

VETERINARSKI GLASNIK

ČASOPIS FAKULTETA VETERINARSKJE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

VET. GLASNIK Vol. 63 Br. 5 - 6 str. 267 - 420 Beograd, 2009.

SADRŽAJ – CONTENTS – СОДЕРЖАНИЕ

ORIGINALNI RADOVI – ORIGINAL PAPERS – ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

- Šabanović M., Paprikić N., Suljkanović A., Miljas J., Lazarević M.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprosta na reproduktivne parametre mliječnih krava sa puerperalnim endometritisima
Influence of GnRH – Gonadoreline and Prostaglandine F2 α – Dinoprost Application on Reproduction Parameter Values in Dairy Cows with Puerperal Endometritis
Влияние аппликации гонадорелина и простагландина F2 α на репродуктивные параметры молочных коров с пuerперальными эндометритами 269
- Đoković R.: Blood Concentrations of Thyroid Hormones and Lipids and Histological Changes in the Liver in Dairy Cows in Postparturient Period
Koncentracije hormona tiroidne žlezde i lipida u krvi i histološke promene u jetri kod mlečnih krava u postpartalnom periodu
Концентрация гормонов щитовидной железы и липидов в крови и гистологические изменения в печени у молочных коров в послеродовом периоде . . 285
- Rajić Savić Nataša, Katić Vera: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane antibakterijske lekove
Susceptibility of Coagulase Pozitive Staphylococci Isolated from Cow's Mammary Gland to Antibacterial Drugs
Чувствительность коагулязов положительных стафилококков, изолированных из молочной железы коров на отобранные антимикробные средства . . . 299
- Ašanin Ružica, Žutić M., Ašanin Jelena, Mišić D., Žutić Jadranka, Jakić-Dimić Dobrila, Milić N., Nišavić J.: Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi
The Investigation of New Forms of Resistance to some Antibiotics in *E. coli* Strains Isolated from Piglets
Явление новых форм сопротивления к антибиотикам у штаммов *E. coli*, изолированных из поросят 311
- Kirovski Danijela, Šamanc H., Fratrić Natalija, Gvozdić D., Hristov S., Sladojević Ž., Mircu C., Tulcan Camelia: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi različite telesne mase na rođenju
Concentration of Cortisol, Insulin-Like Growth Factor-I and Immunoglobulin G Class in Blood of Neonatal Calves of Different Body Mass at Birth
Концентрация кортизола, инсулину подобного фактора роста-I и иммуноглобулинов Г класса в крови новорожденных телят различной массы тела на рождени 321

■ Šamanc H., Kirovski Danijela, Savić Đ., Sladojević Ž., Vujanac I., Zarcula Simona: Koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu krava sa dislokacijom sirišta na levo Blood Calcium and Phosphorus Concentrations in Cows with Left Displaced Abomasum Концентрация кальция и фосфора в кровяном серуме коров с дислокацией сычуга влево	331
■ Rukavina Dunja, Hasanbašić Danica, Suljkanović E., Katica Amela: Chromosomal Damage and Mitotic Index in Bosnian and Herzegovinian Mountain Horse Lymphocytes Following Low Dosage X-ray Irradiation <i>in vitro</i> Hromozomska oštećenja i promjene mitotskog indeksa u limfocitima bosanskohercegovačkog brdskog konja nakon <i>in vitro</i> ozračivanja niskim dozama X zraka Хромосомные повреждения и изменения митотического индекса в лимфоцитах боснийскогерцеговинской горной лошади после <i>in vitro</i> облучения низкими дозами X лучей	341
■ Potkonjak A., Lako B., Milićević Vesna, Savić B., Ivetić V., Jakić-Dimić Dobrila, Stevančević O., Toholj B.: PCR – dijagnostika infekcije kod svinja koju izaziva <i>Mycoplasma suis</i> PCR Diagnostics of Swine Infection Caused by <i>Mycoplasma suis</i> ПЦР диагностика инфекции у свиней, вызывающую <i>Mycoplasma suis</i>	353
■ Varatanović N., Katica Amela, Mutevelić T., Mlaćo Nadžida, Hamzić E.: Analiza infekcija mliječne žlijezde na osnovu rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza sekreta Analysis of Mammary Gland According to Results of CMT (California Mastitis Test) and Bacteriological Findings in Secretion Анализ инфекций молочной железы на основе результатов Калифорния мастит теста и бактериологических результатов секрета	359
PREGLEDNI RADOVI – REVIEW PAPERS – ОБЗОРЫ РАБОТЫ	
■ Hristov S., Stanković B., Petrujkić T.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja Welfare and Biosecurity Standards on Cattle and Pig Farms – Cattle and Pig Rearing Conditions Стандарты благосостояния и биобезопасности на фермах крупного рогатого скота и свиней – условия размещения и содержания крупного рогатого скота и свиней	369
■ Spasojević Kosić Ljubica: Moždani natrijumuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa Brain Natriuretic Peptide: Diganostic Potential in Dogs Мозговой натрийуретрический пептид: диагностический потенциал у собак	381
■ Velez R., Krleska-Veleza Nataša, Čupić V.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima Poisoning of Domestic Animals with Heavy Metals Отравления домашних животных тяжёлыми металлами	393
PRIKAZI KNJIGA – BOOK REVIEWS – ПРИКАЗ КНИГИ	
VESTI – NEWS – ВЕСТИ	
DIPLOMI RANI STUDENTI - DOKTORI VETERINARSKJE MEDICINE – GRADUATE STUDENTS - DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE - ДИПЛОМИРОВАННЫЕ СТУДЕНТЫ - ДОКТОРЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ	
UPUTSTVO AUTORIMA - NOTES FOR CONTRIBUTORS	

**UTJECAJ APLIKACIJE GnRH – GONADORELINA I
PROSTAGLANDINA F2 α – DINOPROSTA NA
REPRODUKTIVNE PARAMETRE MLIJEČNIH KRAVA SA
PUERPERALNIM ENDOMETRITISIMA***
*INFLUENCE OF GnRH – GONADORELINE AND PROSTAGLANDINE
F2 α – DINOPROST APPLICATION ON REPRODUCTION PARAMETAR
VALUES IN DAIRY COWS WITH PUERPERAL ENDOMETRITIS*

M. Šabanović, N. Paprikić, A. Suljkanović, J. Miljas, M. Lazarević**

Ovaj rad sadrži rezultate ispitivanja utjecaja aplikacije gonadorelina u vremenskim periodima 14 – 16, 17 – 20 i 21 – 25. dana post partum i prostaglandina F2 α , deset dana kasnije od ove injekcije, na reproduktivne parametre mliječnih krava koje su imale teška teljenja i nakon njih endometritise. Istraživanja su izvedena kod ukupno 92 plotkinje holštajn-frizijske pasmine. Hormonima je bilo tretirano 50 krava, dok je u kontrolnim grupama bilo ukupno 42 plotkinje kojima su u istim intervalima bile aplikovane placebo injekcije.

Analizom dobijenih rezultata u krava sa postpartalnim endometritisom utvrđeno je da su prosječni anestrusni period, servis period i međutelidbeni interval, u grupama plotkinja tretiranih GnRH (gonadorelinom) i prostaglandinom F2 α (dinoprost), značajno kraći u odnosu na kontrolne grupe. Vremenski period od aplikacije gonadorelina (praćene aplikacijom prostaglandina) do koncepcije, prema tretiranim grupama je bio kraći za 44, 28 i 14 dana u odnosu na kontrole. Ukupna koncepcija, od prva tri vještačka osjemenjivanja, kod krava tretiranih hormonskim preparatima je bila veća u sve tri ogledne grupe u poređenju sa vrijednostima postignutim kod kontrolnih jedinki.

*Ključne reči: krave, GnRH (gonadorelin), prostaglandin F2 α
(dinoprost), reproduktivni parametri, endometritisi*

* Rad primljen za štampu 21. 08. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Mustafa Šabanović; mr sci. med. vet. Nevres Paprikić, Veterinarska stanica, Živinice, Federacija BiH; dr sci. med. vet. Ahmet Suljkanović, Veterinarska stanica, Srebrenik, Federacija BiH; mr sci. med. vet. Jako Miljas, Veterinarska stanica, Trebinje, R. Srpska, BiH; dr sci. med. vet. Miodrag Lazarević, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprosta na reproduktivne parametre mliječnih...

Uvod / Introduction

Posljednje dvije decenije brojna istraživanja u veterinarskoj medicini su bila usmjerena na ispitivanje mogućnosti upotrebe farmakoloških sredstava za poboljšanje reproduktivnih parametara mliječnih krava, a naročito za skraćenje anestrusnog perioda *post partum*, a time i servis perioda. Ova dva parametra, naime, predstavljaju ključne faktore u ekonomičnosti proizvodnje mlijeka i mesa.

Još davno je dokazano da se kontrakcije uterusa mogu stimulirati uterotoničkim sredstvima koja su uglavnom korištena u tretiranju plotkinja sa produženom involucijom uterusa. Međutim, ovaj postupak nije znatnije uticao na obnavljanje postpartalne ovarijalne cikličnosti. Saznanja o djelovanju prostaglandina, naročito onih sa luteolitičkim osobinama kao i otkriće i sinteza hipotalamusnog gonadotropnog oslobađajućeg hormona (GnRH) i njegovih sintetskih analoga, dovela su do velikog pomaka u regulisanju spolne cikličnosti domaćih životinja.

Istraživanja efekata aplikacije prostaglandina PGF2 α (25 mg) i GnRH (200 μ g) su među prvima vršili Benmard i Stevenson (1988). Autori su vršili aplikaciju u periodima 10 – 14 i 20 – 24. dana *post partum* pojedinačno sa svakim hormonom i kombinacijom tretmana sa oba hormona (GnRH + PGF2 α). U grupu sa abnormalnim puerperijem autori su svrstali 29% krava kod kojih su klinički utvrđena: teška teljenja, retencija sekundina, infekcije uterusa, gnojni iscjedak, mliječna groznica, ketoza ili abnormalno povećanje materičnih rogova. Po obradi rezultata autori su utvrdili poboljšanu plodnost kod krava koje su bile tretirane sa GnRH u periodu od 10 – 14. i sa PGF2 α od 20 – 24. dana *post partum*. Autori su preporučili primjenu tretmana sa GnRH ili PGF2 α u cilju poboljšanja reproduktivnih performansi krava sa puerperalnim poremećajima.

U istraživanjima tretmana mliječnih krava sa PGF2 α i efekata na poboljšanje reproduktivnih performansi, Stevenson i Call (1988) nisu utvrdili pozitivne rezultate bez obzira na zdravstveni status grla u puerperiju, osim kod krava kojima je apliciran GnRH od 11 – 18. dana *post partum*. Kod ovih plotkinja je došlo do statistički značajnog smanjenja anestrusnog intervala i intervala do koncepcije u odnosu na kontrolne plotkinje. Krave sa reproduktivnim poremećajima su imale duži interval od teljenja do koncepcije poslije tretmana sa GnRH od 18 – 25. dana *post partum* ili PGF2 α 33 – 40. dana nakon teljenja. Autori zaključuju da tretman ovim hormonima u ranom puerperalnom periodu nema efekta na poboljšanje reproduktivnih performansi mliječnih krava.

U jednom drugom istraživanju je 30 krava injektirano intramuskularno sa 100 μ g GnRH 10 – 16. dana *post partum* slijeđeno sa 25 mg dinoprosta nakon 14 dana. Kontrole je predstavljalo 29 krava tretiranih fiziološkom otopinom. Korištene su samo krave bez infekcije uterusa i nisu opažene značajne razlike u dužini intervala između teljenja i prvog opaženog estrusa, prvog osjemenjivanja ili koncepcije. Uz to, nije bilo signifikantnih promijena u stepenu koncepcije, indeksu osjemenjivanja, stepenu pojave folikularnih i lutealnih cista, broju i pro-

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprost na reproduktivne parametre mliječnih...

centu krava koje povadaju ili broju izlučenih krava. Autori su zaključili da upotreba GnRH i prostanglandina u krava *post partum* nije ekonomski korisna ukoliko se abnormaliteti reproduktivnog trakta brzo ne dijagnosticiraju i adekvatno tretiraju (Richardson i sar., 1983). Budući da su krave u ovom istraživanju korištene bez kliničke evidencije infekcije uterusa, rezultati su mogli biti u korist kontrolnih krava.

S obzirom na ispoljene korisne efekte tretiranja prostanglandinima u krava sa infekcijama uterusa (Gustafson i sar., 1976) aplikacija GnRH praćena apliciranjem prostanglandina 14 dana kasnije, može biti korisna u ovakvih plotkinja (Richardson i sar., 1983). U cilju liječenja ovarijalnih disfunkcija i stimulacije lučenja LH zajedno se koriste GnRH i PGF2 α čak i od 35 – 41. dana laktacije (Stevenson i Phatak, 2005).

Mi smo, takođe, nedavno (Šabanović i sar. 2006) analizom dobijenih rezultata kod 241 normalno oteljenih krava utvrdili da su prosiječni anestrusni period, servis period i međutelidbeni interval u grupama plotkinja tretiranih gonadorelinom značajno kraći u odnosu na kontrolne grupe. Reproductivni parametri krava sa različitom koncentracijom progesterona, 10 dana nakon aplikacije gonadorelina nisu se značajnije razlikovali. Vremenski period od aplikacije gonadorelina (14 – 16, 17 – 20. i 21 – 25. dana *post partum*) do koncepcije prema tretiranim grupama bio je kraći za 30, 30 i 14 dana u odnosu na kontrolne grupe. Ukupna koncepcija od prva tri vještačka osjemenjavanja kod krava tretiranih gonadorelinom je iznosila 88,8 %, dok je u kontrolnoj grupi krava koncipiralo 83,47 % jedinki.

Zanimljivi su tehnološki normativi koje je 1978. izneo Moore i koji bi, prema njegovom mišljenju, trebalo da budu cilj u komercijalnim stadima mliječnih krava:

• dužina laktacije	305 – 323 dana
• period zasušenja	42 – 60 dana
• dužina graviditeta prosječno	282 dana
• dužina međutelidbenog intervala	365 dana
• dužina perioda mirovanja	do 65 dana
• servis - period	83 dana
• procenat koncepcije (1. VO)	60 %
• otkrivanje estrusa do 60 dana pp	100 %
• procenat remonta	do 15 %
• prvi pripust junica	300 kg/15 mjeseci

Autor u svom modelu govori o procentu koncepcije od prvog VO od 60 % ali u isto vrijeme priznaje da se u stvarnosti taj parametar kreće od 30 do 55%.

Dosadašnja istraživanja korištenja PGF2 α i GnRH u ranom puerperiju krava sa teškim teljenjima, nisu imala konzistentne rezultate i postoje različita mišljenja o ovom problemu. Radi toga smo se odlučili da u uslovima farmskog držanja krava istražimo uticaj aplikacije GnRH i PGF2 α u definisanim vremenskim

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprosta na reproduktivne parametre mliječnih...

periodima *post partum* na osnovne reproduktivne parametre kod plotkinja sa perperalnim endometritisima.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Istraživanja uspješnosti zajedničke primjene analoga GnRH gonadorelina i PGF2 α vršena su na farmi mliječnih krava JPP "Spreča", Donje Vukovije, Federacija BiH. Farma po konstrukciji i tehnologiji predstavlja klasični (vezani) sistem držanja mliječnih krava. Plotkinje su bile holštajn-frizijske pasmine sa prosječnom proizvodnjom od 5 250 litara mlijeka u standardnoj laktaciji od 305 dana. Krave su na farmi imale ujednačene uslove smještaja kako u odnosu na ishranu, tako i na tehnologiju muže.

Ishrana krava je bila podešena prema pojedinim fazama proizvodnje, odnosno prema reproduktivnom ciklusu plotkinja. U zimskom periodu, ona je bila bazirana na kukuruznoj silaži, sijenu lucerke, pivarskom tropu, stočnom brašnu, koncentratu sa proteinsko-ugljikohidratnim i mineralno-vitaminskim dodacima. U proljeće i leto je povećavan udeo zelene mase (lucerke), a smanjivan je udio silaže u obroku. U toku jeseni je povećavan udio silažnog kukuruza, a smanjivana je zelena masa.

Našim istraživanjima je ukupno bilo obuhvaćeno 92 krave. Podaci za svaku kravu su uzimani iz reproduktivno-zdravstvenog kartona i na osnovu izvršenog ginekološkog pregleda prije svakog tretmana. Podaci su se odnosili na rani dio puerperija i reproduktivne poremećaje kao što su teška teljenja, retencija sekundina i puerperalni endometritisi.

Krave koje su imale teška teljenja i retencije sekundina tretirane su intrauterinom aplikacijom antibiotika: Geomycin F® (Pliva, Zagreb) (jedna obleta sadrži 1 gram oksitetraciklin klorida) i Gynobiotik (Lek, Ljubljana) (jedna obleta od 15 grama sadrži 350.000 i.j. neomicina u obliku sulfata i 500 mg oksitetraciklina u obliku hidroklorida). Aplikovali smo jednu do tri tablete svakih 48 sati 2 do 3 puta u zavisnosti od težine kliničke slike.

U ogled su bile uključene krave sa dijagnosticiranim puerperalnim endometritisom kojima je intramuskularno apliciran GnRH – gonadorelin (Fertagyl, Intervet) u dozi od 250 μ g i zatim 10 dana kasnije, PGF2 α – dinoprost (Lutalyse, Upjohn) u dozi od 25 mg također intramuskularno. Krave su bile grupisane na slijedeći način:

1. Prva grupa (n = 14) aplikacija gonadorelina 14 – 16. dana *post partum* i 10 dana kasnije dinoprosta.
2. Druga grupa (n = 20) aplikacija gonadorelina 17 – 19. dana *post partum* i 10 dana kasnije dinoprosta.
3. Treća grupa (n = 16) aplikacija gonadorelina 21 – 25. dana *post partum* i 10 dana kasnije dinoprosta.

Grupe krava kojima je apliciran gonadorelin i 10 dana kasnije prostaglandin su imale uporedne kontrole kojima je apliciran placebo (0,9 % fiziološki

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprost na reproduktivne parametre mliječnih...

rastvor u količini od 2 ml) i to za prvu grupu 10, drugu 18 i treću 14 plotkinja (ukupno 42).

U svim grupama obuhvaćenih krava, kako oglednih tako i kontrolnih, prije aplikacije je vršen detaljan ginekološki pregled (rektalni i vaginalni) da se utvrdi stanje na genitalnim organima (uterus i ovarijumi), a odnosilo se na položaj uterusa, njegovu konzistenciju i veličinu rogova. Kod pregleda ovarija, određivana je njihova veličina kao i funkcionalno stanje (razvoj folikula, *corpus luteum* i cistične degeneracije). Vaginalni pregledom utvrđivane su promijene u vagini, položaj cerviksa i njegove promijene, te prisustvo i karakteristike iscjedka.

Otkrivanje estrusa i osjemenjivanje je vršeno ustaljenim postupcima koji se stalno provode kao dio menadžmenta reprodukcije krava na farmi. Otkrivanje estrusa vršeno je u trajanju od pola sata od 06:00 do 10:00 sati i od 18:00 do 22:00 sati. Osjemenjivanje krava vršeno je jednokratno uvijek u isto vrijeme od 12:00 do 13:00 sati svakog dana. Krave koje pokazuju znakove estrusa i narednog dana, bile su još jednom osjemenjivane. Dijagnosticiranje gravidnosti vršeno je rektalnim pregledom od 7 do 8 tjedana poslije osjemenjivanja.

Kriteriji korišteni za kompariranje rezultata između grupa krava bili su: dužina anestrusnog perioda, dužina servis perioda, međutelidbeni interval (MTP), indeks osjemenjivanja i vremenski period od tretiranja do koncepcije. Reproductivni parametri su obrađeni samo za krave koje su koncipirale 1-3 osjemenjivanja. Statistička obrada podataka je izvršena izračunavanjem standardnih parametara: SV – srednje vrijednosti, SE – standardne greške, SD – standardne devijacije, IV – interval varijacija. Za utvrđivanje značajnosti razlika između utvrđenih prosječnih vrednosti korišten je t-test, a sve vrijednosti za $p < 0,05$ su smatrane signifikantnim.

Rezultati ispitivanja / Results

U tabelama 1. i 2. prikazani su rezultati statističke obrade podataka u krava u kojih je dijagnosticiran endometritis i apliciran GnRH (gonadorelin) 14. do 16. dana *post partum* i 10 dana kasnije PGF2 α (dinoprost), odnosno placebo u istim vremenskim intervalima. Sve krave su bile liječene antibioticima, standardnom procedurom koja je opisana u prethodnom tekstu. Obradom rezultata o značajnosti nađenih razlika, utvrđeno je da su razlike značajne za većinu istraživanih reproduktivnih parametara. Servis period je bio kraći za 39 dana u oglednih krava u odnosu na kontrole, što je značajno doprinjelo i kraćem međutelidbenom intervalu. Vremenski period od aplikacije GnRH i PGF2 alfa do koncepcije, bio je kraći za 44 dana u odnosu na kontrole kojima je aplikovan placebo.

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprost na reproduktivne parametre mliječnih...

Tabela 1. Reproductivni parametri oglednih krava sa puerperalnim endometritisom 14 – 16. dana post partum kojima je apliciran GnRH (gonadorelin) i PGF2 α (dinoprost) 10 dana kasnije (n = 13) /

Table 1. Reproductive parameters for experimental cows with puerperal endometritis 14-16 days post partum, which were administered gonadoreline and PGF2 α 10 days later (n=13)

Period čekanja / Waiting period (dani / days)		Servis period / Service period (dani / days)	Indeks osjem. / Insemination index	MTP (dani / days)	Period od aplikacije do koncepcije / Period from application to conception (dani / days)
SV	58,70	72,80	1,46	355	54
SE	2,56	5,09	0,14	5,09	4,96
SD	9,21	18,3	0,52	18,3	17,9
IV	29,00	70	1	70	67
Min	45,00	45	1	327	28
Max	74,00	115	2	397	95

Tabela 2. Reproductivni parametri kontrolnih krava sa puerperalnim endometritisom kojima je apliciran placebo 14 – 16. dana post partum i 10 dana kasnije takođe placebo (n=8)

Table 2. Reproductive parameters for control cows with puerperal endometritis which were administered a placebo injection 14-16 days post partum and placebo again 10 days later (n=8)

Period čekanja / Waiting period (dani / days)		Servis period / Service period (dani / days)	Indeks osjem. / Insemination index	MTP (dani / days)	Period od aplikacije do koncepcije / Period from application to conception (dani / days)
SV	77,1	112,3	1,5	394	98,00
SE	6,2	19,17	0,33	19,3	19,1
SD	17,5	54,22	0,93	54,6	54,01
IV	52	156	2	156	156
Min	44	73	1	355	58
Max	96	229	3	511	214

Tabele 3. i 4. sadrže rezultate statističke obrade podataka u krava u kojih je dijagnosticiran endometritis i apliciran GnRH 17-19 dana *post partum* i 10 dana kasnije PGF2 α , odnosno placebo u istim vremenskim periodima u kontrolnih krava. Uočava se da postoje visoko signifikantne razlike po svim istraživanim reproduktivnim parametrima ($p < 0,01$). Tako je period čekanja bio kraći za 20 dana, dok je servis period bio kraći za 28 dana. Vrijeme od aplikacije gonadorelina i PGF2 α je kraće za 27 dana u odnosu na kontrolne grupe ($p < 0,01$).

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprost na reproduktivne parametre mliječnih...

Tabela 3. Reproductivni parametri oglednih krava sa puerperalnim endometritisom kojima je apliciran GnRH (gonadorelin) 17 – 19. dana post partum i 10 dana kasnije PGF2 α (dinoprost) (n=18)

Table 3. Reproductive parameters for experimental cows with puerperal endometritis which were administered gonadoreline 17-19 days post partum and PGF2 α 10 days later (n=18)

Period čekanja / Waiting period (dani / days)		Servis period / Service period (dani / days)	Indeks osjem. / Insemination index	MTP (dani / days)	Period od aplikacije do koncepcije / Period from application to conception (dani / days)
SV	53	66,2	1,56	348	49,9
SG	3,5	3,05	0,12	3,05	3,07
SD	15	13	0,51	13	13
IV	45	48	1	48	48
Min	25	46	1	328	29
Max	70	94	2	376	77

Tabela 4. Reproductivni parametri kontrolnih krava sa puerperalnim endometritisom kojima je apliciran placebo 17 – 19. dan post partum i 10 dana kasnije takođe placebo (n=14)

Table 4. Reproductive parameters for control cows with puerperal endometritis which were administered a placebo injection 17-19 days post partum and placebo again 10 days later (n=14)

Period čekanja / Waiting period (dani / days)		Servis period / Service period (dani / days)	Indeks osjem. / Insemination index	MTP (dani / days)	Period od aplikacije do koncepcije / Period from application to conception (dani / days)
SV	73,4	94,1	1,7	376	77,6
SE	5,07	9,03	0,2	9,03	9,03
SD	19	33,8	0,8	33,8	33,8
IV	58	109	2	109	110
Min	40	59	1	341	41
Max	98	168	3	450	151

U tabelama 5. i 6. prikazani su rezultati statističke obrade podataka kod krava kojima je apliciran GnRH 20 – 24. dana post partum i 10 dana kasnije PGF2 α , odnosno placebo u istim vremenskim periodima u kontrolnih krava. Uočava se da postoji značajna razlika u analiziranim reproduktivnim parametrima oglednih u odnosu na kontrolne krave. Servis period je bio kraći za 14 dana ($p < 0,05$) u oglednih krava, a također i međutelidbeni period. Vremenski period do koncepcije u oglednih krava iznosio je prosiječno $58,6 \pm 5,2$ za ogledne i $72,2 \pm 9,7$ dana za kontrolne krave.

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprosta na reproduktivne parametre mliječnih...

Tabela 5. Reproductivni parametri oglednih krava sa puerperalnim endometritisom kojima je apliciran GnRH (gonadorelin) 20 – 24. dana post partum i PGF2 α (dinoprost) 10 dana kasnije (n=14)

Table 5. Reproductive parameters for experimental cows with puerperal endometritis which were administered GnRH 20-24 days post partum and PGF2 α 10 days later (n=14)

Period čekanja / Waiting period (dani / days)		Servis period / Service period (dani / days)	Indeks osjem. / Insemination index	MTP (dani / days)	Period od aplikacije do koncepcije / Period from application to conception (dani / days)
SV	63,7	79,7	1,43	362	58,6
SE	4,99	5,81	0,17	5,81	5,82
SD	18,7	21,7	0,65	21,7	21,8
IV	60	90	2	90	89
Min	37	50	1	332	31
Max	97	140	3	422	120

Tabela 6. Reproductivni parametri kontrolnih krava sa puerperalnim endometritisom kojima je apliciran placebo 20 – 24. dana post partum i 10 dana kasnije takođe placebo (n=11)

Table 6. Reproductive parameters for control cows with puerperal endometritis which were administered a placebo injection 20-24 days post partum and placebo again 10 days later (n=11)

Period čekanja / Waiting period (dani / days)		Servis period / Service period (dani / days)	Indeks osjem. / Insemination index	MTP (dani / days)	Period od aplikacije do koncepcije / Period from application to conception (dani / days)
SV	76,3	93,60	1,82	375	72,20
SE	6,6	2,77	0,23	2,78	2,84
SD	21,9	9,20	0,75	9,23	9,42
IV	71	30	2	30	30
Min	38	79	1	361	57
Max	109	109	3	391	87

U tabelama 7. i 8, prikazani su rezultati koncepcije oglednih krava tretiranih sa gonadorelinom i dinoprostom u različitim vremenskim periodima *post partum* kao i kontrolnih plotkinja koje su u istim intervalima dobijale placebo injekcije. Zapaža da je ukupan procenat koncepcije bio značajno veći kod krava tretiranih hormonskim preparatima kao i da je u ovoj grupi plotkinja manji procenat jedinki sa otvorenim danima. Najveći procenat koncepcije imale su plotkinje koje su bile tretirane gonadorelinom 14 – 16. dana *post partum* i nakon 10 dana sa dinoprostom.

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprost na reproduktivne parametre mliječnih...

Tabela 7. Rezultati koncepcije oglednih krava tretiranih sa GnRH (gonadorelin) i PGF2 α (dinoprost) u različitim vremenskim periodima post partum

Table 7. Results for conception of experimental cows treated with gonadoreline and PGF2 α at different time intervals post partum

Grupe krava u ogledu / Group of cows in experiment	Gravidno od / Gravid from				Ukupno krava / Total cows	Ukupna konc. / Total conception
	I vo / I ai	II vo / II ai	III vo / III ai	nesteone / nongravid		
14-16 dan / 14-16 days	7 (53,84%)	6 (46,15%)	0	1 (7,14%)	14	13 (99,85%)
17-19 dan / 17-19 days	8 (40%)	10 (50%)	0	2 (10%)	20	18 (80%)
20-24 dan / 20-24 days	9 (56,25%)	4 (25%)	1 (6,25%)	2 (12,5%)	16	14 (87,50%)

Tabela 8. Rezultati koncepcije kontrolnih krava tretiranih sa placebo injekcijama u različitim vremenskim periodima post partum

Table 8. Results for conception of control cows which were administered placebo injections at different time periods post partum

Grupe krava u kontroli / Group of cows as controls	Gravidno od / Gravid from				Ukupno krava / Total cows	Ukupna konc. / Total conception
	I vo / I ai	II vo / II ai	III vo / III ai	nesteone / nongravid		
14-16 dan / 14-16 days	6 (60%)	0	2 (20%)	2 (20%)	10	8 (80%)
17-19 dan / 17-19 days	7 (38,88%)	4 (22,22%)	3 (16,66%)	4 (22,22%)	18	14 (77,77%)
20-24 dan / 20-24 days	4 (28,57%)	5 (35,71%)	2 (14,28%)	3 (21,46%)	14	11 (78,57%)

Diskusija i zaključak / Discussion and conclusion

Analiza uspješnosti primjenjenih metoda pokretanja spolne cikličnosti *post partum* vršena je na osnovu statistički obrađenih rezultata koji se odnose na: dužinu perioda čekanja, servis perioda, indeksa osjemenjivanja, međutelidbenog perioda i vremena od aplikacije gonadorelina u krava sa puerperalnim endometritisom kojima je apliciran gonadorelin i 10 dana kasnije dinoprost.

U krava sa klinički dijagnosticiranim endometritisom puerperalnog porijekla koje su tretirane sa GnRH i 10 dana kasnije sa PGF2 α (dinoprost) u vremenskim periodima 14-16, 17-19 i 20-24. dana *post partum* uočene su značajne razlike u dužini anestrusnih perioda oglednih u odnosu na kontrolne grupe. U grupama oglednih krava, vremenski periodi od tretiranja do koncepcije značajno se razlikuju. Tako je u grupi krava tretiranih gonadorelinom 14-16 dana *post partum* i 10 dana dinoprostom, vremenski razmak od aplikacije do koncepcije iznosio 44

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F₂ α – dinoprost na reproduktivne parametre mliječnih...

dana. U drugoj grupi tretiranih krava (17-19) razlika je iznosila 27 dana, a u trećoj grupi (20-24) 14 dana. Uočava se da je najmanja razlika oglednih grupa u odnosu na kontrolne bila u trećoj grupi (20-24 dana). Rezultati istraživanja Gustafsona i sar. (1976) i Richardsona i sar. (1983) ukazuju na to da je ovakvo tretiranje krava sa infekcijama uterusa korisno, jer ranije dolazi do uspostavljanja spolne cikličnosti a time i ozdravljenja endometrija.

U krava sa puerperalnim endometritisom tretiranih sa GnRH i PGF₂ α prema grupama od 14-16, 17-19 i 20-24 dana *post partum* razlike u dužini servis perioda oglednih i kontrolnih krava su iznosile 39,50 , 27,90 i 13,9 dana. Razlike su bile na razini od $p < 0,05$ i $p < 0,01$. Uočava se da je najmanja razlika bila u grupi krava tretiranih od 20-24. dana nakon teljenja.

Rezultati naših istraživanja su u skladu sa nalazima Benmarda i Stevensona (1988) i Etheringtona (1984) koji ukazuju na to da aplikacija PGF₂ α krava, 24 dana nakon teljenja koje je uključivalo apliciranje GnRH 14. dana *post partum* utiče na reproduktivne parametre krava. Oni ističu da aplikacija PGF₂ α 24. dana skraćuje prosječne dane do prvog osjemenjivanja i otvorene dane i povećava stepen koncepcije od prvog osjemenjavanja. Prema istraživanjima Benmarda i Stevensona (1988) primjena GnRH i PGF₂ α smanjuje interval od teljenja do koncepcije za 43-48 dana, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Nadalje, istraživanja pokazuju da ovakav način tretiranja ima direktan terapijski efekat na uterus jer se pojačavaju njegove kontrakcije i poboljšava se mišićni tonus, što pospješuje involucione procese. Povećanjem kontraktilnosti uterusa smanjuju se obim i perzistencija infekcija (Ax, 1991). Smatramo, također, da je ovome doprinjela profilaktička intrauterina aplikacija antibiotika kravama sa retencijom sekundina i teških teljenjima.

O dužini perioda čekanja postoje mnogobrojni izvještaji koji se odnose na efikasnost reprodukcije i proizvodnju mlijeka. Tako VanDemark i Salisbury još 1950. ukazuju na to da se maksimalna efikasnost reprodukcije postiže osjemenjivanjem između 100 i 120 dana poslije teljenja. Međutim, ovaj pristup ne obezbjeđuje maksimalnu reprodukciju tj. jedno tele svake godine. McClary i sar. (1989) ukazuju na to da je skoro 90% oteljenih krava ponovo sposobno za reprodukciju prije isteka roka od 60 dana po teljenju. Slama i sar. (1976) za signifikantno skraćanje međutelidbenog intervala preporučuju da se sa osjemenjivanjem krava otpočne u periodu 45 i 50 dana poslije teljenja, što omogućuje i reinseminaciju, intenzivniji program otkrivanja estrusa i efikasnije osjemenjivanje.

Rezultati brojnih istraživanja su ukazali da je trajanje anestrusa *post partum* pod uticajem različitih faktora kao što su ishrana, laktacija, starost, pasmina, sisanje teladi, sezona teljenja, sistem držanja krava i tjelesna težina (Morrow, 1969; King i sar., 1976; King, 1984; Redford i sar., 1978; Peters i Riley, 1982). O značajnosti razlika u dužini anestrusnog perioda na osnovu mjerenja koncentracije progesterona u krvi ili mlijeku izvijestili su Bulman i Lamming (1978), King i sar. (1976), Keeling i Ravindran (1992). Fisher i sar. (1986) su utvrdili da se kod krava sa kratkim periodom acikličnosti brže razvijala pulzatorna slika sekrecije LH

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprost na reproduktivne parametre mliječnih...

i bilo je signifikantno više pulzacija nego u krava sa dugim periodom acikličnosti. Nadalje, vremenski razmak pulzacija LH nije tako čest ili redovit, odnosno pravilan u krava sa dugim periodom acikličnosti.

