морфологических характеристик спорных костей мы утвердили, что доставленный материал происхождением от серны (самки).

Ключевые слова: сравнительная судебная остеология, подлоктевые кости, серна (самка), овца

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
U BEOGRADU 2011-2012. GODINE

Vukašinović Lj. Ivana

Rođena 26. 02. 1985. u Prijepolju
Diplomirala 26. 04. 2012.
Stalno mesto boravka Prijepolje
Salka Veljovića 10

Miloš G. Ivan

Rođen 18. 10. 1976. u Kovinu
Diplomirao 26. 04. 2012.
Stalno mesto boravka Požarevac
Jugovićeve 52

Milosavljević M. Milan

Rođen 13. 01. 1982. u Kruševcu
Diplomirao 26. 04. 2012.
Stalno mesto boravka Kruševac
Damnjana Maksića 8

Baranac M. Mirjana

Rođena 19. 09. 1985. u Beogradu
Diplomirala 24. 04. 2012.
Stalno mesto boravka Obrenovac
Ulica 4-ta br. 5

Mihajlović J. Mladen

Rođen 13. 07. 1982. u Bijeljini,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 23. 04. 2012.
Stalno mesto boravka Bijeljina
Račanska 110

Stojadinović V. Draga

Rođena 01. 10. 1984. u Užicu
Diplomirala 18. 04. 2012.
Stalno mesto boravka Arilje
Pogled b.b.

Kostić Lj. Marko

Rođen 17. 06. 1986. u Smed. Palanci
Diplomirao 30. 12. 2011.
Stalno mesto boravka Lozovik
Bože Radića 35

Kostić M. Draginja

Rođen 24. 05. 1984. u Smederevu
Diplomirao 22. 11. 2011.
Stalno mesto boravka Smederevo
Karadorđeva 45/12

Čikojević N. Mladen

Rođen 09. 05. 1982. u Banja Luci
R. Srpska, BiH
Diplomirao 09. 04. 2012.
Stalno mesto boravka Plijazvor
Jovan Jovanović Zmaj 31

Trikoš Z. Nikola

Rođen 11. 01. 1980. u Čačku
Diplomirao 23. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Čačak
Svetog Save 1/23

Benković J. Damir

Rođen 13. 07. 1986. u Somboru
Diplomirao 30. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Sombor
A. Šarčevića 26

Rosić J. Nataša

Rođena 20. 11. 1983. u Livnu, BiH
Diplomirala 23. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Beograd
Braće Jerković 117

Ignjatović D. Božidar

Rođen 29. 12. 1983. u Šapcu
Diplomirao 28. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Šabac
Leonarda da Vinčija 49/6

Cvetojević B. Đorđe

Rođen 08. 08. 1987. u Beogradu
Diplomirao 28. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Borča
Olge Petrov 35 b

Bojinović P. Jovica

Rođen 09. 11. 1979. u Glamoču, BiH
Diplomirao 26. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Laktaši
Vrbaska bb

Plojović Ć. Lidija

Rođena 18. 06. 1977. u Požarevcu
Diplomirala 23. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Požarevac
Vlastimira Carevca 2a/11

Kadić J. Mladen

Rođen 08. 06. 1979. u Prijedoru, BiH
Diplomirao 19. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Prijedor
Vuka S. Karadžića 30c

Đapa M. Branko

Rođen 01. 07. 1984. u Kikindi
Diplomirao 22. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Kikinda
Dušana Vasiljeva 50/A

Budevac M. Miloš

Rođen 26. 03. 1984. u Kraljevu
Diplomirao 22. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Kraljevo
Cara Dušana 17/14

Davitkov B. Darko

Rođen 20. 11. 1987. u Pirotu
Diplomirao 26. 03. 2012.
Stalno mesto boravka S. Željuša bb

Krunić Z. Miloš

Rođen 08. 11. 1985. u Valjevu
Diplomirao 23. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Valjevo
Dr Pantića 27