Bulman i Lamming (1978) su na osnovu određivanja razine koncentracije progesterona u 553 mliječne krave utvrdili da se kod ukupno 90% krava obnavlja ovarijalna aktivnost sa 50 dana *post partum*. Međutim, prema McLeodu i Williamsu (1991) ovarijalna cikličnost se obnavlja u 81% krava 30 dana nakon teljenja, a u 92% krava 42 dana nakon teljenja. Archibald (1990) je izvještavajući o pojavi disfunkcije ovarija postpartum u velikim mliječnim farmama utvrdio da iznosi i do 30% kada je odsutan *corpus luteum*, a koncentracije progesterona plazme manje od 1 ng/ml.

Međutelidbeni intervali krava sa puerperalnim endometritisima tretiranih gonadorelinom i PGF2 α iznosili su nakon različitih vremenskih perioda tretiranja (14-16, 17-19, 20-24 dana) *post partum*: 355 $\pm$ 18,3; 348 $\pm$ 13; 362 $\pm$ 21,70 dana. U kontrolnih krava prema grupama tretiranja, međutelidbeni intervali su bili duži za 38,28 i 13 dana, respektivno. Rezultati naših istraživanja su u skladu sa podacima koje iznose Benmard i Stevenson (1988) i Etherington (1984).

Ocjenjivanje intervala teljenja je standardna metoda prosuđivanja uspjeha ili neuspjeha programa reprodukcije u stadu. Neki autori dovode u pitanje vrijednosti takvog pristupa i sugerišu da se u obzir mogu uzeti i razina proizvodnje mlijeka i način držanja. U idealnom slučaju, kada se ocjenjuje reproduktivno stanje stada, treba uzeti u obzir i te faktore kao i ambijent zajedno sa intervalom teljenja. Na dužinu međutelidbenog intervala utiču mnogobrojni faktori, na prvom mjestu dužina anestrusnog perioda, pravovremeno otkrivanje estrusa, odnosno interestrusnog intervala. Kako je dužina graviditeta genetski uslovljena i na nju se ne može utjecati, svi ostali činioci su subjektivno uslovljeni (De Kruif, 1978). Tu se na prvom mjestu misli na uslove držanja, ishrane prije i poslije partusa, higijene porođaja i puerperija.

Većina autora smatra da je ekonomski opravdan međutelidbeni interval od 360 do 390 dana (DeKruif, 1978; Sherington i Roche, 1978; Zeddies 1977). Međutim, Esslemont (1977) ukazuje na to da iz ekonomskih razloga, krava treba da se teli svakih 330 dana, uz period zasušenja od 50 dana i navodi da se na taj način ostvaruje maksimalna proizvodnja mlijeka.

Procenat koncepcije nakon prvog veštačkog osjemenjivanja se najčešće uzima kao mjerilo uspješnosti ovog zahvata, a o tim rezultatima postoje različiti izvještaji. Boyd i Reed (1961) navode da od prvog osjemenjivanja ostaje gravidno oko 60% krava. Prema Moore-u (1978) procenat koncepcije u velikim stadima se kreće oko 30-50%. Attonaty i sar. (1973) ukazuju da se procenat koncepcije u mliječnim krava u Francuskoj kreće ispod 45%.

Indeks osjemenjivanja je jedan od indikatora da li su ili ne krave u estrusu u momentu kada se osjemenjavaju, ali je isto tako indikator zdravstvenog stanja reproduktivnog trakta plotkinja. Prema istraživanjima Dohoo-a (1982) na 32 stada u Ontariju, prosiječan indeks osjemenjivanja iznosio je 1,87 po koncepciji.

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprosta na reproduktivne parametre mliječnih...

Jedna grupa autora je izvijestila (Nash i sar., 1980) da tretiranje sa 250 mg GnRH između 13. i 15. dana *post partum* rezultira u manje osjemenjivanja po koncepciji (indeks 1,23) nego što je bilo potrebno za kontrole (1,74) u dobro organizovanom stadu gdje je otkrivanje estrusa bilo bolje od prosijeka, a osjemenjivanje je počelo između 40 i 60 dana *post partum*. Slične rezultate navodi i Peche (1979).

U oglednih krava sa endometritisom puerperalnog porijekla tretiranih gonadorelinom i dinoprostom, od ukupnog broja krava, od 3 osjemenjivanja koncipiralo je 84% plotkinja, dok je u kontrolnoj grupi od 42 krave koncipiralo 33 (78,57%). Razine koncentracije progesterona na dan uzorkovanja nisu utjecale na rezultate koncepcije što ističu Young i sar. (1984) i Ax (1991). Međutim, ne može se zanemariti luteolitički efekat kod najmanje 50% krava sa puerperalnim endometritisom koje su usljed toga počele ranije ciklirati što je doprinjelo obnavljanju endometrija i kasnije utjecalo pozitivno na ukupne reproduktivne parametre tretiranih krava. Ovome u prilog idu i rezultati koncepcije od drugog osjemenjivanja koji su se prema grupama (14-16, 17-19, 20-24 dana) iznosili 46,15%, 50,00% i 25%, dok su u oglednim grupama iznosili 0, 22,22 i 35,71%. Brojna istraživanja ukazuju da ovakav režim tretiranja ima direktan terapijski efekat na uterus. Inteziviranjem kontrakcija uterusa poboljšava se mišićni tonus što pospješuje involuciju uterusa i smanjuje intenzitet postojeće infekcije uterusa. Ferry (1994) ukazuje da je efikasnost dinoprosta u tretiranju endometritisa jednaka ili čak veća od efikasnosti antibiotika. Istovremeno se zbog prelaska antibiotika u mlijeko i sve izraženijih kriterija zdravstvene kontrole mlijeka, aplikacija antibiotika u uterus kad je to moguće izbjegava.

Naši rezultati ukazuju na to da je upotreba korišćenih hormonskih preparata u krava sa puerperalnim endometritisima dovela do značajnog poboljšanja posmatranih reproduktivnih parametara.

Literatura / References

1. Archibald LF. Apparent failure of prostaglandin F2 to improve the reproductive efficiency of postpartum dairy cows that had experienced dystocia and/or retained fetal membranes. *Theriogenology* 1990; 34(6): 1025-34.
2. Attonaty M, Gastinel N, Jalles P, Thibier. Consequences économiques des troubles de la fécondité, Troubles de la Reproduction dans L espece Bovine. 2nd Edition Compte Rendu de Journees d Information, Paris 1973; 16: 52.
3. Ax RL. Realistic goals for a dairy breeding program. Proc of the Southwest Nutrition Manage Conference. University of Arizona, Tucson 1991; 92-100.
4. Benmard M, Stevenson J. Gonadotropin – releasing hormone and Prostaglandin F2 alpha for postpartum dairy cows. *Dairy Sci* 1988; 69: 800-11.
5. Boyd H, Reed H. Investigation into the incidence and causes of infertility in dairy cattle – influence of some management factors. *Brit Vet J* 1961; 117, 74-9.
6. Bulman DC, Lamming GE. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *J Reprod Fert* 1978; 54: 447-58.

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprosta na reproduktivne parametre mliječnih...

7. De Kruif A. Factors influencing the fertility of cattle population. J Reprod Fert 1978; 54: 507-18.
8. Dohho IR. An epidemiological study of disease, production and culling in Holstein-Friesian cows. PhD Thesis, Guelph University, 1982.
9. Esslemont RJ. The detection of oestrus in dairy cows, Vet Annual 1977; 15th Issue, 50-3.
10. Etherington WG *et al.* Reproductive performance of dairy cows following treatment with a single or two sequential doses of cloprostenol 26 and/or 40 days postpartum. Theriogenology 1988; 29: 565-75.
11. Etherington WG, Bosu WTK, Martin SW, Cote JF. Reproductive performance in dairy cows following postpartum treatment with gonadotrophin releasing hormone and/or prostanglandin: a field trial. Can Comp 1984; 48(3): 245-50.
12. Etherington WG. The effect of gonadotropin releasing hormone and/or cloprostenol on reproductive performance in Holstein Friesian dairy cows: A Field trial. MSc Thesis, University of Guelph, 1983.
13. Ferry J. The Veterinarian Role: Improving the pregnancy rate. Proceedings of AABP, Rome Ga 1994; 91-6.
14. Fisher MW, Hale DH, Glencross RG, Hathorn DJ, Lamming GE. Secretion of luteinizing hormone and estradiol -17-beta in postpartum milked and suckled cows. Brit Vet J 1986; 142, 569-77.
15. Gustafsson B, Backstrom G. Treatment of bovine pyometra with PGF 2 alfa: An evaluation of a field study. Theriogenology 1976; 6: 45.
16. Keeling B, Ravindran V. Detection of postpartum ovarian activity in cows using on-farm progesterone ELISA. Vet Rec 1992; 131(13): 291-3.
17. King GJ, Saballo A. Ovarian function in dairy cows during early lactation. J Anim Sci 1976; 42(3): 688-92.
18. King GJ. Normal, short and long postpartum estrus cycles in dairy and beef cows. 10th Int. Congress on Animimasl Reproduction and AI. University of Illinois at Urbana-Champaign USA, June 10-14, 1, 399, 1984.
19. McClary DG *et al.* Effect of early postpartum treatment with prostanglandin F2 alfa on subsequent fertility in the dairy cow. Theriogenology 1989; 31(3): 565-70.
20. McLeod BJ, Williams ME. Incidence of ovarian dysfunction in postpartum dairy cows and the effectiveness of its clinical diagnosis and treatment. Vet Rec 1991; 128: 121-4.
21. Moore CJ. An approach to applying Cloprostenol in practical farming conditions. Polish Veterinary Society Congress, Sept, 1978.
22. Morrow DA, Roberts SJ. A review of postpartum ovarian activity and involution of the uterus and cervix in cattle. Cornell Vet 1969; LIX(1): 134-54.
23. Nash JG, Ball L, Olson JD. Effects on reproductive performance of administration of GnRH to early postpartum dairy cows. J Anim Sci 1980; 50: 1017.
24. Peche E. Course of the puerperium in cattle after placental retention, with reference to hormonal induction of ovarian activity by means of gonadotrophin releasing hormone and pregnant mares serum gonadotrophin between 10 and 12 days after parturition. PhD Thesis, University of Munich, 1979.
25. Peters AR, Riley GM. In "Factors influencing fertility in the postpartum cow" (eds H Karg and M Schalenberger), 225, Martinus Nijhoff, The Hague, 1982.
26. Radford HM, Nancarrow CD. Ovarian function in suckling and non-suckling beef cows postpartum. J Reprod Fert 1978; 59: 49-56.

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina F2 α – dinoprost na reproduktivne parametre mliječnih...

27. Richardson GF, Archibald LF, Galton DM. Effect of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2 alfa on reproduction in postpartum dairy cows. Theriogenology 1983; 19: 763.
28. Sherington J, Roche JF. Reproductive efficiency in spring calving dairy cows. Irish Vet J 1978; 32(8): 137.
29. Slama H, Wells ME, Adams GD. Factors affecting calving interval in dairy herds. J Dairy Sci 1976; 59: 7.
30. Stevenson JS, Call EP. Fertility of postpartum dairy cows after administration of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2 alpha: a field trial. J Dairy Sci 1988; 71(7): 1926-33.
31. Stevenson JS, Phatak AP. Insemination at estrus induced by presynchronization before application of synchronized estrus and ovulation. J Dairy Sci 2005; 88: 399-405.
32. Šabanović M, Mutavelić T, Suljkanović A, Lazarević M. Uticaj aplikacije gonadorelina u puerperiju na reproduktivne parametre krava. Vet glasnik 2006; 63(1-2): 305-21.
33. VanDemark NL, Salisbury GW. The relation of the postpartum breeding interval to reproductive efficiency in dairy cow. J Anim Sci 1950; 9: 307-13.
34. Young IM *et al.* Increased conception rate in dairy cows after early postpartum administration of prostaglandin F2 alpha THAM. Vet Rec 1984; 155: 429-31.
35. Zeddies J. Der Wirtschaftliche Werte der Fruchtbarkeit. Die Milchpraxis, VIII, 1977.

ENGLISH

**INFLUENCE OF GnRH – GONADORELINE AND PROSTAGLANDINE F2 α –
DINOPROST APPLICATION ON REPRODUCTION PARAMETAR VALUES IN
DAIRY COWS WITH PUERPERAL ENDOMETRITIS**

M. Šabanović, N. Paprikić, A. Suljkanović, J. Miljas, M. Lazarević

This paper presents results of investigations of gonadoreline application (14-16, 17-20 and 21-25 days *post partum*) influence, followed by prostaglanin F2 α ten days later, on the reproductive parameters of dairy cows with difficult calvings and endometritis. The study was carried out on a total of 92 Holstein-Friesian cows. Fifty of them treated with hormones, while 42 animals served as controls, receiving placebo injections.

Analysis of the results in cows with postpartal endometrits revealed that mean anoestrus period, open days period and intervals between calvings were significantly lower in cows that underwent hormonal treatment, when compared to the controls. The period from gonadoreline application, followed by prostaglandine injection, to conception was shorter by 44, 28 and 14 days respectively when compared to the control groups. The total conception rate from the first three artificial inseminations was higher in the experimental groups in comparison to the controls.

Key words: cows, GnRH – gonadoreline, prostaglandine F2 α – dinoprost, reproductive parametars, endometritis

Vet. glasnik 63 (5-6) 269 - 283 (2009) M. Šabanović i sar.: Utjecaj aplikacije GnRH – gonadorelina i prostaglandina $F2\alpha$ – dinoprosta na reproduktivne parametre mliječnih...

РУССКИЙ

ВЛИЯНИЕ АППЛИКАЦИИ ГОНАДОРЕЛИНА И ПРОСТАГЛАНДИНА $F2\alpha$ НА РЕПРОДУКТИВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ МОЛОЧНЫХ КОРОВ С ПУЕРПЕРАЛЬНЫМИ ЭНДОМЕТРИТАМИ

М. Шабанович, Н. Паприкич, А. Сульканович, Й. Миляс, М. Лазаревич

Эта работа содержит результаты испытания аппликации гонадорелина в временных периодах от 14 до 16, 17 до 20 и 21 до 25 дней *post partum* и простагландина $F2\alpha$, десять дней позже от этой инъекции, на репродуктивные параметры молочных коров, которые имели тяжёлые теления и после них эндометриты. Исследования выведены у совокупно 92 плодовитые коровы холштайн-фризийской породы. Гормонами было лечено 50 коров, пока в контрольных группах было совокупно 42 плодовитые коровы, которые в таких же интервалах были апплицированы плацебо инъекции.

Анализом полученных результатов у коров с послеродовым эндометритом утверждено, что средний анэструсный период, сервис период и интервал между телением в группах плодовитых коров, леченных гонадорелином и простагландином $F2\alpha$, значительно более короткий в отношении контрольных групп. Временный период от аппликации гонадорелина (слежены аппликацией простагландина) до концепции, к леченным группам был более короткий 44, 28 и 14 дней в отношении контрольных. Совокупная концепция, от первых трёх искусственных осеменений, у коров, леченных гормональными препаратами была больше во всех трёх опытных группах по сравнению с стоимостями, достигнутыми у контрольных единичных животных.

Ключевые слова: коровы, гонадорелин - GnRH, простагландин $F2\alpha$, репродуктивные параметры, эндометриты

**BLOOD CONCENTRATIONS OF THYROID HORMONES AND
LIPIDS AND HISTOLOGICAL CHANGES IN THE LIVER IN
DAIRY COWS IN POSTPARTURIENT PERIOD***

**KONCENTRACIJE HORMONA TIROIDNE ŽLEZDE I LIPIDA U KRV
I HISTOLOŠKE PROMENE U JETRI KOD MLEČNIH KRAVA U
POSTPARTALNOM PERIODU**

R. Đoković**

The triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4), glucose, free fatty acids (FFA), triacylglycerols (TAG) and total cholesterol concentrations were estimated in the blood serum and content of lipids in the liver in healthy ($n=10$) and ketotic ($n=10$) dairy cows in the postparturient period. Samples of liver and blood tissues were taken from all the cows. Pathohistological examination of liver tissues showed statistically significant higher ($p<0.01$) lipid infiltration in ketotic cows compared to healthy ones. Biochemical examination of blood serum showed significantly higher values ($p<0.01$) of free fatty acids in ketotic cows such as significantly lower concentrations of glucose ($p<0.01$), triacylglycerols ($p<0.01$), total cholesterol ($p<0.05$), triiodothyronine ($p<0.05$) and thyroxine ($p<0.05$) compared to values of these parameters in the blood serum in healthy cows. Significant increase of concentration of free fatty acids, such as positive correlation ($r=0.51$; $p<0.05$) between the free fatty acids in blood and the content of lipids in liver in ketotic cows compared to healthy ones, as well as pathohistological report, shows that during intensive lipomobilisation newly synthesized triacylglycerols accumulated in the hepatocytes. In ketotic cows hypothyroidal status is established and it can be a significant factor in the development of fatty liver.

Key words: cows, fatty liver, ketosis, lipids, triiodothyronine, thyroxine

* Rad primljen za štampu 31. 10. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Radojica Đoković, Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agronomy, Čačak, University of Kragujevac, Serbia

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

Introduction / Uvod

Most metabolic disorders develop during the postparturient period. Fatty liver and ketosis present the most frequent disturbances occurring in dairy cows, resulting in significant economical losses due to a decrease in milk production (10-15%) high expenses of therapeutic treatment, emergency slaughter and deaths. Fatty liver develops during the periparturient period, when mobilization of lipids from bodily fat reserves are elevated and the rate of triglycerides accumulation in the liver is particularly high (Veenhuizen *et al.*, 1991; Vazquez-anon *et al.*, 1994; Reist *et al.*, 2002).

Lipomobilisation characterised by high concentrated free fatty acids in blood starts within high pregnancy, reaching its maximum at early lactation. Free fatty acids are re-esterified and accumulated in the form of triacylglycerols in the liver, primarily due to a decreased capacity of hepatocytes for transport of lipids by very low density lipoproteins (VLDL). As a result, lipomobilisation intense ketogenesis and lipogenesis in the liver and as a consequence, lower concentrations of glucose, triacylglycerol and total cholesterol in blood were manifested (Herdt *et al.*, 1983; Holtenius, 1989; Veenhuizen *et al.*, 1991; Grummer, 1993; Vazquez-anon *et al.*, 1994; Sevinc *et al.*, 2003).

The hormonal activity of the thyroid gland has an important role in early lactation for determining cell metabolism intensity, energy metabolism and the lactation course itself by its thyroid hormones (Nikolić *et al.*, 1997). A positive correlation was established between thyroid hormones in blood and energy balance (Reist *et al.*, 2002) and a negative one between concentrations of triiodothyronine and thyroxine in blood and milk production (Nixon *et al.*, 1988). Under the conditions of a negative energy balance and of high lipomobilisation, the concentrations of thyroid hormones were reduced in blood of dairy cows in the postparturient period, with pronouncedly declined triiodothyronine in blood shortly before and after calving (Blum *et al.*, 1983; Gerloff *et al.*, 1986; Nikolić *et al.*, 1997; Reist *et al.*, 2002; Pezzy *et al.*, 2003).

Kapp *et al.* (1979) noticed diffusal lipid infiltration of hepatocytes, impairing most of them, took place due to a reduced mitochondria capacity to oxidize fatty acids at reduced levels of thyroid hormones in blood. Allowing for a role of thyroid hormones in the energy metabolism as well as in the milk production during lactation, the correlation between the concentrations of thyroid hormones, lipids and glucose in blood and histological changes in the liver tissue in the postparturient period was the subject of the current research.

Materials and methods / Materijal i metode rada

The high pregnant and calved cows (n=20) were chosen from a Holstein dairy herd and split up into two groups, the first one (C – control group)

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

(n=10) consisting of clinically healthy cows, the other (E-experimental group) (n=10) consisting of ketotic ones. The liver and blood samples were taken from all the cows. The cows were average on the 4-6 years old, 650 kg in weight, with 3 lactations and 7625 l milk of average milk production per 305 days of lactation. The diseased cows were those indicating clinical symptoms of ketosis (inappetence, rumen atony and behavioural changes) with urine of their ketotic bodies exceeding $17.20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Lastradet-Rosenberg test 1978). The trial cows were kept in tie-up stalls in a barn housing. Diet and feeds were in conformity with purpose and animal utilisation. The meal was prepared in the way to suit the energy needs of animals in early lactation.

The blood samples were collected by puncture of the jugular vein (2 test tubes of blood taken per puncture, around 20 ml blood) from 10 a.m. to noon or from 4 to 6 h after milking and feeding. The blood serum separation was aided at 3000 rotations/min. The blood serum samples were kept in a fridge at -18°C before the investigation started.

Shortly after blood sampling the liver tissue was sampled through liver percutaneous biopsy using a biopsy instrument (Davies et al. and Jebbett, 1981; Gaál, 1995) following a modified method of Gaál after Hajjovcava-Kacifirex (1967). The biopsy was performed at the right 11th intercostal region, approximately 2 cm below the horizontal line through the tuber coxae, with a 3-5 cm long and 3-4 mm wide liver specimen.

Triiodothyronine (T_3) and thyroxine (T_4) concentrations in the blood serum samples were determined following the RIA method, using commercial test packages (INEP-Zemun) and those of free fatty acids (FFA) colorimetrically according to Ducombe (1966), with the colorimetric test No. 001 INEP Zemun being used. The determination of glucose contained in blood was made through GOD-PAP phenol method Dialab (Austria) cat. No. 760312, that of triacylglycerols (TAG) in blood serum through GPO-PAP method cat. No. A 40015 and total cholesterol in the blood serum CHOD-PAP method cat. No. 041015, reagents Serbolab (Serbia) by means of microtiter reader MULTISKAN MCC/340 (Helsinki, Finland). All biochemical parameters were assayed at the laboratory of the Institute for the Application of Nuclear Energy (INEP) Zemun. Liver tissue was pathohistologically tested for lipid content at the Pathological Department of the Faculty of Veterinary Medicine in Belgrade. The liver specimens were fixed in neutral 10% formaldehyde solution. Cryostat sections were stained with hematoxylin and eosin and Sudan-III in order to determine the degree of lipid infiltration. The amount of fats in the liver were determined stereometrically, computing volume density according to the formula:

$$V_{vf} = \frac{P_f}{P_t} \times 100$$

V_{vf} – volumen density of phase
 P_f – points which fallen on phase
 P_t – points of test system

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

For determination of the amount of fats in the hepatocytes the net M 100 was used.

The significance of differences of thyroid hormones, lipids and glucose concentrations in the blood serum and the content of lipids in the liver between the animal groups used in the experiment were determined by the ANOVA procedure. Data are expressed as means $\pm$ standard deviation ($\bar{x} \pm SD$). Correlation coefficients were obtained using linear regression models. Differences with $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were considered statistically significant (microsoft STATISTICA ver.5.0, Stat. Soft. Inc.1995).

This experiment has been aproved by the veterinary inspection at Novi Sad.

Results / Rezultati

The results of selected metabolic parametars of the groups of healthy cows (C – control group) and ketotic cows (E – experimental group) are shown in Table 1.

Table 1. *Selected metabolic profile parameters (means $\pm$ standard deviation) of the groups of healthy (C – control group) and ketotic (E – experimental group) cows in the post-parturient period /*

Tabela 1. Odabrani parametri metaboličkog profila (srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija) grupa zdravih krava (C – kontrolna grupa) i ketoznih krava (E – eksperimentalna grupa) u postpartalnom periodu

	Ketotic cows / Ketozne krave	Healthy cows / Zdrave krave
Group / Grupa (n = 10)	E	C
Glucose / Glikoza (mmol·l ⁻¹)	1.80 $\pm$ 0.43	2.71 $\pm$ 0.35**
FFA (mmol·l ⁻¹)	0.74 $\pm$ 0.12	0.46 $\pm$ 0.10**
TAG (mmol·l ⁻¹)	0.27 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.04**
Total cholesterol / Ukupni holesterol (mmol·l ⁻¹)	1.39 $\pm$ 0.29	1.86 $\pm$ 0.62*
T ₃ (nmol·l ⁻¹)	1.58 $\pm$ 0.70	2.22 $\pm$ 0.74*
T ₄ (nmol·l ⁻¹)	35.06 $\pm$ 12.43	45.75 $\pm$ 14.27*
Content of lipids in the liver / Sadržaj lipida u jetri (%)	32.91 $\pm$ 13.23	8.37 $\pm$ 1.24**

Legend: * $p < 0.05$ (between group E and C); ** $p < 0.01$ (between group E and C) /

*Legenda: * $p < 0,05$ (između grupe E i C); $p < 0.01$ (između grupe E i C)*

From Table 1 it can be seen that there were significant changes of most parameters in blood in the group of ketotic i.e. the group of cows with fatty liver. Blood glucose concentration was significantly lower in ketotic cows than in control cows ($p < 0.01$). Biochemical examination of lipids in the blood serum showed significantly higher values ($p < 0.01$) of free fatty acids in ketotic cows such as significantly lower concentrations of triacylglycerols ($p < 0.01$) and total

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

cholesterol ($P < 0.05$), compared to the values of these lipids parameters in the blood serum in the groups of healthy cows. The results also showed that the concentration of both thyroid hormones was significantly lower in the blood serum of ketotic cows, than in the blood serum of normal, control cows ($p < 0.05$).

In the group of ketotic cows, the content of lipids in the liver was 32.91 ± 13.23 % and it was higher ($p < 0.01$) compared to the group of healthy cows (8.37 ± 1.24 %).

The results of single values of the content of the lipids in the liver in ketotic cows are shown in Table 2.

Table 2. *The content of the lipids (%) in the liver of ketotic cows /*
Tabela 2. Sadržaj lipida (%) u jetri ketoznih krava

Ordinal number / <i>Redni broj</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	x
% of lipids / <i>% lipida</i>	25.44	23.66	23.98	61.15	44.82	42.56	16.04	31.86	32.98	26.62	32.91

According to the Gaál's (1993) proposal all cows can be divided into 3 groups on the basis of content of lipids in the liver: 1st group – mild degree of fatty liver (0-20 %), 2th group – moderate degree of fatty liver (20-40 %) and 3th group – severe degree of fatty liver (more than 40 %). The obtained results show that only one cow with ketosis had a mild degree of lipid infiltration of liver cells or 10 % of tested cows, in six cows there was a moderate degree of fatty liver (60 %) and in three cows (30 %) severe fatty liver had been determined.

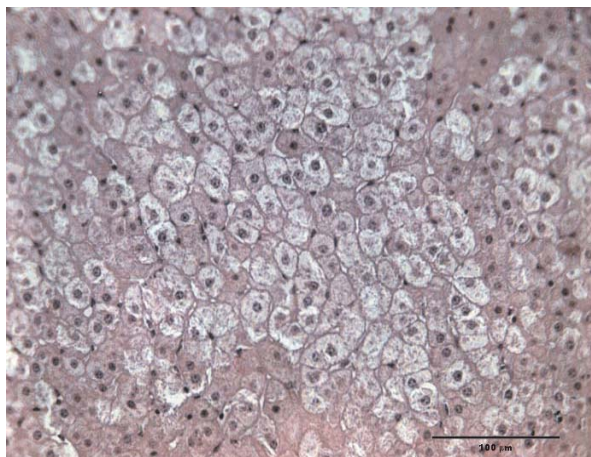


Figure 1. *Hepatocytes with light, fine granulated cytoplasm in the liver of a puerperal healthy cow (HE, 270x) /*

Slika 1. Hepatociti sa svetlom, fino granuliranom citoplazmom u jetri postpartalne zdrave krave (HE, 270x)

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

Significant content of lipids in hepatocytes has not been determined in healthy cows after calving. In histological preparations hepatocytes were normal by size, shape and order. In some of them lighter fine granulated cytoplasm was noted, while nuclei in some of those hepatocytes were masked (Figure 1).

Histological examination of liver of cows with a mild degree of fat infiltration in hepatocytes has been determined in the presence of intracytoplasmatic single tiny fat droplets placed centrolobularly. The shape and size of hepatocytes remained unchanged and such was the relation between hepatocytes and sinu-

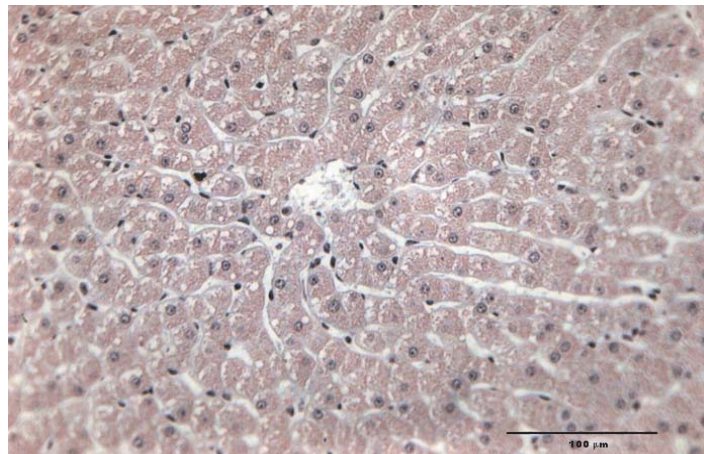


Figure 2. *Fatty changes of low intensity (16.04 %) in the liver of a ketotic cow (HE, 270x) / Slika 2. Masne promene niskog intenziteta (16,04%) u jetri ketozne krave (HE, 270x)*

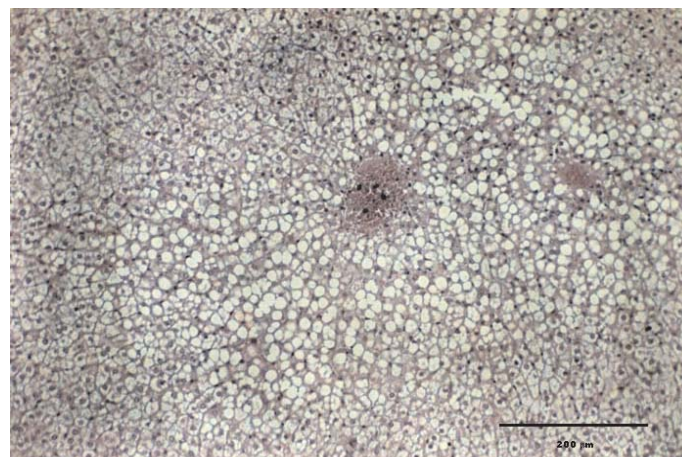


Figure 3. *Fatty changes of medium to high intensity (32.96%) in the liver of a ketotic cow (HE, 130x) / Slika 3. Masne promene srednjeg do visokog intenziteta (32,96%) u jetri ketozne krave (HE, 130x)*

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

soids (Figure 2). In cows with a moderate degree of fatty liver pathohistological changes of the liver tissue were in correlation with the amount of lipids in the hepatocytes. In lighter forms single tiny fat droplets were noticed in centrolobularly placed hepatocytes. The nuclei of these cells were visible and without changes. With the increase of the amount of fat the number of infiltrated hepatocytes increases such as the number and size of fat droplets in them. Nuclei of the cell were peripherally dislocated and in the heavier forms they were becoming piknotic or were completely missing (Figure 3). In the severe degree of fatty liver, patohistological changes of liver tissue were the most visible, i.e. hepatocytes were almost completely filled by middle and large sized fat droplets, the size of hepatocytes was considerably increased, nuclei were damaged and peripherally dislocated, piknotic or completely missing (Figure 4).

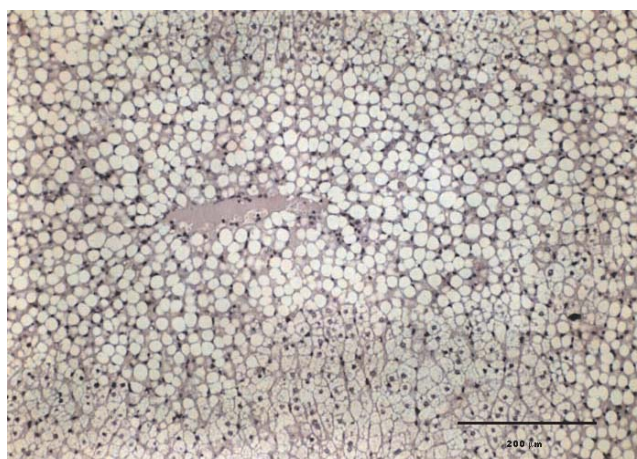


Figure 4. Selection of fats in a major part of the liver lobule (42.56%) in a ketotic cow (HE, 130x) /

Slika 4. Nagomilane masti u većem delu jetrenog režnjača (42,56%) ketozne krave (HE, 130x)

Discussion / Diskusija

Primary homeoretic adaptation of the glucose metabolism in the early lactation leads to an increased gluconeogenesis in the liver to direct glucose to the mammary gland for lactose synthesis (Reynolds *et al.*, 2003). If the degree of gluconeogenesis does not satisfy the increased needs in glucose of dairy cows in early lactation, hypoglycaemia, ketonemia and ketonuria likely occurs (Young, 1977).

In the group of ketotic cows, hypoglycaemia was determined which was significantly lower ($p < 0.01$) compared to the groups of healthy cows. Similar

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

results were obtained by other authors (Veenhuizen *et al.*, 1991; Vazquez-anon *et al.*, 1994). Needs for glucose in early lactation in dairy cows are higher than the amount which the body can provide in the condition of high milk production and that is an important factor in the development of hypoglycaemia and ketosis.

In ketotic cows there is a decreased ability of hepatocytes to synthesise glucose by gluconeogenesis and as a consequence fatty liver development (Gröhn, 1985; Veenhuizen *et al.*, 1991; Codorniga-valino *et al.*, 1997). In accordance with this, we have confirmed in our test the negative correlation ($r=-0.69$; $p<0.05$) between glucose concentration in blood and content of lipids in the liver in the group of ketotic cows.

In this experiment, pathohistological examination of liver tissues shows statistically significant higher ($p<0.01$) lipid infiltration in ketotic cows compared to healthy cows. In the ketotic cows, various degrees of fatty liver were estimated.

Similar results of the testing of structure of fatty liver in dairy cows using light or electron microscopy were also obtained by other authors (Kapp *et al.*, 1979; Gröhn, 1985; Gröhn and Lindberg, 1985; Johannsen *et al.*, 1993). These authors have determined an increase of the hepatocyte volume, compression and decrease of volume nuclei, glycogen, sinusoids, rough endoplasmic reticulum and other organelles in the hepatocytes, a decrease of the number with simultaneous increase in the size of mitochondria and mitochondrial damage such as increase in a smooth endoplasmic reticulum and the number and size of fat droplets.

The energy metabolism in dairy cows in the transitional period is closely linked to lipid metabolism. The best indicator of negative energy balance and the degree of mobilisation of lipids from bodily fat reserves in the postpartal period is the increase of FFA concentrations in blood (Veenhuizen *et al.*, 1991; Vazquez-anon *et al.*, 1994; Reist *et al.*, 2002; Overton and Waldron, 2004). There is an increase in blood FFA concentrations which are bound to albumin and transported to the liver. In the liver, they may be oxidized to CO_2 or ketone bodies or they are re-esterified to TAG. TAG are then combined with phospholipids, cholesterol and apoproteins, with the production of lipoproteins and mainly lipoproteins of very low density (VLDH) that carry TAG to various tissues (Holtenius, 1989).

Significantly higher FFA concentrations have been determined in the blood ($p<0.01$) of ketotic cows than in healthy cows. This agrees with the studies of Veenhuizen *et al.* (1991), Reist *et al.* (2002) and Overton and Waldron (2004).

In accordance, in this experiment significant positive correlation ($r=0.51$; $p<0.05$) was determined between the FFA in blood and the content of lipids in the liver such as a negative correlation ($r=-0.64$; $p<0.05$) between the FFA and TAG concentrations in blood in the group of ketotic cows. The obtained results unambiguously show that the significant increase of FFA concentrations in blood causes an increase of the amount of lipids in the liver cells.

In cows with fatty liver the TAG and total cholesterol concentrations in the blood decline (Sevinc *et al.*, 2003). In ruminants relatively low TAG concentra-

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

tions in the blood serum ($2.6\text{--}5.2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, Jovanović, 1984) and the further decline of their concentrations could be a consequence of lipid infiltration of liver cells.

In this experiment significantly lower ($p<0.01$) TAG concentrations has been determined in blood in the group of ketotic cows than the values in the group of healthy cows, such as a significant negative correlation ($r=-0.55$; $p<0.05$) between the TAG concentrations in blood and the amount of lipids in the liver in the group of ketotic cows. The results unambiguously indicated that the blood TAG concentrations decreased and proportionally their amount increased in the liver cells in which they accumulated. These results are in accordance with the observation by Holtenius (1989) and Sevinc *et al.* (2003).

Furthermore, the significant positive correlation ($r=0.54$; $p<0.05$) between glucose and TAG levels in blood clearly shows that during intensive lipomobilisation and accumulated TAG in the liver cells, their gluconeogenetic ability is decreased, which is probably one of the main causes of developing hypoglycaemia in the animals.

Contrary to this, in healthy cows in the puerperal period, a positive correlation ($r=0.70$; $p<0.05$) has been determined between the FFA and TAG concentrations in blood. This indicates that in the condition of lipomobilisation in blood of just calved healthy cows the increase of TAG concentrations in blood and unlike the ketotic cows TAG do not accumulate in the liver, but are transported by the blood to the tissues which use them for their purposes.

According to Gerloff *et al.* (1986) a low level of total cholesterol in blood has been observed in the cows which have damaged liver function.

In this study the total cholesterol concentrations in blood in the tested group of cows were within the lowest physiological limit ($1.3\text{--}6.0\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, Jovanović, 1984) and significantly lower ($p<0.05$) levels of the total cholesterol were determined in blood in ketotic cows than of healthy group of cows. These results were in accordance with the results of other authors (Gerloff *et al.*, 1986; Holtenius, 1989; Sevinc *et al.*, 2003) which indicate that in the condition of ketosis and fatty infiltration of liver cells in dairy cows, their ability to synthesize and transport cholesterol is decreased.

The decline of TAG and total cholesterol levels in the blood of ketotic cows is the consequence of decreased or insufficient synthesis of lipoprotein fractions. This is specially important from the aspect of synthetic activity of hepatocytes, because in the conditions of fatty infiltration their role is significantly decreased, so that concentration of all lipoprotein fractions in blood decreases (LDL, VLDL and HDL) and a specially of those which are responsible for transporting TAG from the liver (VLDL) (Herdth, 1983; Gerloff *et al.*, 1986; Holtenius, 1989; Sevinc *et al.*, 2003).

In early lactation, dairy cows are in a state of metabolic stress in order to satisfy the increased energy of the mammary gland and the adjustment of the neuro-endocrine system of dairy cows to the new metabolic needs of the body

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

(Bauman and Currie, 1980; Nikolić *et al.*, 1997). One of the endocrine factors are the thyroid hormones. In this study significantly lower ($p < 0.05$) T_3 and T_4 concentrations in blood have been determined in the group of ketotic cows compared to the values of these hormones in the blood in group of the healthy cows. There is also a significant positive correlation ($r = 0.73$; $p < 0.05$) between the T_3 and T_4 levels in blood. Similar results have been obtained by other authors (Gerloff *et al.*, 1986; Nikolić *et al.*, 1997; Stang *et al.*, 1998b; Reist *et al.*, 2002). It is considered that thyroid hormones, especially T_3 which is about four times more active than T_4 , have an important role in the postparturient period in dairy cows, because in their very low concentrations in blood usage of bodily fat reserves are enabled as well as their transfer for high milk production. In accordance with this, Nixon *et al.* (1988) and Reist *et al.* (2002) have determined the negative correlation between T_3 and T_4 concentrations in blood and production of milk and the positive correlation with the energy balance.

Pezzy *et al.* (2003) consider that in dairy cows in early lactation, the state of hypothyroidism is present and it is the cause of the liver's decreased 5'-deiodinase activity or the secretion of thyroid hormones in milk. Namely, the authors have determined the highest T_3 and T_4 concentrations in colostrum when the concentrations of these hormones in blood were the lowest.

The hepatic capacities for disposal of FFA through mitochondrial or peroxisomal β oxidation or export as TAG with VLDL are limited in ruminants compared with nonruminants (Grummer 1993; Palmquist 1994).

It is well known that the intensity of oxidation in mitochondria of cells is in strong correlation with the functional state of the thyroid gland, so it is justifiably considered that the conditions of negative energy balance and the increased lipomobilisation from bodily fat reserves result in lipid infiltration of liver cells. The reason is the decreased capacity of mitochondria to oxidize fatty acids in the conditions of low concentrations of thyroid hormones in blood (Kapp *et al.*, 1979; Stang *et al.*, 1998b).

Romo *et al.* (1997) reported that as a consequence of liver steatosis, FFA accumulate in the liver parenchyma and it has been demonstrated that some fatty acids inhibit type-I liver 5'-deiodinase activity.

These opinions are confirmed by these results, since significantly lower ($p < 0.05$) values of T_3 and T_4 in blood of ketotic cows have been determined as compared to the healthy ones. Within all tested cows with ketosis, the fat infiltration of the liver has been determined, especially in cows with severe fatty liver ($> 40\%$) the lowest values of the T_3 ($< 1.00 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) and those of T_4 ($< 15 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$) were established (physiological range T_3 : around $1.5 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$; T_4 : $40 - 80 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$; Jovanović, 1984). That confirms the negative correlation ($r = 0.50$; $p < 0.05$) between the T_3 and FFA concentrations in blood in the ketotic cows.

Kapp *et al.* (1979), on the basis of the results of a pathological examination of the liver tissue taken by biopsy and the concentrations of thyroid hormones in blood, indicates that at their very low concentrations in blood, the most

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

noticeable is lesion of organelles of hepatocytes while the cytoplasm is completely filled with fat droplets. For this reason, the authors consider that diffuse infiltration of hepatocytes in ketotic cows occurs because of the decreased capacity of mitochondria to oxidize FFA in the conditions of decreased or discontinued activity of thyroid hormones.

On the basis of the obtained results and the pathohistological report, it can be concluded that the significantly decreased concentrations of thyroid hormones in blood in ketotic cows is the key mechanism in the peripheral tissues adaptation during the decreased energy turnover which is used for the mammary gland requirements. Such conditions of metabolism regulation and energy insufficiency (considerable increase of the levels of FFA and hypoglycaemia) and very low concentrations of thyroid hormones in blood decrease the intensity of oxidation processes in the body tissues, as well as liver cells and that creates the conditions for fatty liver development in these animals.

References / *Literatura*

1. Bauman B, Curie. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation. A review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. J Dairy Sci 1980; 63: 1514-8.
2. Blum JW, Kunz P, Leuenberger H, Gautschi K, Keller N. Thyroid hormones, blood plasma metabolites and haematological parameters in relationship to milk yield in Dairy cows. Anim Prod 1983; 36: 93-104.
3. Codorniga-valino C, Grummer RR, Armentano LE, Donkin SS, Bertics SJ. Effects of fatty acids and hormones on fatty acids metabolism and gluconeogenesis in bovine hepatocytes. J Dairy Sci 1997; 80: 646-56.
4. Gaál T. Sindrom masne jetre u mlečnih krava. Vet Glasnik 1993; 47(4-5): 311-7.
5. Gerloff B, Herdt T, Emery R. Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. JAVMA 1986; 188: 845-9.
6. Gerloff BJ, Herdt TH, Welles WW, Nachreiner RF. Inositol and hepatic lipidosis. II. Effect of inositol supplementation and time from parturition on serum insulin, thyroxine and triiodothyronine and their relationship to serum and liver lipids in dairy cows. J Anim Sci 1986; 62(6): 1693-702 (abstract).
7. Gröhn Y. Liver function and morphology associated with fatty liver and ketosis in dairy cows. PhD Thesis, College of Veterinary Medicine, Helsinki 1985; 24-9.
8. Gröhn Y, Lindberg LA. Ultrastructural change of the liver in spontaneously ketotic cows. J Comp Path 1985; 95: 130-5.
9. Grummer RR. Etiology of lipid related metabolic disorders in periparturient dairy cows. J Dairy Sci 1993; 76: 3882-96.
10. Grummer RR. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cows. J Anim Sci 1995; 73: 2820-33.
11. Herdt TH, Leisman JS, Gerloff BJ, Emery. Reduction of serum triacylglycerol-rich lipoprotein concentrations in cows with hepatic lipidosis. Am J Vet Res 1983; 44: 293-6.
12. Holtenius P. Plasma lipids in normal cows around partus and in cows with metabolic disorders with and without fatty liver. Acta Vet Scand 1989; 30: 441-5.

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

13. Johannsen U, Mengen S, Staufenbiel R, Klukas. Untersuchungen zur morphologie und funktion der leber von hochleistungskuhern 2. Wochen postpartum. Dtsch Tierarzti Wschr 1993; 100: 168-208.
14. Jovanović M. Fiziologija domaćih životinja. Medicinska knjiga, Beograd – Zagreb, 1984; 34 p. and 438 p.
15. Kapp P, Pethes GY, Zsiros M, Chuster. Data on the pathogenesis of fatty liver disease in high-producing dairy cows. Magyar Allatorvosok Lapja 1979; 34(7): 458-61.
16. Nikolić JA, Šamanc H, Begović P, Damjanović Z, Djoković R, Kostić G, Krsmanović J, Resanović V. Low peripheral serum thyroid status independently affects the hormone profile of healthy and ketotic cow during the first week postpartum. Acta Veterinaria 1997; 47(1): 3-14.
17. Nixon DA, Akasha MA, Anderson RR. Free and total thyroid hormones in serum of Holstein cows. J Dairy Sci 1988; 71: 1152-60.
18. Overton TR, Waldron MR. Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. J Dairy Sci 2004; 87: E105-E119.
19. Palmquist DL. The role of dietary fats in efficiency in ruminants. J Nutr 1994; 124: 1377S-1382 S.
20. Pezzzy C, Accorsi PA, Vigo D, Govani N, Gaiani R. 5'-Deiodinase activity and circulating thyronines in lactating cows. J Dairy Sci 2003; 86: 152-8.
21. Reist M *et al.* Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. J Dairy Sci 2002; 85: 3314-27.
22. Reynolds CK, Aikman PC, Lupoly B, Humpheirs DJ, Beever DA. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. J Dairy Sci 2003; 86: 1201-17.
23. Romo GA, Elssasser TH, Khal S, Erdman RA, Casper DP. Dietary fatty acids modulate hormone responses in lactating cows: Mechanistic role for 5'-deiodinase activity in tissue. Domest Anim Endocrinol 1997; 14: 409-20.
24. Sevinc M, Basoglu A, Guzelbekta H. Lipid and lipoprotein levels in dairy cows with fatty liver. Turk J Vet Anim Sci 2003; 27: 295-9.
25. Stang BD, Bertics SJ, Grummer RR, Armentano LE. Relationship of triglyceride accumulation to insulin clearance and hormonal responsiveness in bovine hepatocytes. J Dairy Sci 1998b; 81: 740-7.
26. Vazquez-anon M, Bertics S, Luck M, Grummer R. Peripartium liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows. J Dairy Sci 1994; 77: 1521-8.
27. Veenhuizen JJ, Dracklez JK, Richard MJ, Sanderson TP, Miller LD, Joung JW. Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of Experimental Fatty liver and ketosis in cows. J Dairy Sci 1991; 74: 4238-53.
28. Young JW. Gluconeogenesis in cattle: significance and methodology. J Dairy Sci 1977; 60: 1-15.

Vet. glasnik 63 (5-6) 285 - 297 (2009) R. Đoković: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and histological changes in the liver in dairy cows in...

SRPSKI

KONCENTRACIJE HORMONA TIROIDNE ŽLEZDE I LIPIDA U KRV I HISTOLOŠKE PROMENE U JETRI KOD MLEČNIH KRAVA U POSTPARTALNOM PERIODU

R. Đoković

Određivane su koncentracije trijodtironina, tiroksina, glukoze, slobodnih masnih kiselina, triglicerida i ukupnog holesterola u krvnom serumu i histološke promene u jetri kod 10 zdravih i 10 ketoznih mlečnih krava u postpartalnom periodu.

Patohistološkim ispitivanjima tkiva jetre utvrđena je statistički značajno veća ($p < 0,01$) masna infiltracija hepatocita kod ketoznih krava u odnosu na zdrave krave. Biohemijskim ispitivanjima krvnog seruma utvrđene su značajno veće vrednosti slobodnih masnih kiselina ($p < 0,01$) i značajno niže vrednosti trijodtironina ($p < 0,05$), tiroksina ($p < 0,05$), glukoze ($p < 0,01$), triglicerida ($p < 0,01$) i ukupnog holesterola ($p < 0,05$) u krvnom serumu ketoznih krava u odnosu na zdrave krave.

Kod grupe ketoznih krava utvrđena je pozitivna korelacija ($r = 0,51$; $p < 0,05$) između sadržaja masti u jetri i koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvnom serumu, što ukazuje da se slobodne masne kiseline zadržavaju u jetri u obliku triglicerida. Kod krava obolelih od ketoze utvrđen je hipotiroidni status, što može biti značajan činilac u razvoju masne jetre kod mlečnih krava.

Ključne reči: krave, masna jetra, ketoza, lipidi, trijodtironin, tiroksin

РУССКИЙ

КОНЦЕНТРАЦИЯ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЛИПИДОВ В КРОВИ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ У МОЛОЧНЫХ КОРОВ В ПОСЛЕРОДОВОМ ПЕРИОДЕ

Р. Джокович

Определены концентрации триодтиронина, тироксина, глюкозы, свободных жирных кислот, триглицеридов и совокупного холестерина в кровяном сыворотке и гистологические изменения в печени у 10 кетозных молочных коров в послеродовом периоде.

Патогистологическими испытаниями тканей печени утверждена статистически значительно больше ($p < 0,01$) жирная инфильтрация гепатоцитов у кетозных коров в отношении здоровых коров. Биохимическими испытаниями кровяного сыворотки утверждены значительно более высокие стоимости свободных жирных кислот ($p < 0,01$) и значительно более низкие стоимости триодтиронина ($p < 0,05$), тироксина ($p < 0,05$), глюкозы ($p < 0,01$), триглицеридов ($p < 0,01$) и совокупного холестерина ($p < 0,05$) в кровяном сыворотке кетозных коров в отношении здоровых коров.

У групп кетозных коров утверждена положительная корреляция ($r = 0,51$; $p < 0,05$) между содержанием жира в печени и концентрации свободных жирных кислот в кровяном сыворотке, что указывает, что свободные жирные кислоты задерживаются в печени в форме триглицеридов. У коров заболевших кетозом утверждено гипотиреоидный статус, что может быть значительный фактор в развитии жирной печени у молочных коров.

Ключевые слова: коровы, жирная печень, кетоз, липиды, триодтиронин, тироксин

**OSETLJIVOST KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOKA
IZOLOVANIH IZ MLEČNE ŽLEZDE KRAVA NA ODABRANE
ANTIBAKTERIJSKE LEKOVE***

***SUSCEPTIBILITY OF COAGULASE POZITIVE STAPHYLOCOCCI
ISOLATED FROM COW'S MAMMARY GLAND TO ANTIBACTERIAL
DRUGS***

Nataša Rajić Savić, Vera Katić**

Koagulaza pozitivne stafilokoke su jedan od najčešćih uzročnika hroničnih mastitisa. Neselektivna primena antimikrobnih sredstava i njihovo prisustvo u sredini gde borave životinje je dovelo do selekcionisanja rezistentnih sojeva koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobna sredstva. Pravilna i pravovremena terapija subkliničkih mastitisa, zasnovana na primeni najefikasnijeg antimikrobnog leka, je ključna za dobro zdravstveno stanje zapata.

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita osetljivost na odabrana antimikrobna sredstva koagulaza pozitivnih stafilokoka koje su izolovane iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava u slučaju intramamarnih infekcija sa tri farme sa različitom prevalencom mastitisa.

Iz ukupno 9245 uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava sa tri farme, izolovana su 852 soja koagulaza pozitivnih stafilokoka. Koagulaza pozitivne stafilokoke su izolovane na krvnom agaru i identifikovane na osnovu makromorfoloških osobina i koagulaza testa. Agar difuzionom Metodom po Kirbi Baueru ispitana je osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka prema sledećim antimikrobnim sredstvima: penicilin 6 µg, amoksicilin/klavulonska kiselina (20 + 10 µg), kloksacilin 25 µg, amoksicilin 30 µg, cefaleksin 30 µg, ceftiofur 30 µg, linkomicin 15 µg, gentamicin 30 µg i tetraciklin 30 µg.

Ispitivanjem osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih u slučajevima intramamarnih infekcija krava, in vitro ustanovljen je visok stepen osetljivosti prema penicilinaza rezistentnim preparatima

* Rad primljen za štampu 06. 01. 2010. godine

** Nataša Rajić Savić, dr vet. med., PKB Korporacija, Dijagnostička laboratorija, Padinska Skela; dr sci. med. vet. Vera Katić, redovni profesor, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

(amoksisicilin-sublaktam, kloksacilin), cefalosporinima prve i treće generacije i linkomicinu.

Najveći stepen rezistencije na penicilin (70,4%) utvrđen je na farmi sa umerenom prevalencom intramamarnih infekcija ustanovljen, zatim na farmi sa najvišom prevalencom intramamarnih infekcija 60,2%, a najmanji na farmi sa kontrolisanim nivoom infekcije rezistencija iznosila 43,7%.

Ključne reči: koagulaza pozitivne stafilokoke, mastitsi, osetljivost, antibakterijski lekovi

Uvod / Introduction

Koagulaza pozitivne stafilokoke, a posebno *Staphylococcus aureus*, su najčešći uzročnici zapaljenja vimena, ali se mogu izolovati i tokom redovnog bakteriološkog pregleda mleka u slučajevima latentnih infekcija (Tenhagen i sar., 2006; Getahun i sar., 2008; Vintov i sar., 2003; Nickerson, 2009; Kalsoom Farzana i sar., 2004). Stafilokoke su ubikvitarni mikroorganizmi i često se mogu naći na koži zdravih životinja, ruku radnika i u okolini životinja (Tenhagen i sar., 2006). Pri nepovoljnim uslovima sredine i smanjenog imuniteta životinje, stafilokoke prodiru u vime izazivajući zapaljenje, što dovodi do značajnih gubitaka u proizvodnji mleka. Oko 70% ekonomskih gubitaka je upravo izazvan mastitsima (Sumathi i sar., 2008).

Na pojavu infekcije utiče više faktora: virulencija uzročnika, stepen i dužina infekcije, broj inficiranih četvrti, latentno inficirane životinje, način tretmana i sposobnosti leka da prođe do fagocitovanih stafilokoka (Sanchez i sar., 1988).

Usled infekcije dolazi do pojave gnoja u mleku iz inficirane četvrti i porasta broja somatskih ćelija u zbirnom mleku. Broj somatskih ćelija veći od 300 000/ml ukazuje na postojanje subkliničkih mastitsa u zapatu (Pitkälä i sar., 2004; Nickerson, 2009). Prevalenca mastitsa u mlečnim zaptima je smanjena tokom poslednje dekade, ali se i dalje u nekim zemljama održava na visokom nivou – od 30 do 50%. Sa druge strane, primećeno je povećanje broja bakteriološki pozitivnih četvrti (Pitkälä i sar., 2004; Sumathi i sar., 2008).

Veliki broj autora navodi da je rezistencija stafilokoka prema antimikrobnim sredstvima u porastu, pre svega na penicilin i ampicilin kao posledica sve više sojeva koji luče beta laktamazu, kao i na eritromicin i novobiocin (National mastitis council, 2004). Nivo rezistencije nije svuda isti i razlike postoje u odnosu na zemlje, regione, ali se navodi da postoje razlike u osetljivosti u okviru samih zapata (Pitkala i sar., 2004; Hendriksen i sar., 2008). Rezistencija stafilokoka na antibiotike je češća kod izolata sa farmi sa većim brojem intramamarnih infekcija (Sumathi i sar., 2008).

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

Neselektivna primena antibiotika i njihovo prisustvo u sredini gde bo-rave životinje je dovelo do selekcionisanja rezistentnih sojeva (Vintov i sar., 2003). Primena preprata bez prethodno izolovanog uzročnika i ispitivanja njegove osetljivosti dovodi do zalečenja infekcije i pojave hroničnih infekcija (Owens i sar., 1997).

Penicilin je antibiotik koji se najduže primenjuje u terapiji mastitisa. Osnovni mehanizam rezistencije stafilokoka je baziran na sintezi i lučenju enzima beta laktamaze koja hidrolizuje labilne beta laktamske preparate (penicilin G i ampicilin) i sprečava njihovo vezivanje za ćelijski zid. Penicilinaza stabilni beta laktamski lekovi (kloksacilin, meticilin, oksacilin, amoksicilin+sulbaktam i cefalosporini) najčešće su otporni na delovanje slobodne beta laktamaze, ali neka istraživanja govore da se i kod tih lekova beleži porast rezistencije (Moroni i sar., 2006; Calvinho i sar., 2002; Shin Kim i sar., 2000; Bruns and Keppler, 1987; Gentilini i sar., 2000; Roesch i sar. 2006; Güler i sar., 2005).

Pored beta laktamskih antibiotika, u terapiji mastitsa se koriste i aminoglikozidi, makrolidi, linkozamini, tetraciklini, sulfonamidski i drugi lekovi. Efikasnost tih antimikrobnih lekova je različita, ali oni predstavljaju lek izbora u terapiji hiperprodukujućih beta laktamaza sojeva (National Mastitis Council, 2004).

Pravilna i pravovremena terapija na početku infekcije dovodi do izlečenja velikog broja životinja i ključna je za suzbijanje mastitsa (Barkema i sar., 2006). Ona podrazumeva primenu preparata koji ispoljava efikasno delovanje na uzročnik u uslovima *in vitro*, jer postoji pozitivna korelacija između rezultata antibiograma i efikasnosti terapije naročito kod svežih infekcija (Owens i sar., 1997; Apparao i sar., 2009). Agar difuziona metoda je rutinska kvalitativna metoda koja se izvodi u cilju odabira najboljeg preparata za terapiju za svaki uzročnik.

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita osetljivost na odabrane antimikrobne lekove koagulaza pozitivnih stafilokoka koje su izolovane iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava u slučaju intramamarnih infekcija sa tri farme sa različitim pojavljivanjem mastitsa.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Uzorci mleka / Samples of milk

Za bakteriološki pregled na uzročnike mastitisa uzorci mleka su uzeti pod aseptičnim uslovima iz pojedinačnih četvrti vimena od 2381 krave (9524 četvrti).

Izolovanje i identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka / Isolation and identification of coagulase positive staphylococci

Za izolovanje koagulaza pozitivnih stafilokoka uzorci mleka su zasejavani u količini od 0,01 ml na krvni agar, koji je potom inkubiran 24 do 48 časova pri temperaturi od 37°C. Po završenoj inkubaciji, tipične pigmentirane kolonije,

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

okružene zonom α , β ili $\alpha + \beta$ hemolize su presejane na hranljivi agar, koji je zatim inkubiran 24 časa pri temperaturi od 37°C. Sa izraslim kolonijama na hranljivom agaru vršeno je ispitivanje prisustva enzima katalaze katalaza testom i koagulaza testom sa razblaženom plazmom kunića.

Ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilocoka na antimikrobna sredstva / Investigation of susceptibility of coagulase positive staphylococci to antimicrobials

Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka je ispitivana na antimikrobne lekove disk difuzionom metodom po Kirbi Baueru (Kirby-Baur).

Na površinu Muiler Hinton agara nanošena je suspenzija ispitivanog koagulaza pozitivnog stafilocoka, nakon prosušivanja podloga posle zasejavanja, postavljani su antibiogram diskovi koncentracija: penicilin 6 µg, amoksisicilin/klavulonska kiselina (20+10 µg), kloksacilin 25 µg, amoksisicilin 30 µg, cefaleksin 30 µg, ceftiofur 30 µg, linkomicin 15 µg, gentamicin 30 µg i tetraciklin 30 µg. Zasejane podloge su inkubirane 24 časa pri temperaturi 37°C. Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka na antimikrobne lekove je procenjivana na osnovu prečnika zone inhibicije rasta i označavane kao osetljive (S), intermedijerno osetljive (I) i otporne (R).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Rezultati ispitivanja uzoraka mleka krava na prisustvo koagulaza pozitivnih stafilocoka prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena krava na prisustvo koagulaza pozitivnih stafilocoka

Table 1. Results of investigations of quarter milk samples for the presence of coagulase-positive staphylococci

Farma / Farm	Broj ispitanih uzoraka mleka / Number of milk samples	Izolovane koagulaza pozitivne stafilocoke / <i>Isolated coagulase positive staphylococci</i>	
		n	%
I	4695	393	8,37
II	2443	423	17,31
III	2116	36	1,7

Rezultati ispitivanja prisustva intramamarnih infekcija koagulaza pozitivnim stafilocokama pokazuju da je najveće prisustvo utvrđeno na farmi II (17,31%), umereno na farmi I (8,37%) i nisko na farmi III (1,7%). Najmanje prisustvo intramamarnih infekcija koagulaza pozitivnim stafilocokama je utvrđeno na farmi III gde je najniža pojava intramamarnih infekcija.

Rezultati ispitivanja osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilocoka na pojedine antimikrobne lekove prikazani su u tabeli 2.

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

Tabela 2. Rezultati ispitivanja osetljivosti na antimikrobna sredstva koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava

Table 2. Results of investigations of susceptibility coagulase positive staphylococci isolated fom quarter milk samples to antimicrobials

Antimikrobno sredstvo/ <i>Antimicrobials</i>	Farma I / <i>Farm I</i>				Farma II / <i>Farm II</i>				Farma III / <i>Farm III</i>			
	n	S (%)	I (%)	R (%)	n	S (%)	I (%)	R (%)	n	S (%)	I (%)	R (%)
Penicilin / <i>Penicillin</i>	233	21,4	8,15	70,4	367	31,9	7,35	60,2	32	50	6,25	43,7
Amoksisicilin sulbaktam / <i>Amoxicillin</i>	252	100	–	–	405	92,8	–	7,2	34	100	–	–
Kloksacilin / <i>Cloxacillin</i>	258	100	–	–	1769	84,7	–	15,3	34	100	–	–
Cefaleksin / <i>Cefalexin</i>	53	90,6	3,8	5,5	73	97,3	–	2,7	4	100	–	–
Ceftiofur / <i>Ceftiofur</i>	16	100	–	–	62	100	–	–	11	100	–	–
Gentamicin / <i>Gentamycin</i>	107	45,8	38,3	15,9	129	48	31,8	20,1	18	55,6	22,2	22,2
Tetraciklini / <i>Tetracycline</i>	33	69,7	27,8	3	65	87,7	7,7	4,6	11	54,5	36,4	9
Linkomicin / <i>Linkomycin</i>	23	73,9	–	26	37	67,6	–	32,4	8	75	–	25

Rezultati ispitivanja su pokazali da su izolovani sojevi stafilocoke otporni na penicilin na sve tri farme, pri čemu je na farmi sa umerenim prisustvom intramamarnih infekcija ustanovljen najveći stepen rezistencije od 70,4%. Visok procenat rezistencije na penicilin je zabeležen na farmi sa najvišim prisustvom intramamarnih infekcija 60,2%, dok je na farmi sa kontrolisanim nivoom infekcije rezistencija iznosila 43,7%. Slični rezultati dobijeni su i u nekim ranijim ispitivanjima (Moroni i sar., 2006; Shin Kim i sar., 2000; Calvinho i sar., 2002; Pitkala i sar., 2004; Hendriksen i sar., 2008; Nunes i sar., 2007; Ombui i sar., 2000; Younis i sar., 2000).

Grinberg i sar. (2005) su utvrdili rezistenciju na penicilin kod 38% ispitanih izolata, dok su manji stepen rezistencije utvrdili Gentilini i sar. (2000) kod 11,6% izolata, Anderson i sar. (2006) kod 10,36% izolata, Bengtsson i sar. (2009) kod 7,1% izolata. Visoku osetljivost izolovanih stafilocoka na penicilin autori objašnjavaju racionalnom upotrebom penicilinskih lekova.

Zastupljenost intermedijarno osetljivih izolata na penicilin je bila slična na sve tri farme i iznosila je 8,15%; 7,35% i 6,25%, što je manji procenat od nalaza

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

intermedijarno osetljivih sojeva utvrđenih u ispitivanjima Shitandi i sar. (2004) (17,1%) i Kalsoom Farzana i sar. (2004) (16,88%).

Najveći procenat (50%) izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka osetljivih na penicilin je utvrđen među izolatima sa farme na kojoj je kontrolisan nivo intramamarnih infekcija. Manji procenat (31,9%) izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka osetljivih na penicilin je utvrđen među izolatima sa farme na kojoj je visoko prisustvo intamamarnih infekcija, a najmanji procenat (21,4%) osetljivih izolata je utvrđen među izolatima sa farme na kojoj je umereno prisustvo intramamarnih infekcija.

Rezultati ispitivanja osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilocoka na amoksicilin sa klavulonskom kiselinom pokazuju da su svi izolati stafilocoka koji su poticali sa farmi na kojima je utvrđeno umereno i nisko prisustvo koagulaza pozitivnih stafilocoka bili osetljivi, dok je manji procenat osetljivih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka (92,8%) utvrđen na farmi II sa najvišim prisustvom infekcije, a 7,2% izolata je bilo rezistentno. Slične rezultate su dobili i Gentilini i sar. (2000), Moroni i sar. (2006), Güler i sar. (2005). Međutim, Kalsoom Farzana i sar. (2004) navode da produžena upotreba penicilinskih preparata dovodi do pojave sojeva koji su otporni i na penicilinaza stabilne antibiotike. Prema njihovim rezultatima samo 76,62% izolata je osetljivo na amoksicilin i klavulansku kiselinu.

Slični rezultati osetljivosti su dobijeni ispitivanjem koagulaza pozitivnih stafilocoka na kloksacilin. Svi izolati koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovani iz uzoraka mleka uzeti iz pojedinih četvrti vimena krava sa farme I i farme III su bili osetljivi na kloksacilin. Međutim, samo 84,7% izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka sa farme II je bilo osetljivo na kloksacilin. Mišljenja o osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilocoka na kloksacilin su različita. Moroni i sar. (2006) navode visoku efikasnost kloksacilina na stafilocoke, a nasuprot njima Kalsoom Farzana i sar. (2004) su utvrdili da je samo 36,36% izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka osetljivo na kloksacilin.

Ispitivanjem osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilocoka na cefalosporinske antibakterijske lekove ustanovljene su razlike u osetljivosti u zavisnosti od generacije cefalosporina. Svi ispitivani izolati pozitivnih stafilocoka su bili osetljivi na cefalosporine treće generacije (ceftiofur), dok je osetljivost na cefalosporine prve generacije (cefaleksin) iznosila 90,6%, 97,3% i 100%. Intermedijarno osetljivi sojevi su utvrđeni samo na farmi I (3,8%), a rezistentni sojevi su utvrđeni na farmama I (5,5%) i II (2,7%). Za razliku od rezultata dobijenih u našim istraživanjima Sumathi i sar. (2000) su utvrdili efikasnost cefaleksina *in vitro* kod samo 47% ispitivanih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka.

Calvinho i sar. (2002) su ustanovili 82,2% osetljivih i 17,8% umereno osetljivih izolata na cefacetil. Nunes i sar. (2007) navode da su svi izolati stafilocoka bili osetljivi na cefazolin, a Pitkala i sar. (2004) i Gentilini i sar. (2000) nisu utvrdili rezistentne sojeve na cefalotin.

Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka na gentamicin pokazuju da je najveća osetljivost utvrđena kod izolata sa farme III

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

(55,6 %), zatim sa farme II (48%), a najmanje su bili osetljivi na gentamicin izolati sa farme I (45,8%). Umereno osetljivih sojeva je bilo 38,3%; 31,8% i 22,2%, a rezistentnih 15,9%; 20,1% i 22,2%. Ove naše rezultate potvrđuju i nalazi Shin Kim i sar. (2000) koji su utvrdili rezistenciju na gentamicin kod 19% izolata. Manju zastupljenost od 10% rezistentnih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka na gentamicin utvrdili su Sumathi i sar. (2008), Gentilini i sar. (2000) kod 3,4% izolata, Russi i sar. (2008) kod 2,1% izolata, dok Nunes i sar. (2007) i Pitkala i sar. (2004) nisu utvrdili nijedan izolat koagulaza pozitivnih stafilocoka rezistentan na gentamicin.