Stojanović M. Milovan

Rođen 03. 11. 1987. u Kraljevu
Diplomirao 19. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Vrnjačka Banja
Lipovačka 12

Blagojević D. Ksenija

Rođena 06. 07. 1984. u Zrenjaninu
Diplomirala 16. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Zrenjanin
Brigadira Ristića B2 16

Milovanović D. Dalibor

Rođen 14. 01. 1986. u Smederevu
Diplomirao 15. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Srednjevo
1. maj 11

Trifković Lj. Aleksandar

Rođen 13. 06. 1985. u Šapcu
Diplomirao 14. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Gornja Vranjska
Kralja Milana 24

Milisavljević M. Tanja

Rođena 16. 09. 1987. u Valjevu
Diplomirala 12. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Popučke

Živak J. Jelena

Rođena 09. 01. 1985. u Mostaru, BiH
Diplomirala 16. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Beograd
Nedeljka Gvozdenovića 2/7

Vuković M. Jelica

Rođena 13. 12. 1986. u Trebinju, BiH
Diplomirala 18. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Bileća,
R. Srpska, Meka Gruda bb

Raković Đ. Matija

Rođen 14. 07. 1986. u Požegi
Diplomirao 18. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Požega
M. Selo bb

Pešić M. Darko

Rođen 23. 09. 1986. u Vranju
Diplomirao 17. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Vranje
Pop Lukina 4

Tarbuk P. Aleksandra

Rođena 05. 10. 1981. u Beogradu
Diplomirala 12. 07. 2012
Stalno mesto boravka Beograd
Zdravka Čelara 2

Oljača S. Svetozar

Rođen 05. 06. 1986. u Bihaću, BiH

Diplomirao 13. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Perlez
Đure Jakšića 1

Ilić Z. Milica

Rođena 19. 05. 1983. u Požarevcu
Diplomirao 13. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Krepoljin
M. Tita 2/6

Đorđević R. Ivana

Rođena 25. 11. 1982. u Beogradu
Diplomirala 12. 07. 2012.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Aleksinačkih rudara 35/7

Olečić M. Vladimir

Rođen 18. 07. 1981. u Beogradu
Diplomirao 12. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Beograd
Kneginje Zorke 16

Stojić V. Milica

Rođena 25. 01. 1989. u Beogradu
Diplomirala 11. 07. 2012.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Agostina Neta 80/52

Jevremović S. Jelena

Rođena 06. 05. 1984. u Beogradu
Diplomirala 10. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Beograd
Ustanička 131/15

Dučić M. Risto

Rođen 15. 05. 1986. u Trebinju, BiH
Diplomirao 09. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Trebinje
N. Zotovića 5

Janković V. Rajko

Rođen 07. 11. 1986. u Trebinju, BiH
Diplomirao 09. 07. 2012.

Stalno mesto boravka Trebinje
Lastva bb

Ćirić M. Rodoljub

Rođen 29. 12. 1984. u Loznici
Diplomirao 06. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Mali Zvornik
Radalj

Dimitrijević N. Iva

Rođena 10. 11. 1984. u Beogradu
Diplomirala 26. 06. 2012.
Stalno mesto boravka N. Beograd
Aleksinačkih rudara 3

Dorđević M. Nikola

Rođen 13. 01. 1986. u Lazarevcu
Diplomirao 06. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Baroševac
Ivanjdanska 4

Čarakovac U. Zoran

Rođen 08. 02. 1984. u Novom Gradu,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 04. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Svodna
Vitasovci 11

Nešević R. Darko

Rođen 12. 06. 1983. u Užicu
Diplomirao 04. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Užice
Užičkih heroja 30/9

Stojnić M. Vladimir

Rođen 14. 04. 1985. u Gradišci, BiH
Diplomirao 04. 07. 2012.
Stalno mesto boravka Gradiška
Vidovdanska 73/2

Topalović D. Jasmina

Rođena 25. 04. 1985. u Beogradu
Diplomirala 26. 07. 2012.