Ispitivanjem osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilocoka na tetracikline, osetljivost na tetracikline utvrđena je kod 69,7% izolata sa farme I, 87,7% izolata sa farme II i 54,5% izolata sa farme III. Umereno osetljivih na tetracikline bilo je 27,8% izolata sa farme I, 7,7% izolata sa farme II i 36,4% sa farme III. Najmanje rezistentnih izolata na farmi I bilo je 3%, zatim 4,6% na farmi II i 9% na farmi III. Naši rezultati potvrđuju se nalazima Kalsoom Farzana i sar. (2004) koji su utvrdili 70,13% osetljivih sojeva na tetraciklin i nalazima Rabello i sar. (2005) koji su utvrdili rezistenciju kod 7,4% izolata, Shin Kim i saradnici (2000) koji su utvrdili rezistenciju kod 6% izolata i Anderson i sar. (2006) koji su utvrdili rezistenciju na tetraciklin kod samo 0,56% izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka. Suprotno navedenim rezultatima i rezultatima naših istraživanja više autora je utvrdilo veći procenat izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka rezistentnih na tetracikline (Younisi sar., 2000; Güler i sar., 2005; Sumathi i sar., 2008).

Ispitivanjem osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilocoka na linkomicin utvrđeno je 73,9% izolata sa farme I, 67,6% izolata sa farme II i 75% izolata sa farme III osetljivih na linkomicin. Procenat rezistentnih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka na linkomicin bio je najveći (32,4%) među izolatima sa farme II, a sličan procenat rezistentnih izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka je utvrđen među izolatima sa farme I (26% izolata) i farme III (25% izolata). Veći procenat rezistentnih sojeva na linkomicin od 73,3% utvrdili su Ombui i sar. (2000) i Kalsoom Farzana i sar. (2004) (57,17% izolata).

Multirezistentni sojevi koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovani su iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava na sve tri farme. Najveći procenat multirezistentnih sojeva (10,4%) utvrđen je među izolatima iz uzoraka mleka uzetih iz pojedinih četvrti vimena krava sa farme gde je utvrđena najveća pojava koagulaza pozitivnih stafilocoka, zatim 3,56% izolata sa farmi sa umerenom pojavom, a najmanji procenat (2,77%) multirezistentnih sojeva je utvrđen među izolatima sa farmi sa najmanjom pojavom koagulaza pozitivnih stafilocoka.

Shitandi i Sternesjo (2004) su utvrdili da je 34,3% izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka sa malih farmi i 18,0% izolata koagulaza pozitivnih stafilocoka sa velikih farmi rezistentno na penicilin G, tetraciklin, eritromicin, trimetoprim/sulfametazin i hloramfenikol. Ovu razliku u prisustvu multirezistentnih sojeva objašnjavaju boljom veterinarskom praksom i sistemom dokumentacije u vezi za zdravstvenom zaštitom životinja na velikim farmama. Pitkala i sar. (2004) su ustanovili 2,0% izolata *Staph. aureus* koji su bili rezistentni na tri ili više antibiotika.

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

Shitandi i Milcah Mwangi (2004) su utvrdili višestruku otpornost na penicilin i još dva ne beta laktamska antibiotika kod 76,9% izolata, a kod 13,4% izolata otpornost na četiri antimikrobna leka. Suprotno ovim rezultatima, Russi i sar. (2008) navode da je pojava multirezistentnih sojeva koagulaza pozitivnih stafilokoka veoma retka.

Zaključak / Conclusion

Ispitivanjem osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka, izolovanih u slučajevima intramamarnih infekcija krava, ustanovljen je visok stepen osetljivosti *in vitro* na penicilinaza rezistentne preparate (amoksicilin-sublaktam, kloksacilin), cefalosporine prve i treće generacije i linkomicin, a umerena osetljivost na preparate na bazi tetraciklina i gentamicina.

Najveći procenat rezistentnih sojeva koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava na sve tri farme utvrđen je na penicilin. Najveći stepen rezistencije na penicilin od 70,4% utvrđen je na farmi sa umerenom pojavom intramamarnih infekcija, zatim na farmi sa najvišom pojavom intramamarnih infekcija od 60,2%, a najmanji na farmi sa kontrolisanim nivoom infekcije od 43,7%.

Literatura / References

1. Anderson KL, Lyman RL, Bodeis-Jones SM, White DG. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles among mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples. Am J Vet Res. 2006; 67(7): 1185-91.
2. Apparao MD, Ruegg P.L, Lago A, Godden S, Bey R, Leslie K. Relationship between *in vitro* susceptibility test results and treatment outcomes for gram-positive mastitis pathogens following treatment with cephapirin sodium. J Dairy Sci 2009; 92: 2589-97.
3. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The role of cow, pathogen and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci 2006; 89(6): 1877-95.
4. Bengtsson B, Unnerstad HE, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Ost M, Waller KP. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. Vet Microbiol 2009; 136(1-2): 142-9.
5. Bruns W, Koppel H. Extracellular and membrane-bound β lactamase of *Staphylococcus aureus*: their importance for the expression of penicillin resistance. J Med Microbiol 1987; 23: 133-9.
6. Calvinho LF, Toselli FG, Weimann WR, Canavesio VR, Neder VE, Iguzquiza IA. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive *staphylococci* isolated from bovine mastitis in the central dairy catchment area of Argentina. Rev Argent Microbiol 2002; 34(3): 171-5.
7. Coelho MOS, Reinoso E, Pereira IA, Soares LC, Demo M, Bogni C, Souza MSM. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. Vet Bras 2009; 29(5): 369-74.

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

8. Gentilini E, Denamiel G, Llorente P, Godaly S, Rebuelto M, DeGregorio O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. J Dairy Sci. 2000; 83(6): 1224-7.
9. Getahun K, Kelay B, Bekana M, Lobago F. Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia. Trop Anim Health Prod 2008; 40(4): 261-8.
10. Grinberg A, Lopez-Villalobos N, Lawrence K, Nulsen M. Prediction of penicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows with mastitis, based on prior test results. NZ Vet J 2005; 53(5): 332-5.
11. Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. J Dairy Sci 2009; 88: 3149-54.
12. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Meunier D, Butaye P, Franco A, Utinane A, Amado A, Moreno M, Greko C, StFrk K, Berghold C, Myllyniemi AL, Wasyl D, Sunde M, Aarestrup FM. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. Acta Vet Scand 2008; 50: 28.
13. Kalsoom Farzana, Syed Nisar Hussain Shah, Farzana Jabeen. Antibiotic resistance pattern against various isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. J Res (Sci) 2004; 15(2): 145-51.
14. Li JP, Zhou HJ, Yuan L, He T, Hu SH. Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China. J Zhejiang Univ Sci B 2002; 10(10): 753-60.
15. Moroni P, Pisano G, Antonini M, Villa R, Boettcher P, Carli S. Short communication: antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. J Dairy Sci 2006; 89(8): 2973-6.
16. Moroni P, Pitkala A, Haveri M, Pyöralä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001-prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J Dairy Sci 2004; 87(8): 2433-41.
17. National mastitis council research committee report bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. NMC Annual Meeting Proceedings 2004; 400-14.
18. Nickerson SC. Control of heifer mastitis: antimicrobial treatment-an overview. Vet Microbiol 2009; 134(1-2): 128-35.
19. Nunes SF, Bexiga R, Cavaco LM, Vilela CL. Technical Note: Antimicrobial susceptibility of portuguese solates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. J Dairy Sci 2007; 90: 3242-6.
20. Ombui JN, Kimotho AM, Nduhiu JG. Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and meat. East African Medical Journal 2000; 77(9).
21. Owens WE, Ray CH, Watts JL, Yancey RJ. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. J Dairy Sci 1997; 80(2): 313-7.
22. Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. J Dairy Sci 2004; 87: 2433-41.
23. Pisoni G, Antonini M, Villa R, Boettcher P, Carli S. Short communication: antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. J Dairy Sci 2006; 89: 2973-6.

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilokoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

24. Rabello RF, Souza CR, Duarte RS, Lopes RM, Teixeira LM, Castro AC. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. J Dairy Sci 2005; 88(9): 3211-9.
25. Roesch M, Perreten V, Doherr MG, Schaeren W, Schallibaum M, Blum JW. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms J Dairy Sci. 2006; 89(3): 989-97.
26. Russi NB, Bantar C, Calvinho LF. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. Revista Argentina de Microbiología 2008; 40: 116-9.
27. Sanchez MS, Ford CW, Yancey RJ Jr. Evaluation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus aureus* surviving within the bovine mammary gland macrophage. J Antimicrob Chemother 1988; 21: 773-86.
28. Shin Kim, Yu-M Oh, Sang-Ryun Kim, Young-Ku Woo, Heon-IL Gwon. Study on antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk and several animals in kyongbuk northern province and detection of MRSA from the isolates of *S. aureus*. Korean J Vet Seru 2000; 23(2): 153-63.
29. Shitandi A, Mwangi M. Occurrence of multiple antimicrobial resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from kenyan milk. J Food Technol in Africa 2004; 9(1): 23-5.
30. Shitandi A, Sternesjo A. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large - and small-scale producers in Kenya. J Dairy Sci 2004; 87(12): 4145-9.
31. Sumathi BR, Veeregowda BM, Gomes AR. Prevalence and antibiogram profile of bacterial Isolates from clinical bovine mastitis. Veterinary World 2008; 1(8) 237-8.
32. Tenhagen B-A, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J Dairy Sci 2006; 89: 2542-51.
33. Vintov J, Aarestrup FM, Zinn CE, Olsen JE. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. Vet Microbiol 2003; 95(1-2): 133-47.
34. Younis G, Leitner, Heller DE, Samra Z, Gadba R, Lubashevsky G, Chaffer M, Yadlin N, Winkler M, Saran A. Phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Israeli dairy herds. J Vet Med Series B 2008; 47(8), 591-7.

ENGLISH

SUSCEPTIBILITY OF COAGULASE POZITIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM COW'S MAMMARY GLAND TO ANTIBACTERIAL DRUGS

Nataša Rajić Savić, Vera Katić

Coagulase positive staphylococci are one of the most common causes of chronic udder infection. Indiscriminate use of antimicrobial drugs and their presence in the environment where animals live has led to coagulase positive staphylococci strains resistant to antimicrobial means. Proper and timely treatment of subclinical mastitis, based on the most effective use of antimicrobial drugs, is the key to good health of the milk herd. The aim was to determine the antimicrobial efficacy of selected assets in relation to coagulase

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

positive staphylococci isolated from samples of milk taken from individual udder quarters of cows in cases of udder infection from three farms with different mastitis prevalence.

From a total of 9245 samples of milk taken from individual udder quarters of cows from three farms, 852 strains isolated were coagulase positive staphylococci. Coagulase positive staphylococci were isolated on blood agar and identified on the basis of macromorphological characteristics and the coagulase and catalase test. The sensitivity of the coagulase positive staphylococci was tested by the Kirby Bauer agar diffusion method with the following antimicrobials: penicillin 6 µg, amoxicillin / sulbactam (20 + 10 µg), cloxacillin 25 µg, cefalexin 30 µg, ceftiofur 30 µg, linkomycin 15 µg, 30 µg gentamycin and tetracycline 30 µg.

Sensitivity testing of coagulase positive staphylococci, isolated in cases of intramammary cow infections, established a high degree of sensitivity *in vitro* towards penicillinase resistant drugs (amoxicillin-sulbactam, cloxacillin), cephalosporins of the first and third generations and linkomycin.

The highest levels of resistance to penicillin (70.4%) were found on a farm with a moderate prevalence of udder infection, then on the farm with the highest prevalence of intramammary infections (60.2%) and the lowest on the farm with controlled levels of resistance of infection (43.7%).

Key words: coagulase positive staphylococci, mastitis, sensitivity, antibacterial drugs

РУССКИЙ

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КОАГУЛЯЗОВ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ СТАФИЛОКОККОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОРОВ НА ОТОБРАННЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ СРЕДСТВА

Наташа Раич Савич, Вера Катич

Коагулаз положительной стафилококки один из самых частых возбудителей хронических маститов. Неселективное применение антимикробных средств и их присутствие в среде, где обитают животные довело до селектирования резистентных штаммов коагулязов положительных стафилококков на антимикробные средства. Правильная и своевременная терапия подклинических маститов, обоснованная на применении самого эффективного антимикробного лекарства, ключевая для хорошего состояния здоровья племенного приплода.

Цель этого исследования была испытать чувствительность на отобранные антимикробные средства коагулязов положительных стафилококков, изолированные из образчиков молока, взятых из некоторых четвертей вымени коров в случае внутрисосковых инфекций с трёх ферм с различным преимуществом маститов.

Из совокупно 9245 образчиков молока, взятых из некоторых четвертей вымени коров с трёх ферм, изолирована 852 штамма коагулязов положительных стафилококков. Коагулаз положительного стафилококка изолирован на кровяном агаре и идентифицирован на основе макроморфологических особенностей и коагулаза теста. Агар диффузионным Методом по Кирбе Бауре испытана чувствительность коагулязов положительных стафилококков к следующим антимикробным средствам: пенициллин 6 µг, амоксицилин (клавулонная кислота (20+10 µг), клоткса-

Vet. glasnik 63 (5-6) 299 - 310 (2009) Nataša Rajić Savić i Vera Katić: Osetljivost koagulaza pozitivnih stafilocoka izolovanih iz mlečne žlezde krava na odabrane ...

цилин 25 µг, амоксицилин 30 µг, цефалексин 30 µг, цефтиофур 30 µг, линкомицин 15 µг, гентамицин 30 µг и тетрациклин 30 µг.

Испытанием чувствительности коагулязов положительных стафилококков, изолированных в случаях внутрисосковых инфекций коров, *in vitro* установлена высокая степень чувствительности к пенициллиназам резистентным препаратам (амоксицилин-сулбактам, флоксацилин), цефалоспорином первого и третьего поколения и линкомицину.

Самая большая степень резистенции к пенициллину (70,4%) установлена на ферме с умеренным преобладанием внутрисосковых инфекций установлена, затем на ферме с наивысшим преобладанием внутрисосковых инфекций 60,2%, а наименьшая на ферме с контролируемым уровнем инфекции резистентность составляла 43,7%.

Ключевые слова: коагулаз положительного стафилококка, маститы, чувствительность, антимикробные средства

**ISPITIVANJE PRISUSTVA NOVIH OBLIKA REZISTENCIJE
NA NEKE ANTIBIOTIKE KOD SOJEVA *E. COLI*
IZOLOVANIH OD PRASADI***

***THE INVESTIGATION OF NEW FORMS OF RESISTANCE TO SOME
ANTIBIOTICS IN *E. coli* STRAINS ISOLATED FROM PIGLETS***

**Ružica Ašanin, M. Žutić, Jelena Ašanin, D. Mišić, Jadranka Žutić,
Dobriša Jakić-Dimić, N. Milić, J. Nišavić****

Rezistencija bakterija predstavlja značajan problem svuda u svetu, pa i kod nas. Širenju rezistencije doprinela je nekritička upotreba antibakterijskih lekova u humanoj i veterinarskoj medicini. Zbog aktuelnosti problema veliki broj država finansira projekte čiji je cilj praćenje i nadzor nad rezistencijom bakterija.

*Cilj ovog istraživanja je bio izolacija i identifikacija patogenih sojeva *E. coli* kod prasadi sa klinički manifestnom dijarejom i ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva na određeni broj odabranih antibiotika. Materijal za ovo ispitivanje predstavljali su delovi creva (jejunum, ileum) uginule prasadi, rektalni brisevi i feces obolele prasadi uzorkovani na farmama svinja iz okoline Beograda. Za izolaciju su korišćene klasične metode mikrobiološke dijagnostike, a za identifikaciju klasični i komercijalni testovi API 20E (bioMérieux, Francuska). Nakon biohemijske identifikacije pomoću hiperimunih seruma za određene grupne (O) antigene (O8, O138, O139, O147, O149 i O157) vršena je serološka tipizacija sojeva. Za utvrđivanje prisustva i identifikaciju fimbrijalnih antigena – adhezina primenom reakcije aglutinacije na pločici su korišćeni komercijalni antiserumi: K88 (F4), K99 (F5) i 987P (F6), Toxigenic *E. coli* pili antisera, Denka Seiken Co. Ltd. Tokyo, Japan. Osetljivost na antibiotike izolovanih sojeva *E. coli* ispitivana je prime-*

* Rad primljen za štampu 25. 12. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Ružica Ašanin, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; dr sci. med. vet. Milenko Žutić, naučni saradnik, dr sci. med. Jelena Ašanin, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr sci. med. vet. Dušan Mišić, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; mr sci. med. vet. Jadranka Žutić, istraživač saradnik, dr sci. med. vet. Dobriša Jakić-Dimić, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr sci. med. vet. Nenad Milić, redovni profesor, dr sci. med. vet. Jakov Nišavić, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Vet. glasnik 63 (5-6) 311 - 320 (2009) Ružica Ašanin i sar.: Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

nom disk difuzione metode po Kirby Baueru i mikrodilucione metode u bujonu prema preporukama CLSI (2008). Ispitivanje mikrodilucionom metodom u bujonu je vršeno sa čistim aktivnim supstancama antibiotika: ampicilina, apramicina, gentamicina, kanamicina, tetraciklina, ceftriaksona i ciprofloksacina (Sigma, SAD).

Ukupno je izolovano 400 sojeva *E. coli*, od kojih je 48 svrstano u kategoriju patogenih sojeva. Od navedenog broja patogenih sojeva *E. coli* kod 32 (66,67%) je ustanovljena multirezistencija na 3 i više od 3 antibiotika, a kod 16 sojeva (33,33%) rezistencija na 2 ili 1 ispitivani antibiotik. Rezistencija na tetraciklin i ampicilin ustanovljena je kod 89,58% izolovanih sojeva *E. coli*, a na ciprofloksacin kod 37,5% sojeva. Najniži procenat rezistencije na ceftriakson ustanovljen je kod 4,17% sojeva *E. coli*. Prisustvo rezistencije kod izolovanih sojeva *E. coli* ustanovljeno je i na neke aminoglikozidne antibiotike. Tako je rezistencija ustanovljena kod 18,75% sojeva kod kojih su vrednosti MIC-a bile veće od 128 µg/mL. Kod 52,08% sojeva *E. coli* otkrivena je rezistencija na kanamicin, a od navedenog procenta kod 96,00% sojeva vrednosti MIC-a kanamicina iznosile su preko 256 µg/mL. Takođe je kod 33,33% sojeva *E. coli* ustanovljena rezistencija i na treći aminoglikozidni antibiotik, gentamicin. Svi sojevi *E. coli* koji su uzrokovali dijareju kod prasadi bili su rezistentni na najmanje dva antibiotika, a kod preko 50% sojeva otkriveno je prisustvo rezistencije na više od 3 antibiotika. Značajno je naglasiti da su svi izolovani sojevi *E. coli* obuhvaćeni ispitivanjem bili osetljivi samo na amikacin.

Ključne reči: svinje, E. coli, antibiotici, rezistencija

Uvod / Introduction

Intenzivni razvoj svinjarstva kao značajnije grane stočarske proizvodnje praćen je brojnim problemima. Najčešći zdravstveni problemi koji zahvataju sve kategorije svinja u farmskom uzgoju jesu respiratorni sindrom i gastrointestinalna oboljenja. Kada su u pitanju gastrointestinalna oboljenja prasadi od bakterijskih uzročnika najčešće se pominju različiti sojevi *E. coli*. Ovaj mikroorganizam normalno se nalazi u zadnjim partijama creva ljudi i životinja i tu dominira u odnosu na sve druge vrste bakterija koje čine takozvani "crevni mikrobiom". Međutim, pored poželjnih postoje i patogeni sojevi *E. coli* koji mogu pripadati enterotoksigenim (enterotoksičnim), enteroinvazivnim, enteropatogenim, verotoksičnim (enterohemoragičnim) i nekrotoksičnim grupama. Enterotoksični sojevi *E. coli* (ETEC) izazivaju vodenasti proliv kod novorođene prasadi i odlučene prasadi odmah posle odbijanja od sise. Patogeni sojevi ETEC, osim dijareje u neonatalnom periodu (kolibaciloze), mogu da izazovu i koliseptikemiju, meningitis prasadi, kao i edemsku bolest (Fairbrother i Gyles, 2006). Pošto se može lako

Vet. glasnik 63 (5-6) 311 - 320 (2009) Ružica Ašanin i sar.: Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

izolovati i identifikovati, *E. coli* je najviše korišćen mikroorganizam u laboratorijskim i eksperimentalnim ispitivanjima (biohemijskim, molekularnim, genetskim i drugim).

Poznato je da životinje predstavljaju važan potencijalni izvor multirezistentnih sojeva bakterija, tačnije gena rezistencije bakterija na antibiotike. Geni se mogu preneti direktnim kontaktom ili indirektno, preko predmeta, kao i namirnicama animalnog porekla, na bakterije koje normalno nastanjuju organizam ljudi. Značaj životinja kao rezervoara multirezistentnih sojeva bakterija je utooliko veći ukoliko se radi o patogenim bakterijama uzročnicima zoonoza. Geni rezistencije smešteni na hromozomima bakterija prenose se tokom proste deobe, što ima manji značaj. Veću opasnost predstavlja širenje gena rezistencije na antibiotike između bakterija pomoću takozvanih mobilnih genetičkih elemenata, plazmida, transpozona, integrona i insercionih sekvenci. Ovakav način širenja gena rezistencije odigrava se u prirodi između bakterija različitih taksonomskih vrsta svakog trenutka u svim uslovima sredine i na svim mestima (zemljište, voda, vazduh). Širenje gena rezistencije je nepredvidiva pojava koju nije moguće kontrolisati, meriti i izračunavati (Smith i Lewin, 1993).

Zbog sve učestalije pojave ozbiljnih infekcija kod ljudi izazvanih multirezistentnim sojevima bakterija koje se ne mogu lečiti antibioticima i koje se u najvećem broju slučajeva završavaju fatalnim ishodom, sve razvijene zemlje sveta uvele su zakonski obavezan monitoring upotrebe i kontrolu primene antibiotika (Ašanin i sar., 2005).

Sa druge strane, dokazano je da su geni rezistencije (R-geni) bili prisutni kod bakterija i pre uvođenja antibiotika u kliničku upotrebu i to zahvaljujući njihovom otkriću u sojevima *E. coli* izolovanim iz naslaga arktičkog leda starog 2000 godina (Alonso i sar., 2001; Hariharan i sar., 2004). Zbog toga se smatra da je rezistencija na antibiotike pojava stara nekoliko stotina miliona godina, odnosno isto onoliko koliko su stari i mikroorganizmi. Ovo otkriće nije bilo neobično s obzirom na to da antibiotike prirodno proizvode same bakterije i jasno je da u tom slučaju moraju biti rezistentne na antibiotik koji produkuju, kako ne bi bile ubijene sopstvenim proizvodom.

Suprotno od toga, mikroorganizmi koji nisu imali sposobnost proizvodnje antibiotika, a bili su izloženi delovanju antibiotika iz okruženja morali su se adaptirati i razviti mehanizme rezistencije kako bi preživeli. Sposobnost prilagođavanja i preživljavanja u neprijateljskom okruženju, osetljive bakterije sticale su putem mutacija i genetičkog transfera, odnosno prenošenjem, kako mutiranih gena, tako i gena koji kodiraju samozaštitu. Slično tome, u poslednjih 60 godina, koliko traje antibiotska era, patogene bakterije razvile su "klinički značajnu rezistenciju" na antibiotike koji se koriste u terapiji oboljenja poznate bakterijske etiologije (Walch, 2003). Primećeno je da se ovaj oblik rezistencije javlja nakon samo nekoliko meseci od uvođenja novog antibiotika u kliničku praksu, kao što se dogodilo sa penicilinima i cefalosporinima, ili nakon nekoliko godina pa čak i desetak godina, što je ređi slučaj. Vankomicin je u kliničku upotrebu uveden 1956. go-

Vet. glasnik 63 (5-6) 311 - 320 (2009) Ružica Ašanin i sar.: Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

dine, a prvi slučaj rezistencije zabeležen je 1988. godine (Walch, 2003). Ustano-
vljeno je da se klinička rezistencija bakterija na antibiotike izrazito lako širi
preko drugih vrsta životinja, posebno miševa, mačaka i pasa, ali i preko ljudi koji
su prethodno dolazili u kontakt sa životinjama nosiocima rezistentnih sojeva *E.*
coli (Alonso, 2001; Hartman i sar., 2003; Krnjaić, 2005, Filipović, 2005).

Danas je poznato da najduže 3 godine posle uvođenja novog antibio-
tika u terapijski protokol za lečenje obolele životinje ili njihovog korišćenja kao
promotera rasta dolazi do pojave rezistentnih sojeva bakterija na taj antibiotik pri
čemu se pojava novih oblika rezistencije skoro uvek se otkriva najpre kod *E. coli*
(Bywater, 2004; Catry i sar., 2003). Međutim, 2003. godine otkriven je potpuno
novi oblik rezistencije na aminoglikozidne antibiotike kod sojeva *E. coli* poreklom
od ljudi i životinja, koji nije direktno povezan sa kliničkom upotrebom amino-
glikozida, ali do danas nije objašnjeno kako je došlo do širenja gena koji kodiraju
ovu rezistenciju. Naime, radi se o genima koji kodiraju proizvodnju enzima metil-
transferaze koja metiluje ciljno mesto vezivanja aminoglikozida, koji su inače nuk-
leotidi u 16S subjedinici ribozomalne RNK i na taj način ih čine neprepoznatljivim
za navedene antibiotike (Dominguez i sar., 2005). Ovi geni su postojali isključivo
kod bakterija koje i same proizvode aminoglikozidne antibiotike i to kao mehani-
zam samoodbrane. Tako su pomenuti geni otkriveni kod vrsta *Micromonospora*
purpurea koja proizvodi gentamicin, *Streptomyces tenjimariensis* koja proizvodi
istamicin, *Streptomyces griseus* koja proizvodi streptomycin itd., ali do 2003. godine
se ovi geni nisu mogli naći kod drugih vrsta bakterija. Kako je došlo do toga da se
navedeni geni prošire sa bakterija producera aminoglikozida na bakterije
uzročnike infektivnih bolesti još nije ustanovljeno. Takođe, nije jasno zašto su se
ovi geni proširili na ostale bakterije tek 2003. godine, kada se zna da postoje mili-
onima godina i da se aminoglikozidni antibiotici intenzivno koriste u kliničkoj
praksi skoro 40 godina. Naime, još od momenta uvođenja aminoglikozida u
kliničku praksu pojavila se i klinička rezistencija na aminoglikozide kod bakterija,
ali to su bili potpuno drugi mehanizmi rezistencije. Svim tim "starim" mehanizmima
rezistencije je zajednička proizvodnja enzima koji vrše fosforilaciju ili acetilaciju
samih aminoglikozida i tako ih inaktiviraju. Novootkriveni mehanizam rezistencije
na aminoglikozide se naziva i takozvani "high-level aminoglycosides resistance"
jer omogućava rezistenciju pri koncentracijama aminoglikozida većim čak od
1000 µg/mL pa i 2000 µg/mL koja u mikrobiološkom smislu predstavlja izrazito vi-
soku koncentraciju antibiotika. Stoga je, za sada, ovo jedan od najopasnijih oblika
rezistencije. Do danas je otkriveno 6 različitih gena koji kodiraju ovu rezistenciju i
oni su označeni kao *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* i *npmA*. Ono što je zabrinja-
vajuće jeste činjenica da se ovi geni u skoro 100 % slučajeva nalaze na konjugativ-
nim plazmidima pa se lako šire, a vezani su i sa genima koji kodiraju rezistenciju
na fluorokvinolone i proizvodnju ESBL enzima (beta laktamaze proširenog spek-
tra delovanja). Smatra se da su navedeni geni, tačnije *armA* gen koji je i prvi bio ot-
kriven, "izašli" iz Poljske u kojoj je prijavljen prvi slučaj ovog oblika rezistencije kod
soja *E. coli* izolovanog iz fecesa bolničkog pacijenta. Što se tiče veterinarske

Vet. glasnik 63 (5-6) 311 - 320 (2009) Ružica Ašanin i sar.: Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

medicine, do danas su pomenuti geni otkriveni kod sojeva *E. coli* poreklom od svinja, dok kod drugih životinja nisu zabeleženi. Slučajevi ovog oblika rezistencije kod sojeva *E. coli* u veterinarskoj medicini prijavljeni su u Španiji, Francuskoj, Bugarskoj i Japanu (Dominguez i sar., 2005).

Materijal i metode rada / Materials and methods

Materijal za ovo ispitivanje predstavljali su delovi creva (jejunum, ileum) uginule prasadi, rektalni brisevi i feces obolele prasadi uzorkovani na nekoliko farmi svinja iz okoline Beograda. Za izolaciju su korišćene klasične metode mikrobiološke dijagnostike, a za identifikaciju klasični i komercijalni testovi API 20E (bioMerieux, Francuska). Primenom hiperimunih dijagnostičkih seruma proizvedenih na kunićima koji su imunizovani referentnim sojevima *E. coli*, određivana je pripadnost izolovanih sojeva *E. coli* serološkim grupama: O8, O138, O139, O147, O149 i O157. Za identifikaciju fimbrijalnih adhezina korišćeni su komercijalni antiserumi (Toxigenic *E. coli* pili antisera, Denka Seiken, Japan) i to za adhezine K88 (F4), K99(F5) i 987P(F6), koji se najčešće nalaze kod svinja. Za ispitivanje osetljivosti na antibiotike izolovanih sojeva *E. coli* primenjene su disk difuziona i mikrodiluciona metoda u bujonu koje su izvođene na osnovu preporuka Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) iz 2008. godine. Ispitivanje je vršeno sa čistim aktivnim supstancama antibiotika: ampicilina, apramicina, gentamicina, kanamicina, tetraciklina, ceftriaksona i ciprofloksacina (Sigma, SAD). Svi nabrojani antibiotici koriste se i u kliničkoj veterinarskoj praksi osim apramicina, koji je u ovom ispitivanju korišćen kao marker antibiotik radi detekcije novog oblika rezistencije na aminoglikozide. Za kontrolu kvaliteta izvođenja metode, kvaliteta hranljivih podloga i ostalih dijagnostikuma korišćen je referentni soj *Escherichia coli* ATCC 25922. Očitavanje i interpretacija dobijenih rezultata vršeni su prema preporukama CLSI (2008).

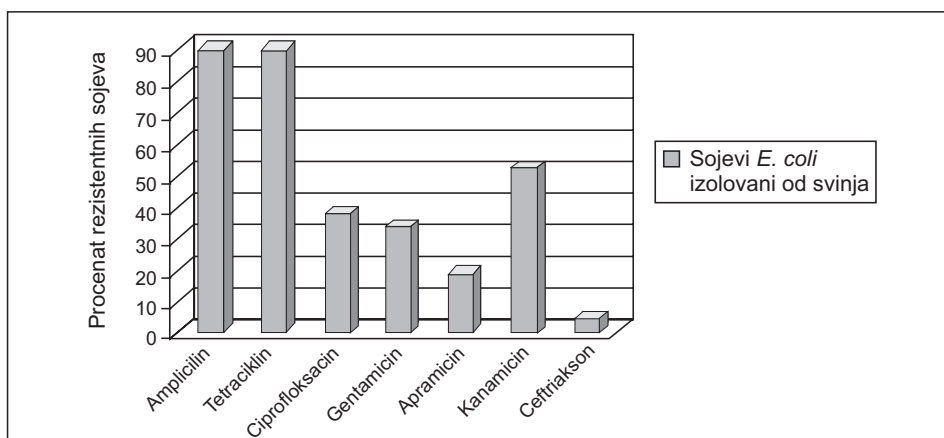
Rezultati ispitivanja i diskusija / Results and Discussion

Ukupno je izolovano 400 sojeva *E. coli*, od kojih je 48 svrstano u kategoriju patogenih sojeva. Serološkom tipizacijom izolovanih sojeva ustanovljeno je da 42,8% pripada serološkoj grupi O149, a zatim 19,0% grupi O138. Sa istim procentima sojeva od 14,2% bile su zastupljene grupe O8 i O147. Svega 9,5% sojeva je pripadalo grupi O157. Nije tipiziran nijedan soj *E. coli* iz serološke grupe O139.

Prisustvo fimbrijalnih adhezina je utvrđeno kod 19 (33,3%) sojeva. Najzastupljeniji su bili adhezini F4 i to kod 17 (29,8%) sojeva, dok je kod 2 (3,5%) soja ustanovljeno prisustvo F6 adhezina. Nijedan od ispitanih sojeva nije posedovao adhezin tipa F5.

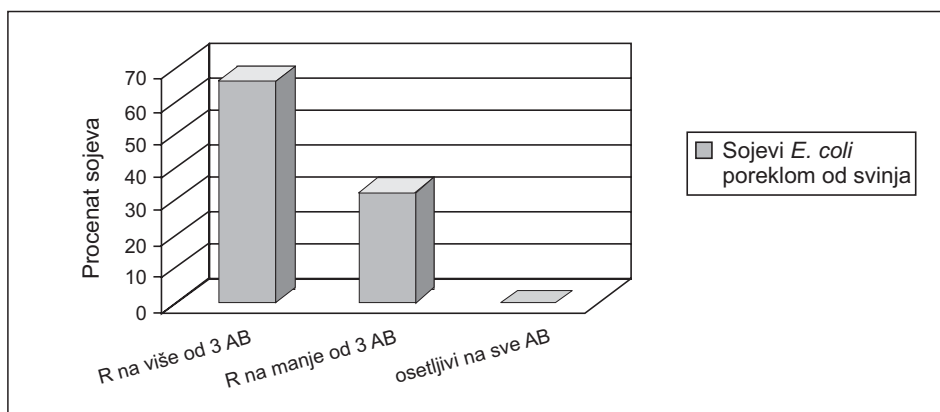
Vet. glasnik 63 (5-6) 311 - 320 (2009) Ružica Ašanin i sar.: Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

Od navedenog broja patogenih sojeva *E. coli* kod 32 (66,67%) ustanovljena je multirezistencija na 3 i više od 3 antibiotika, a kod 16 (33,33%) sojeva rezistencija na 2 ili 1 ispitivani antibiotik. Nisu otkriveni sojevi koji su bili osetljivi na sve primenjene antibiotike, odnosno svi ispitani sojevi bili su rezistentni na najmanje jedan antibiotik. Značajno je naglasiti da su svi izolovani sojevi *E. coli* obuhvaćeni ispitivanjem bili osetljivi samo na amikacin. Distribucija rezistencije na antibiotike obuhvaćene ispitivanjem prikazana je na grafikonima 1 i 2.



Grafikon 1. Prikaz procentualne zastupljenosti rezistencije na pojedine antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

Graph 1. Graphic illustration of resistance to some antibiotics in *E. coli* strains isolated from piglets shown in percentage



Grafikon 2. Prisustvo multirezistentnih sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi /

Graph 2. The presence of multiresistant *E. coli* strains isolated from piglets

Legenda: AB – antibiotik; R – rezistentan / Legend: AB - Antibiotic; R - Resistant

Vet. glasnik 63 (5-6) 311 - 320 (2009) Ružica Ašanin i sar.: Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

Kod 89,58% izolovanih patogenih sojeva *E. coli* ustanovljena je rezistencija na tetraciklin i ampicilin. Slične rezultate rezistencije na antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od svinja dobili su u ranijim istraživanjima (Krnjaić, 2000; Ašanin i sar., 2004; Krnjaić i sar., 2005; Filipović, 2005; Mišić i sar., 2006; Gavrović, 2007). Ovo ukazuje na to da se kod sojeva *E. coli* izolovanih od svinja u Srbiji rezistencija na tetraciklin i ampicilin održava na gotovo istom nivou već godinama, što nije neobično s obzirom na to da se navedeni antibiotici u našoj zemlji intenzivno upotrebljavaju kod životinja u svim granama proizvodnje. Najniži procenat od 4,17% rezistentnih sojeva *E. coli* ustanovljen je na ceftriakson. Vrlo visoko prisustvo rezistencije kod 37,5% sojeva otkriveno je na ciprofloksacin što je veoma zabrinjavajuća pojava prvenstveno zbog opasnosti od širenja ovog oblika rezistencije (kako gena rezistencije, tako i rezistentnih sojeva bakterija) na populaciju ljudi, jer je u humanoj medicini ciprofloksacin jedan od najšire upotrebljivanih antibiotika. Međutim, ni ovakav nalaz nije neobičan s obzirom na to da je rezistencija na fluorokvinolone kod sojeva bakterija poreklom od životinja otkrivena na svim kontinentima, osim u Australiji gde je upotreba antibiotika ove klase kod životinja zabranjena. U naše ispitivanje su bila uključena i tri antibiotika koji pripadaju klasi aminoglikozida, najpre iz razloga što se aminoglikozidi intenzivno koriste, kako u lečenju ljudi, tako i u lečenju životinja. Visoke vrednosti MIC-a apramicina mogu ukazivati na prisustvo novog, navedenog i vrlo opasnog oblika rezistencije. U ispitivanjima osetljivosti 48 izolovanih sojeva *E. coli* na apramicin, kod čak 9 (18,75%) sojeva vrednosti MIC-a apramicina su bile izuzetno visoke i iznosile su više od 128 µg/mL, što je jasan znak da se može sumnjati i na prisustvo novog oblika rezistencije kod sojeva *E. coli* izolovanih od svinja na farmama u Srbiji. Na ovu pretpostavku može ukazivati i rezultat koji je dobijen ispitivanjem osetljivosti izolovanih sojeva *E. coli* na kanamicin. Čak 13 (52,08%) sojeva *E. coli* bilo je rezistentno na ovaj antibiotik sa vrednostima MIC-a od preko 256 µg/mL. Na gentamicin je bilo rezistentno 33,3% sojeva sa vrednostima MIC-a od 16 do 128 µg/mL. Da bi novi oblik rezistencije bio potvrđen neophodno je detektovati *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* i *npmA* gene primenom molekularnih metoda. Ipak, kako se aminoglikozidi već duži niz godina široko koriste u veterinarskoj medicini u Srbiji, nije isključeno da se radi o starim mehanizmima rezistencije na ove antibiotike. Najmanji procenat rezistentnih sojeva *E. coli* od 4,17% ustanovljen je na ceftriakson.

Zaključak / Conclusion

Visoke vrednosti MIC-a apramicina dobijene primenom veoma osetljive mikrodilucione metode u bujonu mogu ukazivati na prisustvo novog i vrlo opasnog oblika rezistencije na aminoglikozidne antibiotike. Međutim, da bi ovakva sumnja bila i potvrđena moraju se primenom molekularnih metoda detektovati i geni odgovorni za rezistenciju na aminoglikozide. Sigurno je da razlog za zabrinutost i dalje postoji jer od 400 izolovanih i ispitanih sojeva nije otkriven

Vet. glasnik 63 (5-6) 311 - 320 (2009) Ružica Ašanin i sar.: Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

nijedan soj koji je bio osetljiv na sve antibiotike, ali je rezistencija na ampicilin i tetraciklin ustanovljena kod čak 89,58% sojeva. Na ciprofloksacin je bilo rezistentno 37,5% sojeva, što je takođe zabrinjavajuće visok procenat jer je ciprofloksacin jedan od najznačajnijih antibiotika koji se koristi u humanoj medicini.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

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

Literatura / References

1. Alonso A, Sánchez P, Martínez JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 2001; 3(1):1-9.
2. Ašanin R, Krnjaić D, Mišić D. Ispitivanje rezistencije izolovanih sojeva *E. coli* od teladi i svinja na antimikrobna sredstva. *Veterinarski glasnik* 2004; 58(5-6): 607-17.
3. Ašanin R, Mišić D, Krnjaić D. Značaj monitoringa rezistencije bakterija na antimikrobna sredstva. *Tehnologija mesa* 2005; 46(1-2): 75-80.
4. Bywater JR. Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J Vet Med* 2004; 51: 361-3.
5. Catry B, Laevens H, Devriese LA, Opsomer G, de Kruif A. Antimicrobial resistance in livestock, 2003.
6. Dominguez L. *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*, *Emerging Infectious Diseases*, 2005.
7. Fairbrother JM, Gyles CL. *Escherichia coli* infections: In, *Diseases of Swine*, by Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, Blackwell Publishing, 2006.
8. Filipović I. Ispitivanje rezistencije nekih patogenih bakterija izolovanih od domaćih životinja na području Crne Gore. *Magistarska teza*, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 2005.
9. Gavrović M. Ispitivanje osetljivosti nekih patogenih bakterija izolovanih od životinja na odabrane antibiotike i hemioterapeutike, *Magistarska teza*, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 2007.
10. Hariharan H, Coles M, Poole D, Page R. Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves with diarrhea. *Can Vet J* 2004; 45: 605-6.
11. Krnjaić D. Ispitivanje rezistencije bakterija izolovanih od domaćih životinja prema hemoterapijskim sredstvima. *Doktorska disertacija*, 2000.
12. Krnjaić D, Mišić D, Ašanin R. Investigation of sensitivity and resistance to antibiotics and chemiotherapeutics in *E. coli* strains isolated from animals bred in intensive farming conditions. *Acta Veterinaria* 2005; 55(5-6): 501-9.
13. Mišić D, Stošić Z, Kiškarolj F, Adamov V, Ašanin R. Ispitivanje multirezistencije *E. coli* i *Salmonella* koje potiču od domaćih životinja na antibiotike i hemioterapeutike, *Veterinarski glasnik* 2006; 60(1-2): 21-31.
14. Smith JT, Lewin CS. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. *Vet Microbiol* 1993; 35(3-4): 233-42.
15. Walsh C. Antibiotics: actions, origins, resistance. *American Society for Microbiology Press*, 2003.

Vet. glasnik 63 (5-6) 311 - 320 (2009) Ružica Ašanin i sar.: Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

ENGLISH

THE INVESTIGATION OF NEW FORMS OF RESISTANCE TO SOME ANTIBIOTICS IN *E. coli* STRAINS ISOLATED FROM PIGLETS

Ružica Ašanin, M. Žutić, Jelena Ašanin, D. Mišić, Jadranka Žutić,
Dobriša Jakić-Dimić, N. Milić, J. Nišavić

The resistance of bacteria poses a significant problem everywhere in the world, and consequently in our country as well. The non-critical use of antibacterial medicines in human and veterinary medicine has contributed to the spreading of this resistance. Due to the topical importance of this problem, large numbers of states in the world are financing projects of which the objective is to follow and monitor bacterial resistance.

The objective of this investigation was to isolate and identify pathogenic strains of *E. coli* from piglets with clinically manifest diarrhoea and to examine the sensitivity of the isolated strains to a certain number of selected antibiotics. The material for these investigations were parts of intestines (jejunum, ileum) from piglets that died, rectal smears and feces of diseased piglets sampled pig farms in the vicinity of Bgrade.

Conventional methods of microbiological diagnostics were used for isolation, and conventional and commercial tests API 20E (bioMerieux, France) were used for identification. Following biochemical identification using hyperimmune serums for certain group (O) antigens: (O8, O138, O139, O147, O149, and O157), the serological typization of the strains was carried out.

Commercial antisera: T K88 (F4), K99 (F5), and 987P (F6), Toxigenic *E. coli* pili antisera, Denka Seiken Co. Ltd. Tokyo, Japan) were used to establish the presence and to identify fimbrial antigens-adhesins through slide agglutination reaction. The sensitivity of the antibiotics to the isolated strains of *E. coli* was examined using the disc diffusion method according to Kirby Bauer and the microdilution method in bouillon according to CLSI recommendations (2008). Examinations using the microdilution method in bouillon were performed with pure active antibiotic substances: ampicillin, apramycin, gentamicin, kanamycin, tetracycline, ceftriaxone, and ciprofloxacin (Sigma, USA). A total of 400 *E. coli* strains were isolated, including 48 *E. coli* strains that are within the category of pathogenic strains. Out of the total number of pathogenic strains of *E. coli*, 32 (66.67%) were found to be multiresistant to 3 or more than 3 antibiotics, and 16 (33.33%) pathogenic strains of *E. coli* were resistant to 2 or 1 of the examined antibiotics.

Resistance to tetracycline and ampicillin was established in 89.58% isolated strains of *E. coli*, and to ciprofloxacin in 37.5% strains. The lowest percentage of resistance to ceftriaxone was established in 4.17% strains of *E. coli*. The isolated strains of *E. coli* were also found to be resistant to certain aminoglycosides antibiotics. Thus, resistance to apramycin was established in 18.75% strains whose MIC values were higher than 128 µg/mL. Resistance to kanamycin was established in 52.08% strains of *E. coli*, and in these, 96.00% strains showed MIC kanamycin values of over 256 µg/mL. Resistance to the third aminoglycosides antibiotic, gentamicin, was established in 33.33% *E. coli* strains. All the *E. coli* strains that led to diarrhoea in piglets were resistant to at least two antibiotics, and more than 50% strains were found to be resistant to more than 3 antibiotics. It is significant to stress that all isolated strains of *E. coli* covered by these investigations were sensitive only to amikacyn.

Key words: pigs, *E. coli*, resistance, antibiotics

Vet. glasnik 63 (5-6) 311 - 320 (2009) Ružica Ašanin i sar.: Ispitivanje prisustva novih oblika rezistencije na neke antibiotike kod sojeva *E. coli* izolovanih od prasadi

РУССКИЙ

ЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ФОРМ СОПРОТИВЛЕНИЯ К АНТИБИОТИКАМ У ШТАММОВ *E. coli*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПОРОСЯТ

Ружица Ашанин, М. Жутич, Елена Ашанин, Д. Мишич, Ядранка Жутич, Добрила Якич-Димич, Н. Милич, Я. Нишавич

Соппротивление бактерий представляет собой значительную проблему всюду в мире, да и у нас. Расширению соппротивления содействовало некритическое употребление антибактериальных лекарств в гуманной и ветеринарной медицине. Из-за актуальности проблемы большое число государств в мире финансирует проекты чья цель слежка и надзор над соппротивляемостью бактерий.

Цель этого исследования была изоляция и идентификация патогенных штаммов *E. coli* из поросят с клинически манифестной диареей и испытание чувствительности изолированных штаммов на определённое число отобранных антибиотиков. Материал для этого испытания представляли собой части кишок (еюnum, илеум) из околевших поросят, ректальные мазки и помёт заболевших поросят, образчикованы на фермах свиней из окрестности Белграда.

Для изоляции пользованы классические методы микробиологической диагностики, а для идентификации классические и коммерческие тесты АПИ20Е (BioMerieux, Франция). После биохимической идентификации с помощью гипериммунных серумов для определённых групповых (О) антигенов (О8, О138, О139, О147, О149 и О157) совершена серологическая типизация штаммов.

Для утверждения присутствия и идентификации фимбриальных антигенов-адгезинов реакцией агглютинации на плите пользованы коммерческие антисерумы: К88 (F4), К99 (F5) и 987Р (F6), *Toxigenic E. coli pili antisera*, Denka Senken Co Ltd. Токио, Японоя. Чувствительность к антибиотикам изолированных штаммов *E. coli* испытана применением диск диффузионного метода по Кирбе Бауре и микродилуционного метода в бульоне по рекомендациям CLSI (2008). Испытание микродилуционным методом в бульоне совершено с чистыми активными субстанциями антибиотиков: ампицилина, апрамицина, гентамицина, канамицина, тетрациклина, цефтриаксона и ципрофлоксацина (Sigma, США). Совокупно изолировано 400 штаммов *E. coli*, из которых 48 распределено в категорию патогенных штаммов. Из совокупного числа патогенных штаммов *E. coli* у 32 (66,67%) установлено мультисоппротивление к 3 и больше 3 антибиотиков, а у 16 (33,33%) штаммов *E. coli* соппротивление к 2 или 1 испытаний антибиотик.

Соппротивление к тетрациклину и ампицилину установлено у 89,58% изолированных штаммов *E. coli*, а к ципрофлоксацину у 37,5% штаммов. Наиболее низкий процент соппротивления к цефтриаксону установлен у 4,17% штаммов *E. coli*. Присутствие соппротивления у изолированных штаммов *E. coli* установлено и к некоторым аминогликозидным антибиотикам. Так соппротивление к апрамицину установлено у 18,75% штаммов у которых стоимости MIC-а были больше 128 мг/мл. У 52,08% штаммов *E. coli* открыто соппротивление и к канамицину, а из приведённого процента у 96,00% штаммов стоимости МИЦ-а канамицина составляли больше 256 мг/мл. Также, у 33,33% штаммов *E. coli* установлено соппротивление и к третьему аминогликозидному антибиотик гентамицину. Все штаммы *E. coli*, которые обуславливали диарею у поросят были супротивляемые к меньше всего дум антибиотикам, а больше 50% штаммов открыто присутствие соппротивления к больше 3 антибиотикам. Значительно подчеркнуть, что все изолированные штаммы *E. coli* охвачены испытанием были чувствительный только к амикацину.

Ключевые слова: свиньи, *E. coli*, антибиотики, соппротивление

**KONCENTRACIJA KORTIZOLA, INSULINU SLIČNOG
FAKTORA RASTA-I I IMUNOGLOBULINA G-KLASE U KRVI
NEONATALNE TELADI RAZLIČITE TELESNE MASE NA
ROĐENJU***

***CONCENTRATION OF CORTISOL, INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I
AND IMMUNOGLOBULIN G CLASS IN BLOOD OF NEONATAL
CALVES OF DIFFERENT BODY MASS AT BIRTH***

**Danijela Kirovski, H. Šamanc, Natalija Fratrić, D. Gvozdić, S. Hristov,
Ž. Sladojević, C. Mircu, Camelia Tulcan****

Cilj ovog rada je da se ispita da li koncentracije kortizola, insulinu-sličnog faktora rasta-I (IGF-I) i imunoglobulina klase G (IgG), odnosno parametara krvi za koje se smatra da su izuzetno značajni za postnatalni opstanak teladi, zavise od telesne mase teladi na rođenju. Ispitivanja su izvršena na 12 novorođenih teladi Holštajn-Frizijske rase, razdvojenih u dve grupe na osnovu telesne mase na rođenju. U prvu grupu (n=6) svrstana su telad čija je telesna masa bila veća od 35 kg na rođenju ($41,67 \pm 3,08$ kg), dok su u drugu grupu (n=6) svrstana telad čija je telesna masa na rođenju bila manja od 35 kg ($32,00 \pm 3,58$ kg). Neposredno pre napajanja kolostrumom, kao i 32. sata neonatalnog života, uzeti su uzorci krvi. U uzorcima krvnog seruma uzetim neposredno pre napajanja kolostrumom određivana je koncentracija kortizola i IGF-I, dok je u uzorcima uzetim 32 sata nakon rođenja teladi određivana koncentracija IgG. Koncentracija kortizola kod teladi rođene sa većom telesnom masom ($61,51 \pm 32,78$ nmol/l) je bila niža ($p = 0,052$) nego kod teladi rođenih sa nižom telesnom masom ($94,89 \pm 17,74$ nmol/l). Utvrđena je značajna negativna korelacija ($r = -0,592$; $p < 0,05$) između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije kortizola. Koncentracija IGF-I određena neposredno nakon rođenja kod te-

* Rad primljen za štampu 28. 12. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Danijela Kirovski, docent, dr sci. med. vet. Horea Šamanc, red. profesor, dr sci. med. vet. Natalija Fratrić, docent, dr sci. med. vet. Dragan Gvozdić, red. profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr sci. med. vet. Slavča Hristov, vanr. profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Ž. Sladojević, "Veterina sistem Sladojević", Gradiška, BiH, Republika Srpska; Calin Mircu, docent, Camelia Tulcan, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Temišvaru, Rumunija

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

ladi sa većom telesnom masom na rođenju ($10,17 \pm 1,71$ nmol/l) bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) u odnosu na telad rođenu sa nižom telesnom masom ($7,04 \pm 1,15$ nmol/l). Postojala je značajna pozitivna korelacija ($r = 0,519$; $p < 0,10$), između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IGF-I. Trideset dva sata nakon rođenja koncentracija IgG u krvnom serumu teladi rođene sa višom telesnom masom ($18,72 \pm 1,99$ g/l) je bila značajno viša ($p < 0,05$) nego kod teladi rođene sa nižom telesnom masom ($11,68 \pm 4,79$ g/l). Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IgG određene trideset i drugog sata neonatalnog života ($r = 0,620$; $p < 0,05$). Dobijeni rezultati upućuju na zaključak da su telad telesne mase preko 35 kg na rođenju bolje adaptirane na uslove spoljašnje sredine u odnosu na telad koja su rođena sa telesnom masom manjom od 35 kilograma.

Ključne reči: novorođena telad, telesna masa, kortizol, IGF-I, imunoglobulini G klase

Uvod / Introduction

U prvim danima života teladi endokrini sistem nije potpuno razvijen i njegovo funkcionisanje je regulisano drugačijim mehanizmima u odnosu na odrasle jedinke. Naime, hormonalni status novorođenčadi je u velikoj meri uslovljen prisustvom hormona u njihovoj cirkulaciji koji potiču još iz fetalne cirkulacije, a dospeli su u nju iz krvotoka majke, ili, kasnije, su resorbovani iz digestivnog trakta a kolostralnog su porekla (Blum i sar., 1999).

Koncentracija kortizola, hormona za koji se smatra da je glavni pokazatelj stresogene reakcije, je višestruko veća kod novorođenčadi u odnosu na odrasle jedinke (Stojić i sar., 2002). Inače, poznato je da kortizol dominira u krvnoj plazmi novorođene teladi, dok se kortikosteron pojavljuje kasnije, od desetog do četrnaestog dana života (Hristov i sar., 1990; 1994). Smatra se da je ova visoka koncentracija kortizola u prvim danima života fiziološki opravdana i neophodna za opstanak novorođenčadi. Utvrđena je čvrsta veza između dužine trajanja graviditeta i koncentracije kortizola u krvnoj plazmi novorođene teladi (Richet i sar., 1987). Naime, kortizolemija je kod teladi rođenih posle optimalnog vremena trajanja graviditeta značajno viša u odnosu na kortizolemiju merenu u isto vreme kod teladi rođenih posle graviditeta koji je trajao kraće od 270 dana ili duže od 285 dana. Dalje, isti autori su utvrdili da je kod teladi koja dolaze na svet posle kraćeg trajanja graviditeta (252 do 263 dana) odgovor ćelija kore nadbubrežne žlezde na aplikaciju ACTH slabiji, nego kod teladi koja su rođena na vreme. Ovaj podatak može delimično da objasni zašto su neka telad odmah posle rođenja manje otporna i teže se prilagođavaju na različite stresogene činioce, koji mogu iznenada da deluju u najranijoj fazi njihovog života i tako budu neposredan povod za nastajanje zdravstvenih problema.

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

Pravilan razvoj somatotropne osovine u prvim danima života je od izuzetnog značaja za kasniji pravilan rast, razvoj i zdravlje teladi (Kirovski, 2002). Mehanizam funkcionisanja somatotropne osovine je, pri tome, značajno različit između novorođenih i odraslih jedinki kod svih životinjskih vrsta. Ispitivanja su pokazala da, za razliku od odraslih goveda, kod kojih aplikovanje deksametazona ima negativno dejstvo na somatotropnu osovinu, odnosno dovodi do smanjenja koncentracije insulinu-sličnog faktora rasta-I (IGF-I) (Maciel i sar., 2001), kod novorođenčadi davanje ovog sintetskog kortikosteroida stimuliše somatotropnu osovinu i izaziva porast koncentracije IGF-I u cirkulaciji (Hammon i sar., 2003; Sauter i sar., 2003).

Odbrana novorođenčadi od infektivnih bolesti je u velikoj meri uslovljena koncentracijom imunoglobulina u krvi. S obzirom da se telad rađaju u stanju fiziološke agamaglobulinemije, ovi imunoglobulini potiču iz kolostruma majke nakon njihove resorpcije iz digestivnog trakta. Za opstanak novorođenčadi je izuzetno značajano da se ovi imunoglobulini resorbju u dovoljnoj koncentraciji koja će obezbediti adekvatnu zaštitu. S obzirom na značaj imunoglobulina u zaštiti teladi od infektivnih oboljenja mnogi autori su ispitivali uticaj različitih faktora na koncentraciju IgG u krvi novorođene teladi. Na koncentraciju imunoglobulina G-klase u krvi novorođene teladi utiču vreme prvog uzimanja kolostruma, količina unetog kolostruma, koncentracija imunoglobulina u kolostrumu, kao i način napoja. Stres, rasa, sezonski faktori i vreme koje telad provede uz majku su do sada pouzdano utvrđeni faktori koji takođe mogu uticati na stepen resorpcije imunoglobulina u crevu novorođenčadi a time i na njihovu koncentraciju u krvi teladi (Stojić i sar., 2000).

Cilj ovog rada je da se ispita da li koncentracija kortizola, IGF-I i imunoglobulina klase G, odnosno parametara krvi za koje se smatra da su izuzetno značajni za postnatalni opstanak teladi, zavisi od telesne mase teladi na rođenju.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Ispitivanja su izvršena na 12 novorođenih teladi Holštajn-Frizijske rase, razdvojenih u dve grupe na osnovu telesne mase na rođenju. U prvu grupu (n=6) svrstana su telad čija je telesna masa na rođenju bila veća od 35 kg, dok su u drugu grupu (n=6) svrstana telad čija je telesna masa na rođenju bila manja od 35 kg. Neposredno pre napajanja kolostrumom, kao i 32. sata neonatalnog života, uzeti su uzorci krvi punkcijom vene jugularis. Uzorci su ostavljeni da spontano koagulišu, nakon čega su centrifugovani na 2000 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Tako dobijeni uzorci krvnog seruma zamrznuti su na -20°C do izvođenja analiza.

U uzorcima krvnog seruma uzetih neposredno pre napajanja određivana je koncentracija kortizola i IGF-I, dok je koncentracija imunoglobulina G-klase određivana u uzorcima uzetim 32 sata nakon rođenja teladi. Koncentracija kortizola i IGF-I određivana je radioimunološkom metodom uz upotrebu komerci-

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

jalnih kitova (RIA, INEP Zemun). Koncentracija IgG određivana je komercijalnim radijalnim imunodifuzionim testom (sRID, INEP Zemun).

Rezultati ispitivanja obrađeni su standardnim statističkim metodama i izračunati su srednja vrednost, standardna devijacija, standardna greška i koeficijent varijacije. Za ocenu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti primenjen je Student-ov "t – test". Step en korelacije između telesne mase teladi i ispitivanih parametara u krvnog serumu utvrđen je izračunavanjem koeficijenta korelacije (r).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

U tabeli 1 prikazana je prosečna telesna masa teladi na rođenju, koncentracija kortizola, IGF-I i IgG u krvnom serumu obe grupe teladi kao i statistička značajnost razlike ispitivanih parametara.

Tabela 1. Telesna masa teladi (kg), koncentracija kortizola (nmol/l), IGF-I (nmol/l) i IgG (g/l) u krvi neonatalne teladi /

Table 1. Body mass of calves (kg), concentrations of cortisol (nmol/l), IGF-I (nmol/l), and IgG (g/l) in blood of neonatal calves

	Telesna masa / Body mass (kg)		Koncentracija kortizola / Cortisol concentration (nmol/l)		Koncentracija IGF-I / IGF-I concentration (nmol/l)		Koncentracija IgG / IgG concentration (g/l)	
	I	II	I	II	I	II	I	II
X	41,67	32,00***	61,51	94,89 ^o	10,17	7,04*	18,72	11,68*
SD	3,08	3,58	32,78	17,74	1,71	1,15	1,99	4,79
SE	1,26	1,46	13,38	7,24	0,69	0,47	0,81	1,95
CV (%)	7,39	11,18	53,29	18,69	16,81	16,33	10,63	41,01
IV	38,0-45,0	27,0-35,0	11,22-95,16	66,83-115,19	8,36-13,2	5,01-8,1	15,1-20,5	6,4-20,7

IGF-I – insulinu sličan faktor rasta-I / *insulin-like growth factor-I*

IgG – imunoglobulini G klase / *immunoglobulin G class*

^o – p = 0,05 u odnosu na prvu grupu teladi za ispitivani parametar /

^o – p = 0,05 in comparison with first group of calves for examined parameter

* – p < 0,05 u odnosu na prvu grupu teladi za ispitivani parametar /

* – p < 0,05 in comparison with first group of calves for examined parameter

Prosečna telesna masa teladi prve grupe bila je 41,67±3,08 kg, dok je prosečna težina teladi druge grupe bila 32,00±3,58 kg. Telesna masa teladi prve grupe je bila statistički značajno veća (p<0,001) nego teladi druge grupe. Iz prikazanih podataka se zapaža da je koncentracija kortizola kod teladi rođene sa većom telesnom masom (61,51±32,78 nmol/l) niža nego kod teladi rođenih sa nižom telesnom masom (94,89±17,74 nmol/l). Ova razlika je bila na granici statističke značajnosti (p=0,052). Koncentracija kortizola kod novorođenih teladi po-

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

kazuje značajnu varijabilnost jer zavisi od izrazito velikog broja kako endogenih, tako i egzogenih faktora (Šamanc i sar., 2008). I pored toga, naši rezultati pokazuju značajan uticaj telesne mase teladi na rođenju na koncentraciju kortizola u krvnom serumu. Utvrđivanjem stepena korelacije između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije kortizola utvrđena je značajna negativna korelacija ($r = -0,592$; $p < 0,05$). Ova korelacija je u skladu sa nalazima drugih autora (Burdick i sar., 2009). Ovaj rezultat nas može navesti na zaključak da su telad manje telesne mase na rođenju izloženi delovanju stresogenih faktora nego telad veće telesne mase. Moguće je da to vremenom dovede do iscrpljivanja adrenokortikotropne osovine novorođenčadi zbog čega su telad manje telesne mase na rođenju više izložena delovanju stresogenih faktora posle rođenja (Šamanc i sar., 2008).

Koncentracija IGF-I određena neposredno nakon rođenja kod teladi sa većom telesnom masom na rođenju ($10,17 \pm 1,71$ nmol/l) bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) u odnosu na telad rođenu sa nižom telesnom masom ($7,04 \pm 1,15$ nmol/l). Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima drugih autora koji su ispitali povezanost telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IGF-I u krvnom serumu neonatalne teladi (Kuhne i sar., 2001; Kirovski i sar., 2002). Iz literature je poznato da su glavni faktori koji utiču na koncentraciju IGF-I u cirkulaciji koncentracija hormona rasta, koncentracija insulina, kao i količina hranljivih materija, naročito aminokiselina, koje se resorbuju iz digestivnog trakta (Ontsouka i sar., 2004). Kod novorođenčadi svih životinjskih vrsta, energetski status jedinke, odnosno količina unetih hranljivih materija je značajnija u regulaciji koncentracije IGF-I u krvi, nego hormon rasta, jer je kod njih smanjeno prisustvo receptora za hormon rasta u jetri (Breier i sar., 1986). Objašnjenje za ovu povezanost koncentracije IGF-I i energetskog statusa jedinke leži u činjenici da u svim slučajevima energetskog deficita jedinke dolazi do dekuplovanja veze između koncentracije IGF-I i koncentracije hormona rasta u krvi, a uspostavljanja jake pozitivne korelacije između koncentracije insulina i koncentracije IGF-I u krvi (Renaville i sar., 2002). Telesna masa teladi je u izrazitoj pozitivnoj korelaciji sa energetskim statusom jedinki na rođenju, što je najverovatniji razlog zbog čega je koncentracija IGF-I značajno viša kod teladi sa većom telesnom masom na rođenju. Računanjem stepena korelacije između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IGF-I dobijenih kod teladi ispitivanih u ovom radu utvrđena je značajna pozitivna korelacija ($r = 0,519$; $p < 0,10$), što dodatno potvrđuje zaključak da telad sa većom telesnom masom na rođenju imaju višu koncentraciju IGF-I u krvi.

Utvrđeno je da je 32 sata nakon rođenja koncentracija IgG u krvnom serumu teladi rođene sa većom telesnom masom ($18,72 \pm 1,99$ g/l) je bila značajno viša ($p < 0,05$) nego kod teladi rođene sa nižom telesnom masom ($11,68 \pm 4,79$ g/l). Pored toga, utvrđena je značajna pozitivna korelacija između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IgG određene trideset i drugog sata neonatalnog života ($r = 0,620$; $p < 0,05$). Razlog za ovu korelaciju verovatno je to što su kod teladi veće telesne mase neonatalna creva razvijenija, a samim tim je veći i njihov resorptivni kapacitet prema imunoglobulinima (Stojić i sar., 1995). Insulinu

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

sličan faktor rasta-I, čija je koncentracija značajno veća kod teladi rođenih sa većom telesnom masom, ima izrazito veliki značaj u pravilnom razvoju creva u prvih nekoliko dana života (Ma i sar., 1997), a samim tim, verovatno, i na sposobnost neonatalnih creva da resorbuju IgG.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata može da se zaključi da telad veće telesne mase na rođenju ima značajno višu koncentraciju insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase, a značajno nižu koncentraciju kortizola u krvnom serumu u odnosu na telad rođenu sa manjom telesnom masom. To ukazuje da su telad telesne mase preko 35 kg na rođenju imaju bolju mogućnost adaptacije na uslove spoljašnje sredine, koji podrazumevaju delovanje različitih stresogenih i infektivnih agenasa, u odnosu na telad koja su rođena sa telesnom masom manjom od 35 kilograma.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENTS:

Rad je finansiran sredstvima Ministarstva nauke Republike Srbije TR 20110: Razvoj i implementacija standarda dobrobiti i biosigurnosti u cilju unapređenja tehnologije proizvodnje goveda i svinja. /

This work has been financed with funds of the Republic of Serbia Ministry of Science TR 20110: Development and implementation of welfare and biosafety standards with the objective of promoting the technology of cattle and swine production.

Literatura / References

1. Blum JW, Hammon H. Endocrine and metabolic aspects in milk-fed calves. *Domest Anim Endocrinol* 1999; 17: 219-30.
2. Breier BH, Bass JJ, Butler JH, Gluckman PD. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor 1. *J Endocrinol* 1986; 111: 209-15.
3. Burdick NC, Banta JP, Neuendorff DA, White JC, Vann RC, Laurenz JC, Welsh TH Jr, Randel RD. Interrelationships among growth, endocrine, immune, and temperament variables in neonatal Brahman calves. *J Anim Sci* 2009; 87: 3202-10.
4. Hammon HM, Zbiden Y, Sauerwein H, Breier BH, Blum JW. The response of hepatic insulin-like growth factor system to growth hormone and dexamethasone in calves. *J Endocrinol* 2003; 179: 427-35.
5. Hristov S, Đurđević Đ, Grubić G, Bogdanović V, Vidić R, Bokan Lj. Koncentracija kortizola u krvnom serumu goveda. *Veterinarski glasnik* 1994; 48: 853-859.
6. Hristov S. Promena koncentracije kortizola u prvom mesecu života teladi. Zbornik radova 9-og seminara "Inovacije u stočarstvu". Beograd, Srbija, 1990: 89-98.
7. Kirovski D, Stojić V, Nikolić JA. Serum levels of insulin-like growth factor-I and total protein in newborn calves offered different amounts of colostrum. *Acta Veterinaria* 2002; 52: 285-97.
8. Kuhne S, Hammon HM, Bruckmaier RM, Morel C, Zbiden Y, Blum JW. Growth performance, metabolic and endocrine traits, and absorptive capacity in neonatal

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulina sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

- calves fed either colostrum or milk replacer at two levels. J Anim Sci 2000; 78: 609-20.
9. Ma L, Xu RJ. Oral insulinlike growth factor-I stimulates intestinal enzyme maturation in newborn rats. Life Sci 1997; 61: 51-8.
 10. Maciel CM, Chamberlain CS, Wettemann RP, Spicer LJ. Dexamethasone influences endocrine and ovarian function in dairy cattle. J Dairy Sci 2001; 84: 1998-2009.
 11. Ontsouka CE, Sauter SN, Blum JW, Hammon. Effects of colostrum feeding and dexamethasone treatment on mRNA levels of insulin-like growth factors (IGF)-I and -II, IGF binding proteins-2 and -3, and on receptors for growth hormone, IGF-, IG-II, and insulin in the gastrointestinal tract of neonatal calves. Domest Anim Endocrinol 2004; 26: 155-75.
 12. Renaville R, Hammadi M, Portetelle D. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. Domest Anim Endocrinol 2002; 23: 351-60.
 13. Richet E, Safwate A, Davicco MJ, Dalle M, Barlet JP. Function corticosurrénalienne chez le jeune veau. Physiologie et pathologie perinatales chez les animaux de ferme 1987: 247-56.
 14. Šamanc H, Kirovski D. Adrenokortikalni sistem goveda. 1. izd. Beograd: Naučni institut za veterinarstvo, 2008.
 15. Sauter SN, Ontsouka E, Roffler B, Zbiden Y, Philipona C, Pfaffi M, Breier BH, Blum JW, Hammon HM. Effects of dexamethasone and colostrum intake on the somatotrophic axis in neonatal calves. Am J Physiol 2003; 285: E252-61.
 16. Stojić V, Nikolić JA, Huszenicza GY, Šamanc H, Gvozdić D, Kirovski D. Plasma levels of triiodothyronine, thyroxine and cortisol in newborn calves. Acta Veterinaria 2002; 52: 85-96.
 17. Stojić V, Šamanc H, Fratrić N. The effect of clinoptilolite based mineral adsorber on colostral immunoglobulin G absorption in newborn calves. Acta Veterinaria 1995; 45: 67-74.
 18. Stojić V, Stevanović J, Kirovski D. Uticaj kolostruma na imunost mladunaca domaćih sisara tokom prvih dana Veterinarski glasnik 2000; 54: 93-106.