Stalno mesto boravka Obrenovac
21. Slavonske brigade 16/a

Blažić R. Miloš

Rođen 11. 11. 1976. u Beogradu
Diplomirao 21. 06. 2011.
Stalno mesto boravka Beograd
Dimitrija Tucovića 101

Antić M. Nenad

Rođen 30. 08. 1980. u Kruševcu
Diplomirao 22. 06. 2012.
Stalno mesto boravka Kruševac
Vojvode Mišića 18

Dimitrijević D. Miroslav

Rođen 20. 02. 1985. u Leskovcu
Diplomirao 21. 06. 2012.
Stalno mesto boravka Selo Šišince

Petrović M. Radomir

Rođen 09. 01. 1985. u Zvorniku, BiH
Diplomirao 19. 06. 2012.
Stalno mesto boravka Zvornik
Ulica 2

Vlajić P. Branislav

Rođen 05. 08. 1986. u Srem. Mitrovici
Diplomirao 12. 06. 2012.
Stalno mesto boravka Srem. Mitrovica
Radinački put 158

Cojkić R. Nikola

Rođen 02. 02. 1985. u Požarevcu
Diplomirao 07. 06. 2012.
Stalno mesto boravka Suvi Do
Žagubica, Suvi Do bb

Cojkić R. Aleksandar

Rođen 09. 03. 1987. u Požarevcu
Diplomirao 07. 06. 2012.
Stalno mesto boravka Suvi Do
Žagubica, Suvi Do bb

Živković P. Vesna

Rođena 11. 07. 1985. u Bijeljini,
R. Srpska, BiH
Diplomirala 06. 06. 2012.
Stalno mesto boravka Bijeljina
Karađorđeva 42

Radić B. Milan

Rođen 01. 12. 1985. u Beogradu
Diplomirao 29. 05. 2012.
Stalno mesto boravka Obrenovac
Momčila Kapajdžića Muje 34

Kiselčić M. Predrag

Rođen 23. 07. 1976. u Ubu
Diplomirao 28. 05. 2012.
Stalno mesto boravka Beograd
Dimitrija Tucovića 47/1

Popović D. Borislav

Rođen 01. 06. 1980. u Zemunu
Diplomirao 21. 05. 2012.
Stalno mesto boravka Novi Beograd
Omladinskih brigada 40

Živanović Đ. Aleksandar

Rođen 10. 08. 1978. u Zemunu
Diplomirao 25. 05. 2012.
Stalno mesto boravka Golubinci
Šimanovačka 43

Jezdimirović G. Miloš

Rođen 10. 08. 1981. u Pančevu
Diplomirao 24. 05. 2012.
Stalno mesto boravka Zrenjanin
Ive Andrića 36

Jovanović C. Igor

Rođen 18. 03. 1981. u Leskovcu
Diplomirao 23. 05. 2012.
Stalno mesto boravka Leskovac

Bogdanović M. Milan

Rođen 07. 10. 1985. u Valjevu
Diplomirao 21. 05. 2012.
Stalno mesto boravka Valjevo
Naselje Oslobođioci Valjeva 93/74

Krivokapić I. Aleksandra

Rođena 14. 08. 1976. u Nikšiću,
R. Crna Gora
Diplomirala 21. 05. 2012.
Stalno mesto boravka Nikšić
Stojana Kovačevića 51

Dolić R. Igor

Rođen 09. 11. 1984. u Tesliću,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 09. 05. 2012.
Stalno mesto boravka Teslić
Đulić bb

Gavrić S. Bojan

Rođen 25. 05. 1982. u Bijeljini,
R. Srpska, BiH
Diplomirao 23. 04. 2012.
Stalno mesto boravka Beograd
Nikodina Milaša 10/11

Pavlović S. Marija

Rođena 19. 06. 1985. u Srem. Mitrovici
Diplomirala 29. 03. 2012.
Stalno mesto boravka Smederevo
Jasenička 50/1

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 "Radivoje 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, editors. 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