ENGLISH

CONCENTRATION OF CORTISOL, INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I AND IMMUNOGLOBULIN G CLASS IN BLOOD OF NEONATAL CALVES OF DIFFERENT BODY MASS AT BIRTH

Danijela Kirovski, H. Šamanc, Natalija Fratrić, D. Gvozdić, S. Hristov, Ž. Sladojević, C. Mircu, Camelia Tulcan

The objective of this work was to examine whether concentrations of cortisol, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and immunoglobulin G class (IgG), in fact blood parameters which are believed to be of extreme importance in the postnatal survival of calves, are dependant on the body mass of calves at birth. Investigations were performed on 12 newborn calves of the Holstein-Friesian breed, placed into two groups on the grounds of their body mass at birth. The first group (n=6) comprised calves whose body mass was more than 35 kg at birth (41.67 ± 3.08 kg), while the second group (n=6) comprised calves whose body mass at birth was less than 35 kg (32.00 ± 3.58 kg). Blood samples were taken

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

immediately preceding the consuming of colostrum, as well as at 32 hours of neonatal life. Cortisol and IGF-I concentrations were determined in blood serum samples taken immediately before colostrum consumption, while IgG concentration was determined in the samples taken 32 hours after the birth of the calves. The cortisol concentration in calves born with a greater body mass (61.51 ± 32.78 nmol/l) was lower ($p=0.052$) than in calves born with a smaller body mass (94.89 ± 17.74 nmol/l). A significant negative correlation ($r=-0.592$; $p<0.05$) was established between the body mass of calves at birth and the cortisol concentration. The IGF-I concentration determined immediately following birth in calves with a greater body mass at birth (10.17 ± 1.71 nmol/l) was statistically significantly higher ($p<0.05$) in comparison with calves born with a smaller body mass (7.04 ± 1.15 nmol/l). There was a significant positive correlation ($r = 0.519$; $p<0.10$) between the body mass of calves at birth and the IGF-I concentration. Thirty-two hours following birth, the IgG concentration in blood serum of calves born with a bigger body mass (18.72 ± 1.99 g/l) was significantly higher ($p<0.05$) than in calves born with a smaller body mass (11.68 ± 4.79 g/l). A significant positive correlation was established between the body mass of calves at birth and the IgG concentration determined at 32 hours of neonatal life ($r = 0.620$; $p<0.05$). The obtained results point to the conclusion that calves of body mass over 35 kg at birth are better adapted to the conditions of the outer environment in comparison with calves born with a body mass of less than 35 kg.

Key words: newborn calves, body mass, cortisol, IGF-I, immunoglobulins G class

РУССКИЙ

КОНЦЕНТРАЦИЯ КОРТИЗОЛА, ИНСУЛИНУ ПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА-I И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ Г КЛАССА В КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ РАЗЛИЧНОЙ МАССЫ ТЕЛА НА РОЖЕДНИИ

Даниела Кировски, Х. Шаманц, Наталия Фратрич, Д. Гвоздич, С. Христов, Ж. Сладоевич, С. Mircu, Camelia Tulcan

Цель этой работы испытать ли концентрации кортизола, инсулину-подобного фактора роста-I (ИГФ-I) и иммуноглобулинов класса Г (ИгГ), то есть параметров крови для которых считается, что исключительно значительные для новорождённого существования телят, зависит от массы тела телят на рождении. Испытания совершены на 12 новорождённых телят Холштайн-Фризийской породы, раздвоенных в двух группах на основе массы тела на рождении. В первую группу ($n=6$) распределены телята чья масса тела была больше 35 кг ($32,00 \pm 3,58$ кг). Непосредственно до напаивания колострумом, словно и 32 часа новорождённой жизни, взяты образчики крови. В образчиках кровяного серума взятым непосредственно до напаивания колострумом определена концентрация кортизола и ИГФ-I, пока в образчиках, взятым 32 часа после рождения телят определена концентрация ИгГ. Концентрация кортизола у телят, рождённых с более большой массой тела ($61,51 \pm 32,78$ нмол/л) была ниже ($p=0,052$), чем у телят, рождённых с более низкой массой тела ($94,89 \pm 17,74$ нмол/л). Утверждена значительная отрицательная корреляция ($r=-0,592$; $p<0,05$) между массой тела телят на рождении и концентрации кортизола. Концентрация ИГФ-I определена непосредственно после рождения у телят с более большой массой тела на рождении ($10,17 \pm 1,71$ нмол/л) была ста-

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

тистически занчително бóльше ($p<0,05$) в отношении телят, рождённых с более низкой массой тела $7,04\pm1,15$ нмол/л. Существовала значительная положительная корреляция ($r=0,519$; $p<0,10$), между массой тела телят на рождении и концентрации ИГФ-I. Тридцать два часа после рождения концентрация ИГГ в кровяном сыворотке телят, рождённых с более высокой массой тела ($18,72\pm1,99$ г/л) была значительно бóльше ($p<0,05$), чем у телят, рождённых с более низкой массой тела ($11,68\pm4,79$ г/л). Утверждена значительная положительная корреляция между массой тела телят на рождении и концентрации ИГГ, определенной тридцать и второго числа новорождённой жизни ($r=0,620$; $p<0,05$). Полученные результаты направляют на вывод, что телята массы тела бóльше 35 кг на рождении лучше адаптированы на условия внешней среды в отношении телят, рождённые с массой тела меньше 35 килограммов.

Ключевые слова: новорождённые телята, масса тела, кортизол, ИГФ-I, иммуноглобулины Г класса

**KONCENTRACIJA KORTIZOLA, INSULINU SLIČNOG
FAKTORA RASTA-I I IMUNOGLOBULINA G-KLASE U KRVI
NEONATALNE TELADI RAZLIČITE TELESNE MASE NA
ROĐENJU***

***CONCENTRATION OF CORTISOL, INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I
AND IMMUNOGLOBULIN G CLASS IN BLOOD OF NEONATAL
CALVES OF DIFFERENT BODY MASS AT BIRTH***

**Danijela Kirovski, H. Šamanc, Natalija Fratrić, D. Gvozdić, S. Hristov,
Ž. Sladojević, C. Mircu, Camelia Tulcan****

Cilj ovog rada je da se ispita da li koncentracije kortizola, insulinu-sličnog faktora rasta-I (IGF-I) i imunoglobulina klase G (IgG), odnosno parametara krvi za koje se smatra da su izuzetno značajni za postnatalni opstanak teladi, zavise od telesne mase teladi na rođenju. Ispitivanja su izvršena na 12 novorođenih teladi Holštajn-Frizijske rase, razdvojenih u dve grupe na osnovu telesne mase na rođenju. U prvu grupu (n=6) svrstana su telad čija je telesna masa bila veća od 35 kg na rođenju ($41,67 \pm 3,08$ kg), dok su u drugu grupu (n=6) svrstana telad čija je telesna masa na rođenju bila manja od 35 kg ($32,00 \pm 3,58$ kg). Neposredno pre napajanja kolostrumom, kao i 32. sata neonatalnog života, uzeti su uzorci krvi. U uzorcima krvnog seruma uzetim neposredno pre napajanja kolostrumom određivana je koncentracija kortizola i IGF-I, dok je u uzorcima uzetim 32 sata nakon rođenja teladi određivana koncentracija IgG. Koncentracija kortizola kod teladi rođene sa većom telesnom masom ($61,51 \pm 32,78$ nmol/l) je bila niža ($p = 0,052$) nego kod teladi rođenih sa nižom telesnom masom ($94,89 \pm 17,74$ nmol/l). Utvrđena je značajna negativna korelacija ($r = -0,592$; $p < 0,05$) između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije kortizola. Koncentracija IGF-I određena neposredno nakon rođenja kod te-

* Rad primljen za štampu 28. 12. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Danijela Kirovski, docent, dr sci. med. vet. Horea Šamanc, red. profesor, dr sci. med. vet. Natalija Fratrić, docent, dr sci. med. vet. Dragan Gvozdić, red. profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr sci. med. vet. Slavča Hristov, vanr. profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Ž. Sladojević, "Veterina sistem Sladojević", Gradiška, BiH, Republika Srpska; Calin Mircu, docent, Camelia Tulcan, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Temišvaru, Rumunija

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

ladi sa većom telesnom masom na rođenju ($10,17 \pm 1,71$ nmol/l) bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) u odnosu na telad rođenu sa nižom telesnom masom ($7,04 \pm 1,15$ nmol/l). Postojala je značajna pozitivna korelacija ($r = 0,519$; $p < 0,10$), između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IGF-I. Trideset dva sata nakon rođenja koncentracija IgG u krvnom serumu teladi rođene sa višom telesnom masom ($18,72 \pm 1,99$ g/l) je bila značajno viša ($p < 0,05$) nego kod teladi rođene sa nižom telesnom masom ($11,68 \pm 4,79$ g/l). Utvrđena je značajna pozitivna korelacija između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IgG određene trideset i drugog sata neonatalnog života ($r = 0,620$; $p < 0,05$). Dobijeni rezultati upućuju na zaključak da su telad telesne mase preko 35 kg na rođenju bolje adaptirane na uslove spoljašnje sredine u odnosu na telad koja su rođena sa telesnom masom manjom od 35 kilograma.

Ključne reči: novorođena telad, telesna masa, kortizol, IGF-I, imunoglobulini G klase

Uvod / Introduction

U prvim danima života teladi endokrini sistem nije potpuno razvijen i njegovo funkcionisanje je regulisano drugačijim mehanizmima u odnosu na odrasle jedinke. Naime, hormonalni status novorođenčadi je u velikoj meri uslovljen prisustvom hormona u njihovoj cirkulaciji koji potiču još iz fetalne cirkulacije, a dospeli su u nju iz krvotoka majke, ili, kasnije, su resorbovani iz digestivnog trakta a kolostralnog su porekla (Blum i sar., 1999).

Koncentracija kortizola, hormona za koji se smatra da je glavni pokazatelj stresogene reakcije, je višestruko veća kod novorođenčadi u odnosu na odrasle jedinke (Stojić i sar., 2002). Inače, poznato je da kortizol dominira u krvnoj plazmi novorođene teladi, dok se kortikosteron pojavljuje kasnije, od desetog do četrnaestog dana života (Hristov i sar., 1990; 1994). Smatra se da je ova visoka koncentracija kortizola u prvim danima života fiziološki opravdana i neophodna za opstanak novorođenčadi. Utvrđena je čvrsta veza između dužine trajanja graviditeta i koncentracije kortizola u krvnoj plazmi novorođene teladi (Richet i sar., 1987). Naime, kortizolemija je kod teladi rođenih posle optimalnog vremena trajanja graviditeta značajno viša u odnosu na kortizolemiju merenu u isto vreme kod teladi rođenih posle graviditeta koji je trajao kraće od 270 dana ili duže od 285 dana. Dalje, isti autori su utvrdili da je kod teladi koja dolaze na svet posle kraćeg trajanja graviditeta (252 do 263 dana) odgovor ćelija kore nadbubrežne žlezde na aplikaciju ACTH slabiji, nego kod teladi koja su rođena na vreme. Ovaj podatak može delimično da objasni zašto su neka telad odmah posle rođenja manje otporna i teže se prilagođavaju na različite stresogene činioce, koji mogu iznenada da deluju u najranijoj fazi njihovog života i tako budu neposredan povod za nastajanje zdravstvenih problema.

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

Pravilan razvoj somatotropne osovine u prvim danima života je od izuzetnog značaja za kasniji pravilan rast, razvoj i zdravlje teladi (Kirovski, 2002). Mehanizam funkcionisanja somatotropne osovine je, pri tome, značajno različit između novorođenih i odraslih jedinki kod svih životinjskih vrsta. Ispitivanja su pokazala da, za razliku od odraslih goveda, kod kojih aplikovanje deksametazona ima negativno dejstvo na somatotropnu osovinu, odnosno dovodi do smanjenja koncentracije insulinu-sličnog faktora rasta-I (IGF-I) (Maciel i sar., 2001), kod novorođenčadi davanje ovog sintetskog kortikosteroida stimuliše somatotropnu osovinu i izaziva porast koncentracije IGF-I u cirkulaciji (Hammon i sar., 2003; Sauter i sar., 2003).

Odbrana novorođenčadi od infektivnih bolesti je u velikoj meri uslovljena koncentracijom imunoglobulina u krvi. S obzirom da se telad rađaju u stanju fiziološke agamaglobulinemije, ovi imunoglobulini potiču iz kolostruma majke nakon njihove resorpcije iz digestivnog trakta. Za opstanak novorođenčadi je izuzetno značajano da se ovi imunoglobulini resorbju u dovoljnoj koncentraciji koja će obezbediti adekvatnu zaštitu. S obzirom na značaj imunoglobulina u zaštiti teladi od infektivnih oboljenja mnogi autori su ispitivali uticaj različitih faktora na koncentraciju IgG u krvi novorođene teladi. Na koncentraciju imunoglobulina G-klase u krvi novorođene teladi utiču vreme prvog uzimanja kolostruma, količina unetog kolostruma, koncentracija imunoglobulina u kolostrumu, kao i način napoja. Stres, rasa, sezonski faktori i vreme koje telad provede uz majku su do sada pouzdano utvrđeni faktori koji takođe mogu uticati na stepen resorpcije imunoglobulina u crevu novorođenčadi a time i na njihovu koncentraciju u krvi teladi (Stojić i sar., 2000).

Cilj ovog rada je da se ispita da li koncentracija kortizola, IGF-I i imunoglobulina klase G, odnosno parametara krvi za koje se smatra da su izuzetno značajni za postnatalni opstanak teladi, zavisi od telesne mase teladi na rođenju.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Ispitivanja su izvršena na 12 novorođenih teladi Holštajn-Frizijske rase, razdvojenih u dve grupe na osnovu telesne mase na rođenju. U prvu grupu (n=6) svrstana su telad čija je telesna masa na rođenju bila veća od 35 kg, dok su u drugu grupu (n=6) svrstana telad čija je telesna masa na rođenju bila manja od 35 kg. Neposredno pre napajanja kolostrumom, kao i 32. sata neonatalnog života, uzeti su uzorci krvi punkcijom vene jugularis. Uzorci su ostavljeni da spontano koagulišu, nakon čega su centrifugovani na 2000 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Tako dobijeni uzorci krvnog seruma zamrznuti su na -20°C do izvođenja analiza.

U uzorcima krvnog seruma uzetih neposredno pre napajanja određivana je koncentracija kortizola i IGF-I, dok je koncentracija imunoglobulina G-klase određivana u uzorcima uzetim 32 sata nakon rođenja teladi. Koncentracija kortizola i IGF-I određivana je radioimunološkom metodom uz upotrebu komerci-

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

jalnih kitova (RIA, INEP Zemun). Koncentracija IgG određivana je komercijalnim radijalnim imunodifuzionim testom (sRID, INEP Zemun).

Rezultati ispitivanja obrađeni su standardnim statističkim metodama i izračunati su srednja vrednost, standardna devijacija, standardna greška i koeficijent varijacije. Za ocenu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti primenjen je Student-ov "t – test". Step en korelacije između telesne mase teladi i ispitivanih parametara u krvnog serumu utvrđen je izračunavanjem koeficijenta korelacije (r).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

U tabeli 1 prikazana je prosečna telesna masa teladi na rođenju, koncentracija kortizola, IGF-I i IgG u krvnom serumu obe grupe teladi kao i statistička značajnost razlike ispitivanih parametara.

Tabela 1. Telesna masa teladi (kg), koncentracija kortizola (nmol/l), IGF-I (nmol/l) i IgG (g/l) u krvi neonatalne teladi /

Table 1. Body mass of calves (kg), concentrations of cortisol (nmol/l), IGF-I (nmol/l), and IgG (g/l) in blood of neonatal calves

	Telesna masa / Body mass (kg)		Koncentracija kortizola / Cortisol concentration (nmol/l)		Koncentracija IGF-I / IGF-I concentration (nmol/l)		Koncentracija IgG / IgG concentration (g/l)	
	I	II	I	II	I	II	I	II
X	41,67	32,00***	61,51	94,89 ^o	10,17	7,04*	18,72	11,68*
SD	3,08	3,58	32,78	17,74	1,71	1,15	1,99	4,79
SE	1,26	1,46	13,38	7,24	0,69	0,47	0,81	1,95
CV (%)	7,39	11,18	53,29	18,69	16,81	16,33	10,63	41,01
IV	38,0-45,0	27,0-35,0	11,22-95,16	66,83-115,19	8,36-13,2	5,01-8,1	15,1-20,5	6,4-20,7

IGF-I – insulinu sličan faktor rasta-I / *insulin-like growth factor-I*

IgG – imunoglobulini G klase / *immunoglobulin G class*

^o – p = 0,05 u odnosu na prvu grupu teladi za ispitivani parametar /

^o – p = 0,05 in comparison with first group of calves for examined parameter

* – p < 0,05 u odnosu na prvu grupu teladi za ispitivani parametar /

* – p < 0,05 in comparison with first group of calves for examined parameter

Prosečna telesna masa teladi prve grupe bila je 41,67±3,08 kg, dok je prosečna težina teladi druge grupe bila 32,00±3,58 kg. Telesna masa teladi prve grupe je bila statistički značajno veća (p<0,001) nego teladi druge grupe. Iz prikazanih podataka se zapaža da je koncentracija kortizola kod teladi rođene sa većom telesnom masom (61,51±32,78 nmol/l) niža nego kod teladi rođenih sa nižom telesnom masom (94,89±17,74 nmol/l). Ova razlika je bila na granici statističke značajnosti (p=0,052). Koncentracija kortizola kod novorođenih teladi po-

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

kazuje značajnu varijabilnost jer zavisi od izrazito velikog broja kako endogenih, tako i egzogenih faktora (Šamanc i sar., 2008). I pored toga, naši rezultati pokazuju značajan uticaj telesne mase teladi na rođenju na koncentraciju kortizola u krvnom serumu. Utvrđivanjem stepena korelacije između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije kortizola utvrđena je značajna negativna korelacija ($r = -0,592$; $p < 0,05$). Ova korelacija je u skladu sa nalazima drugih autora (Burdick i sar., 2009). Ovaj rezultat nas može navesti na zaključak da su telad manje telesne mase na rođenju izloženi delovanju stresogenih faktora nego telad veće telesne mase. Moguće je da to vremenom dovede do iscrpljivanja adrenokortikotropne osovine novorođenčadi zbog čega su telad manje telesne mase na rođenju više izložena delovanju stresogenih faktora posle rođenja (Šamanc i sar., 2008).

Koncentracija IGF-I određena neposredno nakon rođenja kod teladi sa većom telesnom masom na rođenju ($10,17 \pm 1,71$ nmol/l) bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) u odnosu na telad rođenu sa nižom telesnom masom ($7,04 \pm 1,15$ nmol/l). Ovakav rezultat je u skladu sa rezultatima drugih autora koji su ispitali povezanost telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IGF-I u krvnom serumu neonatalne teladi (Kuhne i sar., 2001; Kirovski i sar., 2002). Iz literature je poznato da su glavni faktori koji utiču na koncentraciju IGF-I u cirkulaciji koncentracija hormona rasta, koncentracija insulina, kao i količina hranljivih materija, naročito aminokiselina, koje se resorbuju iz digestivnog trakta (Ontsouka i sar., 2004). Kod novorođenčadi svih životinjskih vrsta, energetski status jedinke, odnosno količina unetih hranljivih materija je značajnija u regulaciji koncentracije IGF-I u krvi, nego hormon rasta, jer je kod njih smanjeno prisustvo receptora za hormon rasta u jetri (Breier i sar., 1986). Objašnjenje za ovu povezanost koncentracije IGF-I i energetskog statusa jedinke leži u činjenici da u svim slučajevima energetskog deficita jedinke dolazi do dekuplovanja veze između koncentracije IGF-I i koncentracije hormona rasta u krvi, a uspostavljanja jake pozitivne korelacije između koncentracije insulina i koncentracije IGF-I u krvi (Renaville i sar., 2002). Telesna masa teladi je u izrazitoj pozitivnoj korelaciji sa energetske statusom jedinki na rođenju, što je najverovatniji razlog zbog čega je koncentracija IGF-I značajno viša kod teladi sa većom telesnom masom na rođenju. Računanjem stepena korelacije između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IGF-I dobijenih kod teladi ispitivanih u ovom radu utvrđena je značajna pozitivna korelacija ($r = 0,519$; $p < 0,10$), što dodatno potvrđuje zaključak da telad sa većom telesnom masom na rođenju imaju višu koncentraciju IGF-I u krvi.

Utvrđeno je da je 32 sata nakon rođenja koncentracija IgG u krvnom serumu teladi rođene sa većom telesnom masom ($18,72 \pm 1,99$ g/l) je bila značajno viša ($p < 0,05$) nego kod teladi rođene sa nižom telesnom masom ($11,68 \pm 4,79$ g/l). Pored toga, utvrđena je značajna pozitivna korelacija između telesne mase teladi na rođenju i koncentracije IgG određene trideset i drugog sata neonatalnog života ($r = 0,620$; $p < 0,05$). Razlog za ovu korelaciju verovatno je to što su kod teladi veće telesne mase neonatalna creva razvijenija, a samim tim je veći i njihov resorptivni kapacitet prema imunoglobulinima (Stojić i sar., 1995). Insulinu

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

sličan faktor rasta-I, čija je koncentracija značajno veća kod teladi rođenih sa većom telesnom masom, ima izrazito veliki značaj u pravilnom razvoju creva u prvih nekoliko dana života (Ma i sar., 1997), a samim tim, verovatno, i na sposobnost neonatalnih creva da resorbuju IgG.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu dobijenih rezultata može da se zaključi da telad veće telesne mase na rođenju ima značajno višu koncentraciju insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase, a značajno nižu koncentraciju kortizola u krvnom serumu u odnosu na telad rođenu sa manjom telesnom masom. To ukazuje da su telad telesne mase preko 35 kg na rođenju imaju bolju mogućnost adaptacije na uslove spoljašnje sredine, koji podrazumevaju delovanje različitih stresogenih i infektivnih agenasa, u odnosu na telad koja su rođena sa telesnom masom manjom od 35 kilograma.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENTS:

Rad je finansiran sredstvima Ministarstva nauke Republike Srbije TR 20110: Razvoj i implementacija standarda dobrobiti i biosigurnosti u cilju unapređenja tehnologije proizvodnje goveda i svinja. /

This work has been financed with funds of the Republic of Serbia Ministry of Science TR 20110: Development and implementation of welfare and biosafety standards with the objective of promoting the technology of cattle and swine production.

Literatura / References

1. Blum JW, Hammon H. Endocrine and metabolic aspects in milk-fed calves. *Domest Anim Endocrinol* 1999; 17: 219-30.
2. Breier BH, Bass JJ, Butler JH, Gluckman PD. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor 1. *J Endocrinol* 1986; 111: 209-15.
3. Burdick NC, Banta JP, Neuendorff DA, White JC, Vann RC, Laurenz JC, Welsh TH Jr, Randel RD. Interrelationships among growth, endocrine, immune, and temperament variables in neonatal Brahman calves. *J Anim Sci* 2009; 87: 3202-10.
4. Hammon HM, Zbiden Y, Sauerwein H, Breier BH, Blum JW. The response of hepatic insulin-like growth factor system to growth hormone and dexamethasone in calves. *J Endocrinol* 2003; 179: 427-35.
5. Hristov S, Đurđević Đ, Grubić G, Bogdanović V, Vidić R, Bokan Lj. Koncentracija kortizola u krvnom serumu goveda. *Veterinarski glasnik* 1994; 48: 853-859.
6. Hristov S. Promena koncentracije kortizola u prvom mesecu života teladi. Zbornik radova 9-og seminara "Inovacije u stočarstvu". Beograd, Srbija, 1990: 89-98.
7. Kirovski D, Stojić V, Nikolić JA. Serum levels of insulin-like growth factor-I and total protein in newborn calves offered different amounts of colostrum. *Acta Veterinaria* 2002; 52: 285-97.
8. Kuhne S, Hammon HM, Bruckmaier RM, Morel C, Zbiden Y, Blum JW. Growth performance, metabolic and endocrine traits, and absorptive capacity in neonatal

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

- calves fed either colostrum or milk replacer at two levels. J Anim Sci 2000; 78: 609-20.
9. Ma L, Xu RJ. Oral insulinlike growth factor-I stimulates intestinal enzyme maturation in newborn rats. Life Sci 1997; 61: 51-8.
 10. Maciel CM, Chamberlain CS, Wettemann RP, Spicer LJ. Dexamethasone influences endocrine and ovarian function in dairy cattle. J Dairy Sci 2001; 84: 1998-2009.
 11. Ontsouka CE, Sauter SN, Blum JW, Hammon. Effects of colostrum feeding and dexamethasone treatment on mRNA levels of insulin-like growth factors (IGF)-I and -II, IGF binding proteins-2 and -3, and on receptors for growth hormone, IGF-, IG-II, and insulin in the gastrointestinal tract of neonatal calves. Domest Anim Endocrinol 2004; 26: 155-75.
 12. Renaville R, Hammadi M, Portetelle D. Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. Domest Anim Endocrinol 2002; 23: 351-60.
 13. Richet E, Safwate A, Davicco MJ, Dalle M, Barlet JP. Function corticosurrénalienne chez le jeune veau. Physiologie et pathologie perinatales chez les animaux de ferme 1987: 247-56.
 14. Šamanc H, Kirovski D. Adrenokortikalni sistem goveda. 1. izd. Beograd: Naučni institut za veterinarstvo, 2008.
 15. Sauter SN, Ontsouka E, Roffler B, Zbiden Y, Philipona C, Pfaffi M, Breier BH, Blum JW, Hammon HM. Effects of dexamethasone and colostrum intake on the somatotrophic axis in neonatal calves. Am J Physiol 2003; 285: E252-61.
 16. Stojić V, Nikolić JA, Huszenicza GY, Šamanc H, Gvozdić D, Kirovski D. Plasma levels of triiodothyronine, thyroxine and cortisol in newborn calves. Acta Veterinaria 2002; 52: 85-96.
 17. Stojić V, Šamanc H, Fratrić N. The effect of clinoptilolite based mineral adsorber on colostral immunoglobulin G absorption in newborn calves. Acta Veterinaria 1995; 45: 67-74.
 18. Stojić V, Stevanović J, Kirovski D. Uticaj kolostruma na imunost mladunaca domaćih sisara tokom prvih dana Veterinarski glasnik 2000; 54: 93-106.

ENGLISH

CONCENTRATION OF CORTISOL, INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I AND IMMUNOGLOBULIN G CLASS IN BLOOD OF NEONATAL CALVES OF DIFFERENT BODY MASS AT BIRTH

Danijela Kirovski, H. Šamanc, Natalija Fratrić, D. Gvozdić, S. Hristov, Ž. Sladojević, C. Mircu, Camelia Tulcan

The objective of this work was to examine whether concentrations of cortisol, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and immunoglobulin G class (IgG), in fact blood parameters which are believed to be of extreme importance in the postnatal survival of calves, are dependant on the body mass of calves at birth. Investigations were performed on 12 newborn calves of the Holstein-Friesian breed, placed into two groups on the grounds of their body mass at birth. The first group (n=6) comprised calves whose body mass was more than 35 kg at birth (41.67 ± 3.08 kg), while the second group (n=6) comprised calves whose body mass at birth was less than 35 kg (32.00 ± 3.58 kg). Blood samples were taken

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

immediately preceding the consuming of colostrum, as well as at 32 hours of neonatal life. Cortisol and IGF-I concentrations were determined in blood serum samples taken immediately before colostrum consumption, while IgG concentration was determined in the samples taken 32 hours after the birth of the calves. The cortisol concentration in calves born with a greater body mass (61.51 ± 32.78 nmol/l) was lower ($p=0.052$) than in calves born with a smaller body mass (94.89 ± 17.74 nmol/l). A significant negative correlation ($r=-0.592$; $p<0.05$) was established between the body mass of calves at birth and the cortisol concentration. The IGF-I concentration determined immediately following birth in calves with a greater body mass at birth (10.17 ± 1.71 nmol/l) was statistically significantly higher ($p<0.05$) in comparison with calves born with a smaller body mass (7.04 ± 1.15 nmol/l). There was a significant positive correlation ($r = 0.519$; $p<0.10$) between the body mass of calves at birth and the IGF-I concentration. Thirty-two hours following birth, the IgG concentration in blood serum of calves born with a bigger body mass (18.72 ± 1.99 g/l) was significantly higher ($p<0.05$) than in calves born with a smaller body mass (11.68 ± 4.79 g/l). A significant positive correlation was established between the body mass of calves at birth and the IgG concentration determined at 32 hours of neonatal life ($r = 0.620$; $p<0.05$). The obtained results point to the conclusion that calves of body mass over 35 kg at birth are better adapted to the conditions of the outer environment in comparison with calves born with a body mass of less than 35 kg.

Key words: newborn calves, body mass, cortisol, IGF-I, immunoglobulins G class

РУССКИЙ

КОНЦЕНТРАЦИЯ КОРТИЗОЛА, ИНСУЛИНУ ПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА-I И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ Г КЛАССА В КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ РАЗЛИЧНОЙ МАССЫ ТЕЛА НА РОЖЕДНИИ

Даниела Кировски, Х. Шаманц, Наталия Фратрич, Д. Гвоздич, С. Христов, Ж. Сладоевич, С. Mircu, Camelia Tulcan

Цель этой работы испытать ли концентрации кортизола, инсулину-подобного фактора роста-I (ИГФ-I) и иммуноглобулинов класса Г (ИгГ), то есть параметров крови для которых считается, что исключительно значительные для новорождённого существования телят, зависит от массы тела телят на рождении. Испытания совершены на 12 новорождённых телят Холштайн-Фризийской породы, раздвоенных в двух группах на основе массы тела на рождении. В первую группу ($n=6$) распределены телята чья масса тела была больше 35 кг ($32,00 \pm 3,58$ кг). Непосредственно до напаивания колострумом, словно и 32 часа новорождённой жизни, взяты образчики крови. В образчиках кровяного серума взятым непосредственно до напаивания колострумом определена концентрация кортизола и ИГФ-I, пока в образчиках, взятым 32 часа после рождения телят определена концентрация ИгГ. Концентрация кортизола у телят, рождённых с более большой массой тела ($61,51 \pm 32,78$ нмол/л) была ниже ($p=0,052$), чем у телят, рождённых с более низкой массой тела ($94,89 \pm 17,74$ нмол/л). Утверждена значительная отрицательная корреляция ($r=-0,592$; $p<0,05$) между массой тела телят на рождении и концентрации кортизола. Концентрация ИГФ-I определена непосредственно после рождения у телят с более большой массой тела на рождении ($10,17 \pm 1,71$ нмол/л) была ста-

Vet. glasnik 63 (5-6) 321 - 329 (2009) Danijela Kirovski i sar.: Koncentracija kortizola, insulinu sličnog faktora rasta-I i imunoglobulina G-klase u krvi neonatalne teladi...

тистически занчително бóльше ($p < 0,05$) в отношении телят, рождённых с более низкой массой тела $7,04 \pm 1,15$ нмол/л. Существовала значительная положительная корреляция ($r = 0,519$; $p < 0,10$), между массой тела телят на рождении и концентрации ИГФ-I. Тридцать два часа после рождения концентрация ИГГ в кровяном сыворотке телят, рождённых с более высокой массой тела ($18,72 \pm 1,99$ г/л) была значительно бóльше ($p < 0,05$), чем у телят, рождённых с более низкой массой тела ($11,68 \pm 4,79$ г/л). Утверждена значительная положительная корреляция между массой тела телят на рождении и концентрации ИГГ, определенной тридцать и второго числа новорождённой жизни ($r = 0,620$; $p < 0,05$). Полученные результаты направляют на вывод, что телята массы тела бóльше 35 кг на рождении лучше адаптированы на условия внешней среды в отношении телят, рождённые с массой тела меньше 35 килограммов.

Ключевые слова: новорождённые телята, масса тела, кортизол, ИГФ-I, иммуноглобулины Г класса

ORIGINALNI RAD – ORIGINAL PAPER

UDK 636.2.09:612.126:616.33

**KONCENTRACIJA KALCIJUMA I FOSFORA U KRVNOM
SERUMU KRAVA SA DISLOKACIJOM SIRIŠTA NA LEVO***
*BLOOD CALCIUM AND PHOSPHORUS CONCENTRATIONS IN COWS
WITH LEFT DISPLACED ABOMASUM*

H. Šamanc, Danijela Kirovski, Đ. Savić, Ž. Sladojević, I. Vujanac,
Simona Zarcula**

Promena položaja sirišta je jedno od najznačajnijih oboljenja organa za varenje kod visokomlečnih krava. Etiologija i patogeneza njevog nastanka ni do danas nije u potpunosti objašnjena. U radu je ispitana kalcemija i fosfatemija kod krava u antepartalnom i postpartalnom periodu i njena povezanost sa pojavom promene položaja sirišta. U ogled je bilo uključeno 30 krava u visokom graviditetu. Uzorci krvi uzeti su dve nedelje pre očekivanog partusa, kao i dve nedelje nakon teljenja. U svim uzorcima krvnog seruma (uzetim antepartalno i postpartalno) određivana je koncentracija kalcijuma i anorganskog fosfora, korišćenjem komercijalnih test paketa (Bio-Merieux). Kod 7 krava od 30 uključenih u ogled (23,33%) nakon teljenja je kliničkim pregledom ustanovljena promena položaja sirišta na levo (eksperimentalna grupa). Preostale 23 krave iz ogleda su bile klinički zdrave i predstavljale su kontrolnu grupu. Prosečna vrednost kalcemije kontrolne grupe krava u antepartalnom periodu iznosila je $2,72 \pm 0,25$ mmol/l, a fosfatemije $2,04 \pm 0,25$ mmol/l. Kod ovih krava je postpartalno ustanovljena prosečna vrednost kalcemije od $2,46 \pm 0,22$ mmol/l i fosfatemije od $1,85 \pm 0,29$ mmol/l. Prosečna antepartalna vrednost kalcemije eksperimentalne grupe krava iznosila je $2,51 \pm 0,25$ mmol/l, a fosfatemije $1,73 \pm 0,22$ mmol/l. Postpartalno su prosečne vrednosti kalcemije i fosfatemije ove grupe krava iznosile $2,13 \pm 0,31$ mmol/l i $1,43 \pm 0,24$ mmol/l. Razlike između vrednosti za koncentraciju kalcijuma i fosfora dobijene postpartalno između eksperimentalne i kontrolne grupe su bile statistički značajne.

Cljučne reči: krava, dislokacija sirišta, fosfatemija, kalcemija

* Rad primljen za štampu 19. 10. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Horea Šamanc, red. profesor; dr sci. med. vet. Danijela Kirovski, docent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Đorđe Savić, doktorant, Poljoprivredni fakultet, Banja Luka, BiH, R. Srpska; Željko Sladojević, doktorant, "Veterina sistem Sladojević" d.o.o., Gradiška, BiH, Republika Srpska; mr sci. vet. med. Ivan Vujanac, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Simona Zarcula, doktorant, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Temišvaru, Rumunija

Vet. glasnik 63 (5-6) 331 - 340 (2009) H. Šamanc i sar.: Koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu krava sa dislokacijom sirišta na levo

Uvod / Introduction

Zajedno sa ketozom, dislokacija sirišta predstavlja jedan od značajnijih poremećaja zdravlja visokomlečnih krava. Njena pojava je najčešća u prvih 30 dana postpartalno (Van Winden i Kuiper, 2003; Le Blanc i sar., 2005; Van Winden i sar., 2003; Zadnik, 2003; Šamanc i Damnjanović, 1994). Bolest se prvenstveno pojavljuje kod krava holštajn rase, zatim istočnofrizijske, dok se kod ostalih rasa pojavljuje sporadično. Etiologija i patogeneza dislokacije sirišta nisu ni do danas u potpunosti razjašnjeni.

Uticaj postpartalne hipokalcemije na pojavu dislokacije sirišta ogleda se u dodatnom smanjenju motiliteta glatke muskulature predželudaca i sirišta, pored onog koje nastaje usled smanjene punjenosti (Šamanc i Damnjanović, 1994; Van Winden i Kuiper, 2003; Le Blanc i sar. 2005; Van Winden i sar. 2003; Zadnik 2003). Kao što je poznato, kalcijum učestvuje u prenosu nadražaja sa nervnog na mišićno tkivo, te njegov nedostatak dovodi do poremećaja u razdražljivosti mišićnog tkiva (Van Winden i Kuiper, 2003; Stojić, 2007).

Stepen hipokalcemije koji dovodi do klinički manifestnih simptoma puerperalne pareze svakako će dovesti i do poremećaja u motilitetu celog digestivnog trakta, pa tako i sirišta. Massey i sar. (1993) su u svom istraživanju postavili hipotezu da subklinička hipokalcemija na dan teljenja predstavlja faktor rizika za kasniju pojavu dislokacije sirišta. Kasnija istraživanja (Oetzel i sar., 1996; Melen-dez i sar., 2003) nisu ustanovila smanjenje učestalosti dislokacije sirišta nakon do-davanja kalcijuma u hranu kravama u peripartalnom periodu. Uprkos tome što smanjen unos hrane (koji za posledicu ima smanjenu punjenost buraga) i hipokal-cemija (koja za posledicu ima hipomotilitet sirišta) izgledaju logično kao faktori rizika za pojavu dislokacije sirišta, nema dovoljno dokaza koji bi podržali takve hi-poteze.

Razmatrajući istraživanja koja ukazuju na povezanost klinički ispolje-ne puerperalne pareze (Gröhn i sar., 1989; Correa i sar., 1993; Rohrbach i sar., 1999) i subkliničke hipokalcemije (Massey i sar., 1993) sa učestalošću pojave dis-lokacije sirišta, Le Blanc i saradnici (2005) smatraju da ne postoji direktna pove-zanost između nivoa kalcijuma u krvi i pojave dislokacije sirišta. U prilog tome, oni navode da u istraživanju koje je sproveo Massey (1993) osim kalcemije nisu praćeni drugi metabolički parametri. Prema ovim autorima, hipokalcemija koju su Massey i ostali istraživači ustanovili predstavlja znak nedovoljnog peripartalnog unosa hrane, koji za posledicu ima druge faktore direktnog rizika za nastanak dis-lokacije sirišta.

Zajedno sa hipokalcemijom, postpartalno dolazi i do razvoja hipofos-fatemije. Pojačano izlučivanje fosfata preko bubrega, kao i putem mleka ima za posledicu nastanak hipofosfatemije, međutim sve više prevladava gledište da kod krava hipofosfatemija nastaje kao posledica nedovoljne konzumacije hrane pa samim tim i fosfora. Pošto se dislokacija sirišta najčešće pojavljuje u ranoj fazi laktacije kada krave inače konzumiraju manje hrane, može se očekivati da kod

Vet. glasnik 63 (5-6) 331 - 340 (2009) H. Šamanc i sar.: Koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu krava sa dislokacijom sirišta na levo

krava obolelih od dislokacije sirišta nastaje izraženija hipofosfatemija (Šamanc i Damnjanović, 1994).

Imajući u vidu da uloga hipokalcemije u etiologiji i patogenezi promene položaja sirišta kod krava nije u potpunosti rasvetljena, istraživanja u ovom radu su usmerena na ispitivanje kalcemije i fosfatemije u peripartalnom periodu i njihove povezanosti sa nastajanjem ove bolesti.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Istraživanje je obavljeno na farmi goveda holštajn rase sa oko 1000 krava i prosečnom proizvodnjom mleka od 7340 litara. Promena položaja sirišta je kliničkim pregledom ustanovljena kod 17 % krava. Pri tome je utvrđeno da se ova bolest češće javljala kod krava koje su imale veći broj laktacija i koje imaju veću proizvodnju mleka. Od ukupnog broja dijagnostikovanih slučajeva dislokacije, 18,9 % ih je ustanovljeno kod prvotelkinja, dok je preostalih 81,1% slučajeva bilo utvrđeno kod krava sa dve i više laktacija. Učestalost pojave bolesti u odnosu na starosnu strukturu svih krava u populaciji je bila najveća od druge do pete laktacije.

U ogled je bilo uključeno 30 krava u visokom graviditetu. Odmah nakon uvođenja u porodilište praćeno je njihovo zdravstveno stanje i vršen redovan pregled sirišta kako bi se isključila mogućnost dislokacije. Dve nedelje pre očekivanog partusa, od svih životinja su uzeti uzorci krvi, punkcijom *v. jugularis*. Nakon spontane koagulacije i odvajanja krvnog seruma, uzorci su centrifugirani, a dobijeni krvni serum je odložen u zamrzivač do izvođenja analiza. Od istih životinja su, dve nedelje posle teljenja, na isti način ponovo uzeti uzorci krvi.

U svim uzorcima krvnog seruma (uzetim antepartalno i postpartalno) određivana je koncentracija kalcijuma i anorganskog fosfora, korišćenjem komercijalnih test paketa (Bio-Merieux).

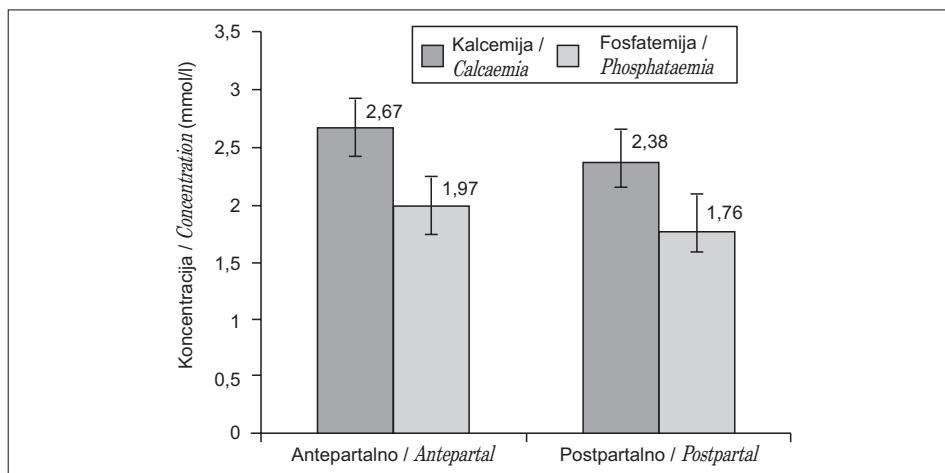
Od 30 krava uključenih u ogled kod 7 krava (23,33%) je nakon teljenja kliničkim pregledom ustanovljena promena položaja sirišta na levo. Krave sa utvrđenom dislokacijom predstavljale su eksperimentalnu grupu. Preostale 23 krave iz ogleda su bile klinički zdrave, grupisane su i predstavljale su kontrolnu grupu. Ovakva podela krava uzeta je u obzir i pri analizi rezultata dobijenih antepartalno, što znači da su krave kod kojih se postpartalno javila dislokacija svrstane u eksperimentalnu grupu, a one koje su postpartalno ostale zdrave u kontrolnu grupu.

Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički, korišćenjem osnovnih parametara deskriptivne statistike. Stepenn značajnosti razlika u srednjim vrednostima procenjen je studentovim t-testom za stepen pouzdanosti od 95, odnosno 99 %.

Vet. glasnik 63 (5-6) 331 - 340 (2009) H. Šamanc i sar.: Koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu krava sa dislokacijom sirišta na levo

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Rezultati istraživanja prvo su obrađeni za ukupan broj krava (n=30) i prikazani su u grafikonu 1.



Grafikon 1. Koncentracija kalcijuma i fosfora prikazana zbirno za sve krave (bez podele po grupama)

Graph 1. Concentrations of calcium and phosphorus presented jointly for all cows (without division into groups)

Iz prikazanih rezultata se zapaža da su se vrednosti za koncentraciju kalcijuma i anorganskog fosfora u krvnom serumu ispitivanih krava antepartalno nalazile u granicama fizioloških vrednosti (za kalcijum $X = 2,67 \pm 0,26$ mmol/l, odnosno za fosfor $X = 1,97 \pm 0,27$ mmol/l). Pojedinačni rezultati su pokazali da u ovom periodu ni kod jedne krave nisu ustanovljene vrednosti za kalcemiju ispod fiziološke vrednosti, dok je kod 3 životinje (10%) ustanovljena hipofosfatemija.

U postpartalnom periodu prosečna vrednost za koncentraciju kalcijuma kod svih ispitivanih životinja je bila u okviru fizioloških granica ($2,38 \pm 0,28$ mmol/l), dok je koncentracija anorganskog fosfora bila blizu donje fiziološke granice ($1,76 \pm 0,33$ mmol/l). U ovom periodu hipokalcemija je ustanovljena kod 2 krave (6,66%), a hipofosfatemija kod 10 krava (33,33%).

U periodu do 15 dana posle teljenja, dislokacija sirišta je ustanovljena kod 7 od 30 posmatranih životinja (23,33%). Antepartalno je prosečna vrednost kalcemije bila značajno veća kod krava koje postpartalno nisu obolele, u odnosu na krave kod kojih je posle teljenja dijagnostikovana dislokacija sirišta ($p < 0,05$). Međutim, u oba slučaja dobijene vrednosti su bile unutar fizioloških granica. Postpartalno je kod obe grupe krava utvrđena značajno niža vrednost kalcemije u odnosu na vrednost dobijenu antepartalno ($p < 0,001$ za obe grupe pojedinačno), pri čemu je kod obe grupe životinja vrednost kalcemije postpartalno bila na donjoj

Vet. glasnik 63 (5-6) 331 - 340 (2009) H. Šamanc i sar.: Koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu krava sa dislokacijom sirišta na levo

fiziološkoj granici ($2,46 \pm 0,22$ mmol/l kod klinički zdravih krava i $2,13 \pm 0,31$ mmol/l kod obolelih). Kod svega 2 krave sa dislokacijom sirišta (28,57%) je ustanovljena hipokalcemija.

Koncentracija anorganskog fosfora je u antepartalnom periodu takođe bila unutar fizioloških granica, s tim da je kod onih krava kod kojih je posle teljenja ustanovljena dislokacija sirišta prosečna vrednost fosfatemije bila na donjoj granici, a kod 3 krave (42,2 %) je ustanovljena vrednost fosfatemije ispod donje fiziološke granice. U postpartalnom periodu je kod zdravih krava ustanovljena niža vrednost fosfatemije u odnosu na antepartalnu vrednost ($p < 0,05$), ali je ta vrednost i dalje bila unutar fizioloških granica. Kod obolelih životinja je ustanovljena hipofosfatemija, pri čemu je pregledom pojedinačnih rezultata utvrđeno da je kod 4 krave (57,14%) ona bila značajno niža od fiziološke i kretala se od 1,19 do 1,32 mmol/l.

Kao što se može zapaziti, utvrđene prosečne vrednosti za kalcemiju i fosfatemiju su kod zdravih životinja bile u granicama fizioloških vrednosti, dok je hipofosfatemija ustanovljena samo kod krava sa dislokacijom sirišta. Ovi podaci su u saglasnosti i sa navodima drugih autora (Van Winden i Kuiper, 2003; Le Blanc i sar., 2005; Van Winden i sar., 2003; Zadnik, 2003; Šamanc i Damnjanović, 1994).

Rezultati dobijeni za koncentraciju kalcijuma i fosfora antepartalno i postpartalno kod eksperimentalne i kontrolne grupe krava prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Vrednosti kalcemije i fosfatemije eksperimentalne i kontrolne grupe krava /
Table 1. Calcaemia and phosphataemia values in experimental and control group of cows

	Antepartalno / <i>Antepartal</i>				Postpartalno / <i>Postpartal</i>			
	Kontrolna grupa / <i>Control group</i>		Eksperimentalna grupa / <i>Experimental group</i>		Kontrolna grupa / <i>Control group</i>		Eksperimentalna grupa / <i>Experimental group</i>	
	Ca (mmol/l)	P (mmol/l)	Ca (mmol/l)	P (mmol/l)	Ca (mmol/l)	P (mmol/l)	Ca (mmol/l)	P (mmol/l)
n	23	23	7	7	23	23	7	7
X	2,72 ^{aaa}	2,04 ^{**a}	2,51 ^{aaa}	1,73 ^a	2,46 ^{**}	1,85 ^{**}	2,13	1,43
SD	0,25	0,25	0,25	0,22	0,22	0,29	0,31	0,24
SE	0,05	0,05	0,09	0,08	0,05	0,06	0,12	0,09
CV	9,32	12,09	10,09	12,90	8,97	15,73	14,75	17,11
IV	2,28-3,18	1,68-2,71	2,16-2,88	1,44-1,99	2,08-2,98	1,26-2,36	1,61-2,48	1,19-1,79

^{**} $p < 0,01$ u odnosu na vrednost dobijenu kod druge grupe krava u istom terminu uzorkovanja /

$p < 0,01$ in comparison with value obtained for second group of cows at same time of sampling

^a $p < 0,05$ u odnosu na vrednost dobijenu kod iste grupe krava u drugom terminu uzorkovanja /

$p < 0,05$ in comparison with value obtained for same group of cows at second time of sampling

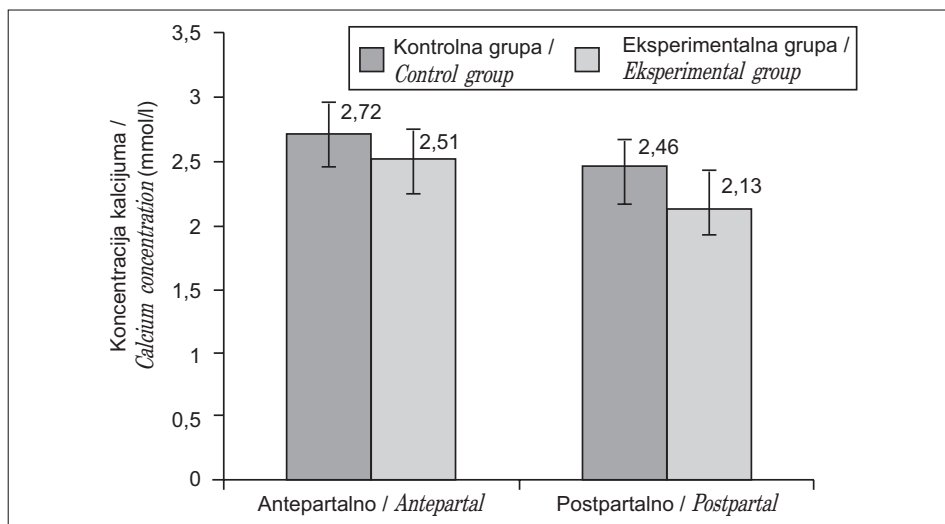
^{aaa} $p < 0,001$ u odnosu na vrednost dobijenu kod iste grupe krava u drugom terminu uzorkovanja /
 $p < 0,001$ in comparison with value obtained for same group of cows at second time of sampling

Vet. glasnik 63 (5-6) 331 - 340 (2009) H. Šamanc i sar.: Koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu krava sa dislokacijom sirišta na levo

Iz podataka tabele 1. može se uočiti da je prosečna vrednost kalcemije kontrolne grupe krava u antepartalnom periodu iznosila $2,72 \pm 0,25$ mmol/l, a fosfatemije $2,04 \pm 0,25$ mmol/l. Kod ovih krava je postpartalno ustanovljena prosečna vrednost kalcemije od $2,46 \pm 0,22$ mmol/l i fosfatemije od $1,85 \pm 0,29$ mmol/l. Prosečna antepartalna vrednost kalcemije eksperimentalne grupe krava iznosila je $2,51 \pm 0,25$ mmol/l, a fosfatemije $1,73 \pm 0,22$ mmol/l. Postpartalno su prosečne vrednosti kalcemije i fosfatemije ove grupe krava iznosile $2,13 \pm 0,31$ mmol/l i $1,43 \pm 0,24$ mmol/l.

Studentovim t-testom je utvrđena značajna razlika u koncentraciji kalcijuma antepartalno između krava koje su postpartalno ostale zdrave i one kod kojih se javila dislokacija ($p < 0,05$). Antepartalno, utvrđena je značajna razlika između ove dve grupe krava i u koncentraciji fosfora ($p < 0,01$). Isto tako, značajne razlike su utvrđene u koncentraciji kalcijuma i fosfora postpartalno, između zdravih i krava koje su obolele od dislokacije ($p < 0,01$ i za kalcijum i za fosfor).

Radi bolje preglednosti, rezultati su dati i pomoću histograma. Koncentracija kalcijuma prikazana je na grafikonu 2.



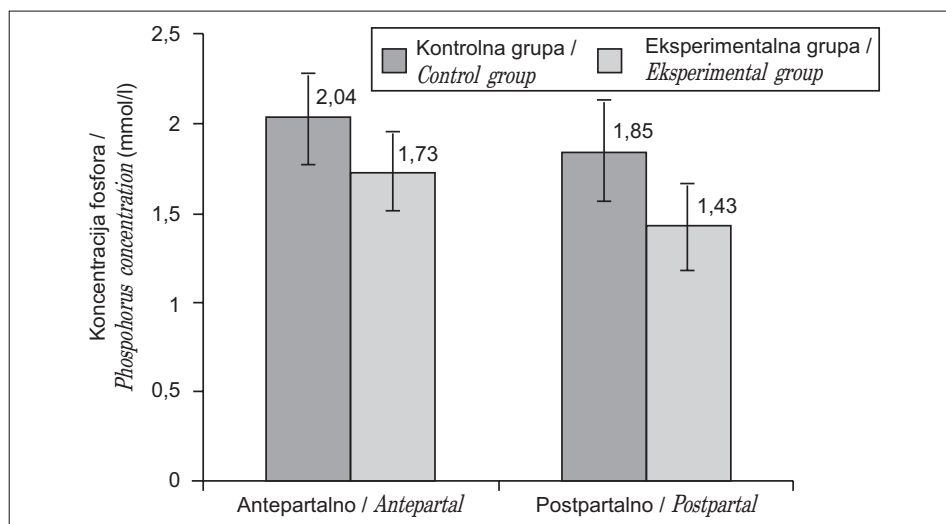
Grafikon 2. Koncentracija kalcijuma u krvnom serumu ispitivanih krava /
Graph 2. Calcium concentration in blood serum of examined cows

Koncentracija fosfora u krvnom serumu krava uključenih u ogled prikazana na grafikonu 3.

Razmatrajući moguću ulogu hipokalcemije u patogenezi dislokacije sirišta, treba navesti da samo izražena hipokalcemija dovodi do smanjenja kontraktilnosti glatke muskulature sirišta, odnosno atonije i meteorizma. Tako se u literaturi navodi da se, kada je koncentracija kalcijuma u krvnoj plazmi $1,25$ mmol/l,

Vet. glasnik 63 (5-6) 331 - 340 (2009) H. Šamanc i sar.: Koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu krava sa dislokacijom sirišta na levo

motilitet sirišta smanjuje za 70%, a jačina kontrakcija za 50%. Ukoliko je kalcemija 1,87 mmol/l motilitet se smanjuje za 30%, a jačina kontrakcija za 25%. Atonija sirišta koja se razvija u ovakvim uslovima može da bude jedan od razloga dislokacije na levu stranu abdominalne duplje (Van Winden i sar., 2003).



Grafikon 3. Koncentracija fosfora u krvnom serumu ispitivanih krava /
Graph 3. Phosphorus concentration in blood serum of examined cows

Rezultati našeg ispitivanja su pokazali da su vrednosti kalcemije kod obolelih životinja u fiziološkim okvirima, a samo kod jedne od ispitivanih krava (14,28%) je ustanovljena hipokalcemija (1,69 mmol/l).

Imajući u vidu da kod puerperalne pareze hipokalcemija dovodi do poremećaja u motilitetu organa za varenje, pa tako i sirišta, može se pretpostaviti da se u ovakvim slučajevima kao komplikacija može pojaviti i promena položaja sirišta. Međutim, ova pretpostavka do danas nije potvrđena. Massey i sar. (1993) navode da subklinička hipokalcemija na dan teljenja predstavlja faktor rizika za kasniju pojavu dislokacije sirišta. Međutim, nalazi Melendeza i sar. (2003), koji su utvrdili da dodavanje kalcijuma u hranu tokom peripartalnog perioda ne smanjuje učestalost dislokacije sirišta kod krava posle teljenja, ukazuju na suprotan zaključak. Prema tome, hipokalcemija koja se kod pojedinih životinja pojavljuje neposredno posle partusa i najčešće traje nekoliko dana, teško može da se dovede u neposrednu vezu sa etiologijom nastanka dislokacije sirišta, pogotovo što ovo oboljenje nastaje i u kasnijem periodu kada se kalcemija kod životinja vraća u opseg fizioloških vrednosti. S obzirom na udruženost snižene koncentracija kalcijuma i fosfora, može se pretpostaviti da životinje kod kojih je postpartalno ustanovljena dislokacija još u visokom graviditetu ne unose dovoljne količine

Vet. glasnik 63 (5-6) 331 - 340 (2009) H. Šamanc i sar.: Koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu krava sa dislokacijom sirišta na levo

hrane, odnosno imaju smanjen apetit. Kao što je poznato, koncentracija anorganskog fosfora u krvi životinja prvenstveno zavisi od snabdevanja iz alimentarnih izvora, tako da je hipofosfatemija utvrđena postpartalno kod životinja obolelih od dislokacije očekivana zbog smanjene snabdevenosti iz digestivnog trakta. Međutim, to ukazuje na još jedan veoma važan činilac u etiologiji nastanka dislokacije sirišta. Ako pojedine životinje u poslednjoj fazi graviditeta ne uzimaju dovoljne količine hrane to znači da je kod njih nedovoljna ispunjenost buraga, pa samim tim je stvorena mogućnost da se sirište lakše dislocira posle teljenja između zida buraga i torakoabodimalnog zida.

Zaključak / Conclusion

Rezultati prikazani u ovom radu jasno ukazuju na činjenicu da kod životinja kod kojih je postpartalno ustanovljena dislokacija sirišta postoje značajna odstupanja u vrednostima kalcemije i fosfatemije u odnosu na zdrave krave, kako tokom antepartalnog tako i postpartalnog perioda.

Iako su vrednosti kalcemije kod obolelih krava niže u odnosu na zdrave, odsustvo hipokalcemije kod krava sa dislokacijom sirišta navodi na zaključak da koncentracija kalcijuma nije uvek predisponirajući činilac za nastajanje dislokacije sirišta. Međutim, ne sme se izgubiti iz vida činjenica da su kod životinja kod kojih je postpartalno dijagnostikovana promena položaja sirišta, antepartalno utvrđene značajno niže vrednosti kalcemije nego kod preostalih životinja koje postpartalno nisu obolele.

Nalaz snižene antepartalne koncentracije kalcijuma i fosfora u krvi krava koje su postpartalno obolele od dislokacije sirišta, ukazuje na to da te krave i antepartalno unose manje hrane, što verovatno dovodi do niza promena u organizmu značajnih u etiologiji nastanka ove bolesti, od kojih se posebno izdvaja ispunjenost buraga sadržajem.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENTS:

Rad je delom finansiran sredstvima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije TR 20016: "Razvoj i primena proizvoda na bazi mineralnih sirovina u proizvodnji bezbedne hrane".

Literatura / References

1. Adamović M, Grubić G, Šamanc H, Vujanac I. Mogućnosti preveniranja hipokalcemije krava u ranom puerperijumu, Zbornik radova 5. savetovanja "Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda", Banja Kanjiža, 2007.
2. Correa MT, Erb H, Scarlett J. Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. J Dairy Sci 1993; 76: 1305-12.
3. Geishauser T, Leslie K, Duffield T, Sandals D, Edge V. The association between selected metabolic parameters and left abomasal displacement in dairy cows. Zentralbl Veterinärmed A 1998; 45: 499-511.

Vet. glasnik 63 (5-6) 331 - 340 (2009) H. Šamanc i sar.: Koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu krava sa dislokacijom sirišta na levo

4. Gröhn YT, Erb HN, McCullough CE, Saloniemi HS. Epidemiology of metabolic disorders in dairy cattle: Association among host characteristics, disease and production. *J Dairy Sci* 1989; 72: 1876-85.
5. Horvat J, Katić V, Šamanc H, Kirovski D. Zdravstveni poremećaji visokomlečnih krava u ranoj fazi laktacije i uticaj na higijensku ispravnost sirovog mleka. VSI Subotica, 2007.
6. LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2005; 88: 159-70.
7. Massey CD, Wang C, Donovan GA, Beede DK. Hypocalcemia at parturition as a risk factor for left displacement of the abomasum in dairy cows. *J Am Vet Assoc* 1993; 203: 852-3.
8. Melendez P, Risco CA, Donovan GA, Littell R, Goff JP. Effect of calcium-energy supplements on calving-related disorders, fertility and milk yield during the transition period in cows fed anionic salts. *Theriogenology* 2003; 60: 843-54.
9. Oetzel G. Effect of calcium chloride gel treatment in dairy cows on incidence of periparturient diseases. *JAVMA* 1996; 209: 958-61.
10. Puscas I, Coltau M, Baican M, Domuta G, Hecht A. Calcium, carbonic anhydrase and gastric acid secretion. *Physiol Res* 2001; 50: 349-64.
11. Rohrbach BW, Cannedy AL, Freeman K, Slenning BD. Risk factors for abomasal displacement in dairy cows. *JAVMA* 1999; 214: 1660-3.
12. Šamanc H, Damnjanović Z. Bolesti sirišta. VKS, Beograd, 1994.
13. Stamatović S, Jovanović M. Bolesti papkara I – Bolesti goveda, Veterinarski fakultet, Beograd, 1991.
14. Stojić V. Veterinarska fiziologija. Naučna KMD, Beograd, 2007.
15. Van Winden SCL, Jorritsma R, Müller KE, Noordhuizen JPTM. Feed intake, milk yield and metabolic parameters prior to left displaced abomasum in dairy cows. *J Dairy Sci* 2003; 86: 1465-71.
16. Van Winden SCL, Kuiper R. Left displacement of the abomasum in dairy cattle: recent developments in epidemiological and etiological aspects. *Vet Res* 2003; 34: 47-56.
17. Zadnik T. A comparative study of the hemato-biochemical parameters between clinically healthy cows and cows with displacement of abomasum. *Acta Veterinaria (Beograd)* 2003; 53(5-6): 297-309.

ENGLISH

BLOOD CALCIUM AND PHOSPHORUS CONCENTRATIONS IN COWS WITH LEFT DISPLACED ABOMASUM

H. Šamanc, Danijela Kirovski, Dj. Savić, Z. Sladojević, I. Vujanac, Simona Zarcula

Abomasal displacement is one of the most important disorders of the digestive tract in high-yield dairy cows. The etiology and pathogenesis of its occurrence has not been fully clarified to this day. The work examines calcaemia and phosphataemia in cows during the antepartal and postpartal periods and their connection with the incidence of abomasal displacement. The experiment covered 30 cows in advanced stages of gravidity. Blood samples were taken two weeks before expected parturition and two weeks after cal-

Vet. glasnik 63 (5-6) 331 - 340 (2009) H. Šamanc i sar.: Koncentracija kalcijuma i fosfora u krvnom serumu krava sa dislokacijom sirišta na levo

ving. In all blood samples (taken antepartal and postpartal), concentrations of calcium and anorganic phosphorus were determined using a commercial test package (Bio-Merieux). Following parturition, left displacement of the abomasum was established in seven (23.33 %) of the 30 cows covered by the experiment (experimental group). The remaining 23 cows in the experiment were clinically healthy, they were placed in a group and represented control animals. The average value of calcaemia for the control group of cows during the antepartal period was 2.72 ± 0.25 mmol/l, and of phosphataemia 2.04 ± 0.25 mmol/l. In the same cows postpartum, average calcaemia values were 2.46 ± 0.22 mmol/l and phosphataemia 1.85 ± 0.29 mmol/l. The average antepartal value for calcaemia in the experimental group of cows was 2.51 ± 0.25 mmol/l, and for phosphataemia 1.73 ± 0.22 mmol/l. The average values for this group of cows postpartally was 2.13 ± 0.31 mmol/l for calcaemia and 1.43 ± 0.24 mmol/l for phosphataemia. The differences between the concentration values for calcium and phosphorus obtained postpartally between the experimental and control groups were statistically significant.

Key words: cow, abomasal displacement, phosphataemia, calcaemia

РУССКИЙ

КОНЦЕНТРАЦИЯ КАЛЬЦИЯ И ФОСФОРА В КРОВЯНОМ СЕРУМЕ КОРОВ С ДИСЛОКАЦИЕЙ СЫЧУГА ВЛЕВО

Х. Шаманц, Даниела Кировски, Дж. Савич, Ж. Сладоевич, И. Вујанац,
Simona Zarcula

Изменение положения сычуга одно из самых значительных заболеваний пищеварительных органов у высокопродуктивных коров. Этиология и патогенез его становления ни до сих пор не полностью объяснены. В работе испытана кальцемиа и фосфатемиа у коров в дородовом и послеродовом периодах и её связь с явлением изменения положения сычуга. В опыт было включено 30 коров в высокой беременности. Образчики крови взяты две недели до ожидающих родов, словно и две недели после теляния. Во всех образчиках кровяного серума (взятым дородово и послеродово) определена концентрация кальция и неорганического фосфора, использованием коммерческих тест пакетов (Био-Мериеукс). У 7 коров из 30, включенных в опыт (23,33 %) после теляния клиническим осмотром установлено изменение положения сычуга влево (экспериментальная группа). Остаточные 23 коровы из опыта были клинически здоровыми, группированные и представляли собой контрольную группу. Средняя стоимость кальцемии контрольной группы коров в дородовом периоде составляла $2,72 \pm 0,25$ ммол/л, а фосфатемии $2,04 \pm 0,25$ ммол/л. У этих коров послеродово установлена средняя стоимость кальцемии от $2,46 \pm 0,22$ ммол/л и фосфатемии от $1,85 \pm 0,29$ ммол/л. Средняя дородовая стоимость кальцемии экспериментальной группы коров составляла $2,51 \pm 0,25$ ммол/л, а фосфатемии $1,73 \pm 0,22$ ммол/л. Послеродово средние стоимости кальцемии и фосфатемии этой группы коров составляли $2,13 \pm 0,31$ ммол/л и $1,43 \pm 0,24$ ммол/л. Разницы между стоимостями для концентрации кальция и фосфора, полученные послеродово среди экспериментальной и контрольной группами были статистически значительными.

Ключевые слова: корова, дислокация сычуга, фосфатемиа, кальцемиа

**CHROMOSOMAL DAMAGE AND MITOTIC INDEX IN
BOSNIAN AND HERZEGOVINIAN MOUNTAIN HORSE
LYMPHOCYTES FOLLOWING LOW DOSAGE X - RAY
IRRADIATION *IN VITRO****

***HROMOZOMSKA OŠTEĆENJA I PROMJENE MITOTSKOG INDEKSA U
LIMFOCITIMA BOSANSKOHERCEGOVAČKOG BRDSKOG KONJA
NAKON IN VITRO OZRAČIVANJA NISKIM DOZAMA X ZRAKA***

Dunja Rukavina, Danica Hasanbašić, E. Suljkanović, Amela Katica**

In this study we investigated the influence of low dosage X - ray irradiation on the incidence of chromosomal damage and changes in mitotic index (MI) in cultured peripheral lymphocytes of the Bosnian and Herzegovinian mountain horse following in vitro irradiation. X-ray irradiation induced a dose-dependent decrease in MI but only the dose of 0.5 Gy induced a significant decrease ($p < 0.05$) in comparison with the control and other dose groups. The analysis of chromosomal damage revealed a clear dose-dependent increase in the incidence of chromosomal damage per metaphase. Significant differences ($p < 0.05$) were detected by analysis of variance and the LSD test confirmed significant differences between cells that received 0.2 Gy and 0.5 Gy when compared to the control cells and cells that received 0.1 Gy. However, Scheeffes' test assigned significance only to the differences established between the cells that received 0.5 Gy and the other groups of lymphocytes.

Key words: chromosomal damage, cytogenetic dosimetry, horse, ionizing irradiation

* Rad primljen za štampu 21. 09. 2009. godine

** Mr Dunja Rukavina, viši asistent, dr sci. med. vet. Danica Hasanbašić, redovni profesor, Katedra za biologiju, Veterinarski fakultet, Sarajevo, Bosna i Hercegovina; Edin Suljkanović, dr vet. med., Veterinarska stanica, Srebrenik, Bosna i Hercegovina; dr sci. med. vet. Amela Katica, docent, Katedra za histologiju sa embriologijom, Veterinarski fakultet, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

Introduction / Uvod

Numerous factors may induce chromosomal damages and X-rays are a potent mutagen and carcinogen, which was observed shortly after their discovery. Numerous studies on individuals that were occupationally, therapeutically or accidentally exposed to X-rays, as well as *in vitro* experiments, confirmed genomic instability as a possible outcome of this type of irradiation (Krishnaja and Sharma, 2004; Balcer and Harrison, 1988).

The sensitivity of the DNA molecule to genotoxic agents makes each biological individual a potential dosimeter of an agent's biological effects. DNA molecules are the target of ionizing irradiation and their damages are indubitably involved in the process of malignant transformation induced by irradiation. Considering that the DNA molecule is a vital chromosome constituent, the analysis of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes (or bone marrow cells) is an acknowledged basis of cytogenetic dosimetry. Chromosomal mutagen effects are of particular interest as they can be observed at the level of the cell. Proportional relation among the number of mutations, the applied dosage and the ability of the smallest dosages to induce mutations are well established (Emery, 1986).

Lymphocytes that continuously migrate between the bloodstream and extra cellular matrix may represent "circulating dosimeters" (IAEA, 1986). Following *in vitro* irradiation of lymphocytes a pronounced decrease in response to mitogenic stimulus of phytohaemagglutinine occurs (Barel and Blomgren, 1976; Barel *et al.*, 1977). The higher the dosage – the lower the ability of lymphocytes to undergo blast transformation and commence mitosis (Gantenberg *et al.*, 1991).

The capacity of ionizing irradiation to induce chromosomal damage has been confirmed in numerous studies (daCruz *et al.*, 1994; Kaplan and Morgan, 1998; Lambert *et al.*, 1998; He *et al.*, 2000; Thierens *et al.*, 2000; Boyle *et al.*, 2002). Genetic changes caused by ionizing irradiation may be passed along next cell generations. The main issue in studies of damages induced by irradiation is determination of the dosage of the absorbed energy, which may enable the assessment and prognosis of the outcome of potential irradiation disease.

Our study was aimed at examining the correlation between the irradiation dosage and the number of chromosomal aberrations as well as alteration of mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following *in vitro* irradiation with a low dosage of X-rays.

Materials and methods / Materijal i metode rada

A total of eight Bosnian and Herzegovinian mountain horses of both sexes (5 males and three females) and different age, were used in this study. Horse blood was sampled by vein-puncture from the jugular vein into sterile vacuum tubes containing heparin. Tubes were irradiated using therapeutical Tele-

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

cobalt apparatus, Tehatron 780. The blood was irradiated in vacuum tubes wrapped in a 0.5 cm thick layer of cotton. Irradiation field size was 15 x 15 CM at a distance of 80 cm. Blood samples were treated with individual dosages of 0.1, 0.2 and 0.5 Gy. The applied method of peripheral blood lymphocytes cultivation, recommended by IAEA (2001) was slightly modified to suit the conditions in our laboratory.

Sterile vials were filled with 7 ml of nutrient medium (RPMI 1640 or MEM), 2 ml of foetal calf serum, 0.2 ml of phytohaemagglutinine (PHA) and 0.8 ml of blood. Samples were prepared in duplicate for each animal and dosage. Lymphocytes were cultivated at 38°C for 48 hours. Following 45 hours of cultivation all samples were supplemented with 0.2 ml of 0.05% colchicine. Over the following three hours, all dividing cells were arrested in metaphase. Three hours following colchicine treatment (48 hours after beginning of cultivation), all cultures were transferred into tubes and spinned at 1000 rpm for 10 minutes. Supernatant was discarded and sediment mixed with fresh hypotonic solution 0.075 M KCl.

Treatment with hypotonic solution lasted for 20 minutes at 38°C. This treatment increases cell volume and improves chromosome distribution. Warm hypotonic solution improves efficiency by increasing the rate of transmembrane water transport and membrane softening, which promotes its expansiveness.

Following this procedure, the cell suspension was spinned again. Thereafter, fixing solution was added to the sediment. Fixing solution contains ethanol and glacial acetic acid in 3:1 ratio and is used precooled at +4°C. During fixation, excess water is removed from cells and they were fixed. Cold fixing solution improves chromosome outlines. Repetitive sequential washes in fixing solution with centrifugation (10 minutes at 1000 rpm) result in white sediment (cell suspension). Finally, 0.5 ml of fixing solution was added onto white sediment and thoroughly mixed with a pipette. Suspension is dripped on slightly slanted chilled slides (-20°C) from an elevated position. Slides were dried at room temperature and stained with 5% Giemsa for 10 minutes. The stained slides were washed with running water and with distilled water afterwards.

Chromosomal damage and mitotic index were analyzed in 48-hour cultures. Mitotic index (MI) represent the number of metaphases per 1000 analyzed cells. Statistical analysis of the data was performed using variance analysis and post-hoc multiple tests (LSD test, Scheeffes' test). Cytogenetic analysis of the slides was performed using research light microscope Olympus BX41 equipped with digital camera. Changes were recorded using immersion objective (x 1000). Clearly visible metaphases were examined for each one of the tested irradiation dosages. In the control samples, 0.1 Gy and 0.2 Gy irradiated samples, we examined 1600 metaphases for each group. A total of 958 metaphases were examined in the samples irradiated with 0.5 Gy. The observed aberrations were statistically analyzed using variance analysis and post-hoc multiple tests (LSD test, Scheeffes' test) by SPSS 15.0 for Windows program.

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

Results and Discussion / Rezultati i diskusija

There are no available data providing information about the karyogram of Bosnian and Herzegovinian mountain horse which is our autochthonous horse breed. In order to form baseline control for the identification and the analysis of chromosomal aberration following blood irradiation we have constructed a normal horse karyogram. Comparison of the constructed karyogram with karyograms of other horse breeds described in literature (Richer *et al.*, 1990) revealed no observable differences. Diploid number of chromosomes is $2n = 64, XY$ ($2n = 64, XX$) which includes 62 autosomal and one pair of sex chromosomes. Diploid chromosome set consists of 13 pairs of metacentric and sub-metacentric chromosomes and 18 pairs of acrocentric chromosomes. Sex chromosomes in female specimens comprise two sub-metacentric X chromosomes while male karyogram features has one sub-metacentric X and one acrocentric Y chromosome. It is worth emphasizing that horse karyotype analysis is quite complex due to a high

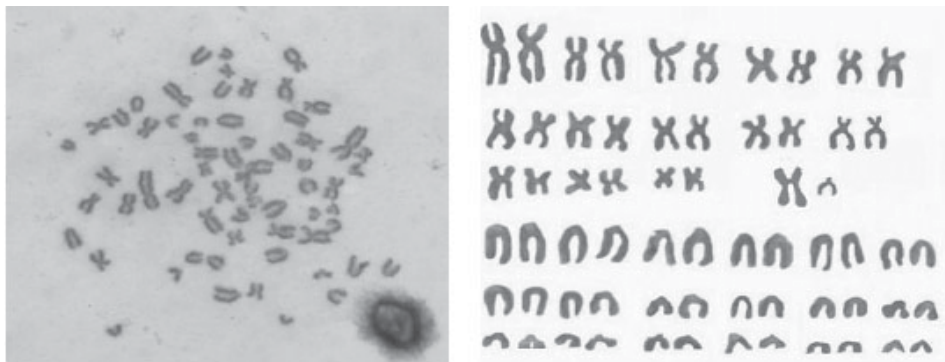


Figure 1. *Metaphase figure and karyogram of a horse (male) /*
Slika 1. Slika metafaze i kariogram konja (mužjak)

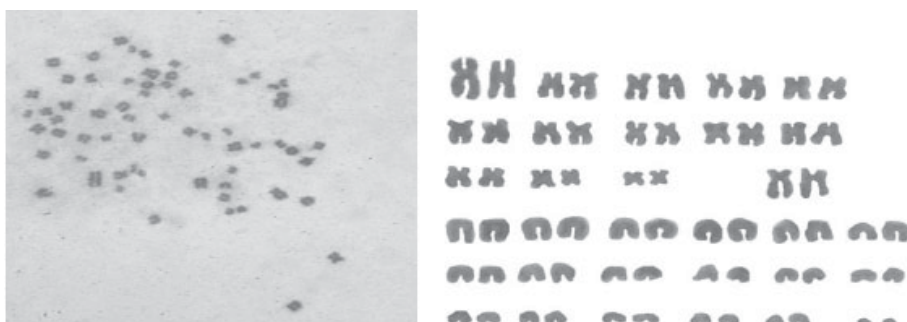


Figure 2. *Metaphase figure and karyogram of a horse (female) /*
Slika 2. Slika metafaze i kariogram konja (ženka)

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

number of chromosomes and an abundance of acrocentric chromosomes (18 pairs), whose morphology complicates the analysis of chromosomal aberrations (dicentric chromosomes and acentric fragments in particular). Basic attributes of normal horse karyogram are presented in Figures 1 and 2.

Mitotic index was determined as a relative frequency (%) of cells in mitosis per 1000 examined cells in 48-hour horse blood cultures irradiated with different dosages. The results are presented in Table 1 and Figure 3.

Table 1. *Mitotic index of cultivated horse lymphocytes following the irradiation /*
Tabela 1. Mitotski indeks kultivisanih limfocita konja posle zračenja

Dosage / Doza (Gy)	Control / Kontrola	0.1	0.2	0.5
MI (%)	15.2	14.8	14.1	8.4*

* $p < 0.05$

Variance analysis ANOVA established significant differences among the examined groups ($F = 34,800$; $p < 0.05$).

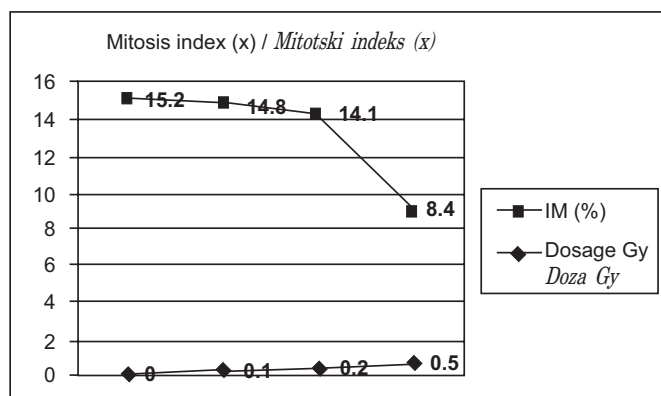


Figure 3. *Mitotic index (%) of cultivated horse lymphocytes following irradiation /*
Slika 3. Mitotski indeks (%) kultivisanih limfocita konja posle zračenja

The results of post-hoc multiple tests demonstrated significant difference between 0.5 Gy irradiated samples and all other samples. At the same time, no significant difference was observed among the control samples and samples irradiated with 0.1 Gy and 0.2 Gy. X-rays were found to alter mitotic index regardless of the tested dosage. The number of metaphases in irradiated samples equilibrated against the control decreased with the increase in dosage. The number of metaphase lymphocytes in samples irradiated with 0.1 Gy and 0.2 Gy did not significantly differ from the control. At the same time, the change in mitotic index in 0.5 Gy irradiated samples was significant experiencing decrease from 15.2% in the control to 8.4%.

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

This result suggests that X-rays exert a negative influence over the mitotic index, which declines with the increase in dosage. Increase in the received irradiation dosage causes accumulation of unfavorable changes that cells cannot sustain, thus numerous cells yield to selection and undergo lysis. It was observed that the cell abundance decreases with the increase in dosage. When the health risk assessment is concerned, damages sustained by cells are of greater concern. Such damages undergo clonal expansion and are passed on to the following generations of cells. At certain level they most probably cause transformation of normal into neoplastic cells, i.e. tumor development (Ibrulj, 2000).

It is well known that ionizing irradiation induces chromosomal aberrations observable in various human and animal tumors. Many neoplasms are characterized by visible chromosomal aberrations along with certain somatic conditions. Numerous discussions were dedicated to the significance of chromosomal aberrations and their potential role in the etiology of malignant transformation. The incidence of chromosomal aberrations and tumors increases with the increase of irradiation dosage which suggests an etiological link between chromosomal aberrations and malignant transformation. Numerous experiments conducted on plants and animals revealed chromosomal aberrations in dividing cells that were exposed to irradiation as an observable response to irradiation or injuries (Makino, 1975).

The results of the analysis of chromosomal damage in the cultured lymphocytes of the Bosnian and Herzegovinian mountain horse following *in vitro* irradiation with a low dosage X-rays are summarized in Table 2 and Figures 4-9.

Table 2. Summarized data on chromosomal damage in horse lymphocytes following *in vitro* irradiation /

Tabela 2. Sumirani podaci o hromozomnim oštećenjima na limfocitima konja posle zračenja *in vitro*

Dosage / Doza (Gy)	Number of metaphase figures / Broj slika metafaze	Chromatid aberrations / Hromatidne aberracije		Chromosomal aberrations / Hromozomne aberacije				%
		Gap / Razmak	Break / Prekid	Acentric fragments / Acentrični fragmenti	Dicentrics / Dicentrični	Ring chromo- somes / Prstenasti hromozomi	Quadriradial translocation / Kvadriradijalna translokacija	
Control / Kontrola	1600	6	5	2	1		-	0.88
0.1 Gy	1600	7	5	4	2		-	1.13
0.2 Gy	1600	10	5	10	8	1		2.13
0.5 Gy	958	7	4	24	18	1	1	5.74

Chromosome analysis in non-irradiated samples revealed spontaneous chromosomal aberrations, which is consistent with the available data (Pertti *et*

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

vonKoskull, 1976; Dolphin, 1978; Kubelka, 1985; Lloyd *et al.*, 1987). The frequency of spontaneous chromosomal aberrations in our research was 0.88% while reports on this value in animals vary. The frequency of spontaneous chromosomal aberrations in pig lymphocytes was 0.77 % (Slijepčević, 1991), 1.40% in goats (Hasanbašić, 1991) and 1.62% in cattle (Hasanbašić *et al.*, 1998).

Also, the data on spontaneous chromosomal aberrations in humans fluctuate. However, the data by Zaharov are the most reliable (after Obralic, 1992). According to an examination of 60 thousand people of both sexes, 0 – 70 years of age, he established a frequency of spontaneous aberrations of 1.02%.

Following *in vitro* irradiation of horse blood we confirmed that ionizing irradiation increases the chromosomal aberrations load per metaphase. Also, chromosomal aberrations are clearly dependant on the irradiation dosage. Chromosome type aberrations are superior to the other types since the aberrations found in peripheral blood lymphocytes following the irradiation were mainly of chromosome type. In biological dosimetry, the occurrence of dicentric chromosomes, acentric fragments and ring chromosomes is observed with particular attention (Galloway, 1994; Hasanbašić, 1991; Slijepčević, 1991).

In this research, chromatid type aberrations (gaps and breaks) did not significantly depart from the condition found in non-irradiated lymphocytes. This finding is consistent with literature data (Bender *et al.*, 1985; Hasanbašić, 1991; Slijepčević, 1991) (Figures 4 and 5).

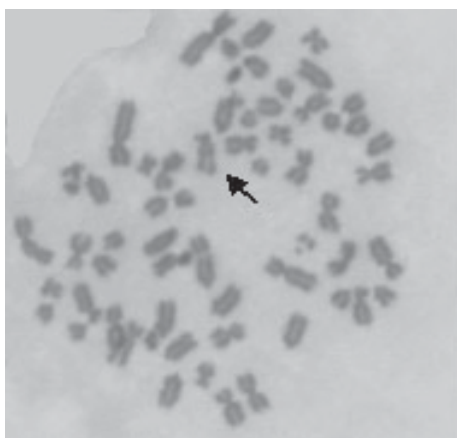


Figure 4. *Gap (control)* /
Slika 4. Razmak

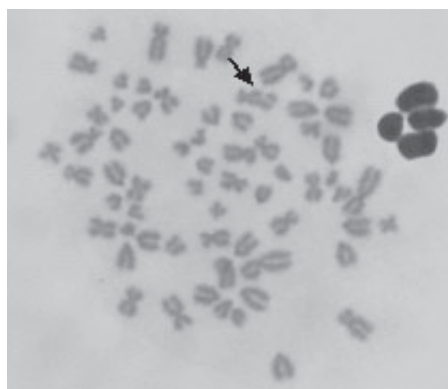


Figure 5. *Break (0.1 Gy)* /
Slika 5. Prekid

The number of chromosome type aberration increased with the increase in irradiation dosage. Also, acentric fragments (Figure 6) were always somewhat more abundant than dicentric chromosomes (Figure 7). Our results concur with those found in pigs, goats and cattle (Hasanbašić, 1991; Slijepčević,

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

1991; Hasanbašić *et al.*, 1998), and in humans as well (Kašuba, 1995). The finding of a ring chromosome (Figure 8) at an early stage of our research at a dosage of 0.2 Gy may be explained by the advanced age of the particular experimental animal (20 years). It is well established that age may influence the level of chromosomal aberrations since it also influences the metabolic condition of an animal as well as the condition of enzymatic repair processes. The occurrence of quadriradial translocation in the same sample at 0.5 Gy dosage may be explained in the same manner (Figure 9).

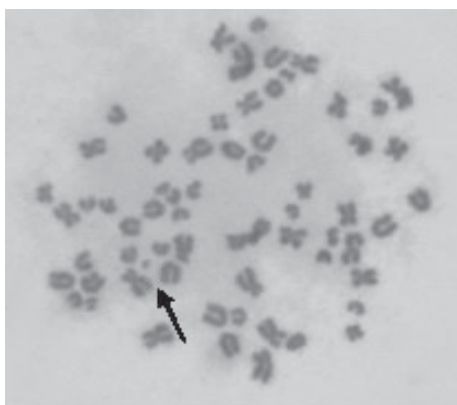


Figure 6. Acentric fragment (0.1 Gy) /
Slika 6. Acentrični fragment hromozoma

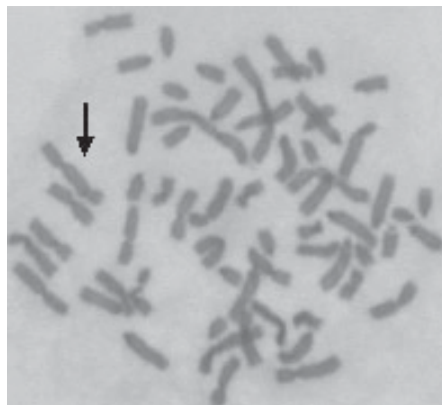


Figure 7. Dicentric chromosome (0.2 Gy) /
Slika 7. Dicentrični

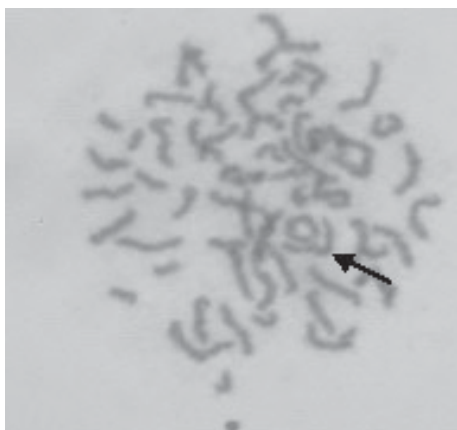


Figure 8. Ring chromosome (0.2 Gy) /
Slika 8. Translokacija prstenastog hromozoma

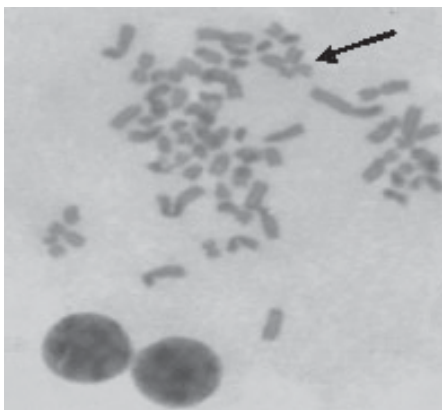


Figure 9. Quadriradial translocation
(0.5 Gy) /
Slika 9. Kvadriradijalni

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

We noted a significant increase in chromosomal aberrations frequency following the irradiation of blood with 0.5 Gy. The same observation was reported by Anderson *et al.* (2000). They observed a significant increase in chromosomal aberrations frequency in the first human lymphocytes division following the irradiation with 0.5 Gy.

Change in ploidy was also noted, mainly in the form of tetraploidy which is the result of mitotic spindle dysfunction. This numerical aberration was not recorded separately. Variance analysis (ANOVA) confirmed significance of the differences ($F = 71.349$; $p < 0.05$). LSD test established significant differences between the samples irradiated with 0.2 Gy and 0.5 Gy and the control samples and the samples that received 0.1 Gy. Scheeffes' test showed significant difference only between the 0.5 Gy irradiated group and all the other analyzed groups.

Analysis of the cultivated peripheral blood lymphocytes has proven to be a very convenient method for the analysis of chromosomal aberrations. The results confirm extreme mutagenic and carcinogenic activity of the applied agent. Uncontrolled utilization of nuclear power, fast technological development and the use of X-rays in medical diagnostics and therapy contribute to the dangers of human and animal exposure to ionizing irradiation as well as environmental contamination.

References / Literatura

1. Anderson R, Marsden SJ, Wright EG, Kadhim MA, Goodhead DT, Griffin CS. Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha particles. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 31-40.
2. Balcer EK, Harrison GH. Effect of X-ray dose protraction and a tumor promoter on transformation induction *in vitro*. *Int J Radiat Biol* 1988; 54(1): 81-9.
3. Barel EH, Blomgren H. Response of human lymphocytes to mitogenic stimuli after irradiation *in vitro*. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1976; 15: 149-61.
4. Barel EH, Blomgren H, Einhorn N, Lax I, Junun I. Effect of radiation therapy on the mitogenic response of *in vitro* irradiated human lymphocytes to phytohaemagglutinin. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1977; 16: 266-71.
5. Bender MA, Rorby JM, Kale RP. G_0 chromosomal radiosensitivity in ataxia telangiectasia lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 150: 277-82.
6. Boyle JM, Spreadborough AR, Greaves MJ, Birch JM, Varley JM, Scot D. Delayed chromosome changes in gamma irradiated normal and Li-Fraumeni fibroblasts. *Radiat Res* 2002; 157: 158-65.
7. daCruz AD, McArthur AG, Silva CC, Curado MP, Glickman BW. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking and cesium-137 dose in the Goiana (Brasil) radiological accident. *Mutat Res* 1994; 313: 57-68.
8. Dolphin GW. A review of *in vitro* dose-effect relationship, In: Mutagen induced chromosome damage in man. Eds. by H.J. Evans and D.C. Lloyd, Edinburgh University Press, 1978.
9. Emery AEH. Osnovi medicinske genetike, Savremena administracija, Beograd, Šesto englesko izdanje, 1986.

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

10. Gantenberg HW, Wuttke K, Strefer C, Muller WU. Micronuclei in human lymphocytes irradiated *in vitro* or *in vivo*. Radiat Res 1991; 128: 276-81.
11. Galloway SM. Chromosome aberrations induced *in vitro*. Mechanisms, delayed, expression and intriguing question. Env Mol Mutagen 1994; 23, Suppl. 24: 44-53.
12. Hasanbašić D. Citogenetska dozimetrija na modelu domaće koze nakon *in vitro* i *in vivo* ozračivanja visokoenergetskim X zračenjem. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Zavod za radiologiju, Sarajevo, 1991.
13. Hasanbašić D, Milošević H, Čustović H, Čutuk R. Frekvencija hromosomskih aberacija nakon X i γ ozračivanja krvi goveda. Veterinaria (Sarajevo) 1998; 47(1-2): 183-8.
14. He JL, Jin HY, Jin LF, Gao SY. Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. Biomed Environ Sci 2000; 13: 32-6.
15. International Atomic Energy Agency (IAEA). Biological dosimetry: Chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Technical reports series No 260. Vienna, 1986.
16. International Atomic Energy Agency (IAEA). Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A Manual. Technical Reports Series 405. Vienna, 2001.
17. Ibrulj S. Citogenetička analiza genotoksičnosti oxazepam, Doktorska disertacija. Sarajevo, 2000.
18. Kaplan MI, Morgan WF. The nucleus is the target of radiation-induced chromosomal instability. Radiat Res 1998; 150: 382-90.
19. Kašuba V. Genotoksični učinak J^{131} na ljudske limfocite. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet. Zagreb, 1995.
20. Krishnaja AP, Sharma NK. Transmission of γ -ray induced unstable chromosomal aberrations through successive mitotic divisions in human lymphocytes *in vitro*. Mutagenesis 2004; 19(4): 295-305.
21. Kubelka D. Odnos doze zračenja i hromozomskih aberacija u ljudskim limfocitima. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu. Zagreb, 1985.
22. Lambert B, Holmberg K, Hackman P, Wennborg A. Radiation induced chromosomal instability in human T-lymphocytes. Mutat Res 1998; 405: 161-70.
23. Lloyd DC, Edwards AA, Prosser JS, Barjaktarević N, Brown JK, Horvat D *et al.* A collaborative exercise on cytogenetic dosymetry for simulated whole and partial body accidental irradiation. Mutat Res 1987; 179: 197-208.
24. Makino S. Human chromosomes. Igaku Shoin LTD, 392-429. Tokyo, 1975.
25. Obralić N. Ispitivanje osjetljivosti na ionizujuće zračenja oboljelih od malignih tumora citogenetičkom metodom. Doktorska disertacija, Sarajevo, 1992.
26. Pertti A, vonKoskull H. Distribution of spontaneous chromosome breaks in human chromosomes. Hum Genet 1976; 32: 143-8.
27. Richer CL, Power MM, Klunder LR, McFeely RA, Kent MG. Standard karyotype of the domestic horse (*Eguus caballus*). Hereditas 1990; 112: 289-93.
28. Slijepčević P. Citogenetska dozimetrija x zračenja na modelu *Sus scrofa domestica*. Doktorska disertacija. Veterinarski fakultet, Univerziteta u Sarajevu. Zavod za radiologiju, Sarajevo 1991.
29. Thierens H, Vral A, Morthier R, Aousalahm B, De Ridder L. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. Mutagenesis 2000; 15, 245-9.

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

SRPSKI

HROMOZOMSKA OŠTEĆENJA I PROMJENE MITOTSKOG INDEKSA U LIMFOCITIMA BOSANSKOHERCEGOVAČKOG BRDSKOG KONJA NAKON *IN VITRO* OZRAČIVANJA NISKIM DOZAMA X ZRAKA

Dunja Rukavina, Danica Hasanbašić, E. Suljkanović, Amela Katica

U radu je istraživao uticaj niskih doza X zraka na pojavu hromozomskih oštećenja i promjene mitotskog indeksa (MI) u kulturi limfocita bosanskohercegovačkog brdskog konja nakon *in vitro* ozračivanja. Rezultati su statistički obrađeni korištenjem analize varijanse i post-hoc multiplih testova (LSD test, Scheeffes' test).

Rezultati analize MI su ukazali da X zraci negativno utiču na MI, smanjujući njegove vrijednosti sa povećanjem doze zračenja. Utvrđeno je da se skupina zračena na 0,5 Gy statistički značajno razlikovala u odnosu na ostale ispitivane skupine ($p < 0,05$). Analiza hromozomskih oštećenja pokazala je da jonizujuće zračenje povećava broj hromozomskih oštećenja po metafazi, da hromozomske aberacije pokazuju jasnu ovisnost o dozi zračenja. Postojanje signifikantnih razlika utvrđeno je korištenjem analize varijanse ($p < 0,05$). Rezultati LSD testa potvrdili su postojanje značajnih razlika između skupina zračenih na 0,2 Gy i 0,5 Gy u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu zračenu na 0,1 Gy, dok su rezultati Scheeffes' testa pokazali da se signifikantno razlikuje jedino skupina zračena na 0,5 Gy.

Ključne reči: hromozomska oštećenja, citogenetska dozimetrija, konj, jonizujuće zračenje

РУССКИЙ

ХРОМОСОМНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ МИТОТИЧЕСКОГО ИНДЕКСА В ЛИМФОЦИТАХ БОСНИЙСКОГЕРЦЕГОВИНСКОЙ ГОРНОЙ ЛОШАДИ ПОСЛЕ *IN VITRO* ОБЛУЧЕНИЯ НИЗКИМИ ДОЗАМИ X ЛУЧЕЙ

Дуня Рукавина, Даница Хасанбашич, Э. Сульканович, Амела Катица

В работе исследовано влияние низких доз X лучей на явление хромосомных повреждений и изменения митотического индекса (МИ) в культуре лимфоцитов боснийскогерцеговинской горной лошади после *in vitro* облучения. Результаты статистически обработаны использованием анализа варианта и *post-hoc* мультиплих тестов (LSD тест, Scheeffes' тест).

Результаты анализа МИ указали, что X лучи отрицательно влияют на МИ, уменьшая их стоимости с увеличением дозы излучения. Нами утверждено, что группа, излученная на 0,5 Gy статистически значительно различалась в отношении остальных испытанных групп ($p < 0,05$). Анализ хромосомных повреждений показал, что ионизирующее излучение увеличивает число хромосомных повреждений по метафазе, что хромосомные aberации показывают ясную зависимость о дозе излучения, и, что хромосомные типы aberаций превосходящие в отношении других типов aberаций. Существование знаковых разниц утверждено использованием анализа варианта ($p < 0,05$). Результаты LSD теста подтвердили существование значительных разниц между группами, излученных на 0,2 Gy и 0,5 Gy в отношении кон-

Vet. glasnik 63 (5-6) 341 - 352 (2009) Dunja Rukavina *et al.*: Chromosomal damage and mitotic index in Bosnian and Herzegovinian mountain horse lymphocytes following...

трольной группы и группу, излученную на 0,1 Gy, пока результаты Scheffes' теста показали, что знаково различается только группа, излученная на 0,5 Gy.

Ключевые слова: хромосомные повреждения, цитогенетическая дозиметрия, лошадь, ионизирующее излучение

ORIGINALNI RAD – ORIGINAL PAPER

UDK 636.4.09:57.083.3

PCR – DIJAGNOSTIKA INFEKCIJE KOD SVINJA KOJU
IZAZIVA *MYCOPLASMA SUIIS**
*MOLECULAR DIAGNOSTICS OF SWINE INFECTION CAUSED BY
Mycoplasma suis*

A. Potkonjak, B. Lako, Vesna Milićević, B. Savić, V. Ivetić,
Dobriša Jakić-Dimić, O. Stevančević, B. Toholj**

Patogena hemoplazma, nazvana *Mycoplasma suis* (prethodni naziv *Eperythrozoon suis*) je uzročnik eperitrozoonoze svinja ili ikteroanemije svinja. Uzročnik može inficirati i ljude. Oboljenje je veoma rasprostranjeno u svetu. Najčešća je latentna infekcija svinja izazvana *M. suis*. Nakon delovanja faktora stresa, oboljenje se klinički manifestuje. Akutni tok se odlikuje pojavom febrilnog stanja i ikteroanemije. Dijagnoza oboljenja se, uobičajeno, postavlja na osnovu epizootološke ankete, kliničkog pregleda i mikroskopskog pregleda razmaza krvi svinja obojenog, najčešće, po Gimzi. Razvijene su savremene metode molekularne biologije poput PCR, koje su osetljivije i specifičnije u postavljanju dijagnoze infekcije svinja izazvanih *M. suis*. Primenom PCR testa, ovim ispitivanjem je utvrđeno prisustvo *M. suis* na farmama svinja u Republici Srbiji.

Ključne reči: *Mycoplasma suis*, *Eperythrozoon suis*, anemija, svinje, PCR dijagnostika

Uvod / Introduction

Mycoplasma suis je uzročnik eperitrozoonoze svinja, imununološki posredovane hemolitičke anemije. Morfološki se karakteriše prisustvom okruglih, ovalnih, štapićastih ili prstenastih formi, prečnika od 0,8 μ m do 2,5 μ m ili čak i većeg, na površini eritrocita (Li i sar., 2008). Ove bakterije se umnožavaju jedino *in*

* Rad primljen za štampu 07. 10. 2009. godine

** Mr sci. med. vet. Aleksandar Potkonjak, asistent, dr sci med. vet. Branko Lako, redovni profesor, Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu; Vesna Milićević, dr vet. med., istraživač-pripravnik, mr sci. med. vet. Božidar Savić, dr sci. med. vet. Vojin Ivetić, dr sci. med. vet. Dobriša Jakić-Dimić, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; Ognjen Stevančević, dr vet. med., postdiplomac, dr sci. med. vet. Bojan Toholj, Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Vet. glasnik 63 (5-6) 353 - 358 (2009) A. Potkonjak i sar.: PCR – dijagnostika infekcije kod svinja koju izaziva *Mycoplasma suis*

vivo, izvođenjem biološkog oglada na splenektomisanim životinjama. Eventualnu mogućnost umnožavanja *M. suis* u uslovima *in vitro* saopštavaju Nonaka i sar. (1996). Veličina genoma *M. suis* iznosi 745 kb, koji do danas nije sekvencioniran (Hoelzle, 2008; Messick i sar., 2000).

Eperitroozoonoza svinja je oboljenje rašireno širom sveta i pojavljuje se u svim starosnim kategorijama svinja (Messick, 2004). Prevalencija infekcije u Nemačkoj, u populaciji tovljenika iznosi 13,9 % i infekcija je prisutna na 40,3 % farmi svinja (Ritzmann i sar., 2009). Prevalencija infekcije svinja izazvane *M. suis* u Brazilu kreće se od 13,3 do 24 % (Guimaraes i sar., 2007). Ovo oboljenje je od velikog ekonomskog značaja za svinjarstvo i morbiditet iznosi 30 %, a mortalitet od 10 do 20 % (Wu i sar., 2006).

Eperitroozoonoza svinja protiče u akutnom ili hroničnom toku (Gwaltney, 1995). U akutnom toku kada je u krvi prisutan veliki broj uzročnika, bolest se klinički ispoljava pojavom hemolitične anemije kod prasadi, a ređe i kod tovljenika i krmača. Hronični tok eperitroozoonoze može proticati potpuno asimptomatski. Kada je ispoljena klinička slika, zapaža se anemija i/ili ikterus kod novorođene prasadi uz slabo napredovanje; zaostajanje u rastu i razvoju tovljenika i poremećaji reprodukcije kod krmača (Hoelzle, 2008).

Laboratorijska dijagnostika infekcije kod svinja izazvane *Mycoplasma suis* se zasniva na mikroskopskom pregledu hemijski obojenog razmaza periferne krvi svinja, s obzirom na to da kultivacija uzročnika u *in vitro* uslovima nije moguća. Navodi se da je mikroskopski pregled hemijski obojenog razmaza krvi svinja, ograničene vrednosti zbog niže osetljivosti i specifičnosti. Danas su razvijene metode molekularne biologije za dijagnostiku ove infekcije svinja, koje su osetljivije i specifičnije. Razvoj novih tehnologija za manipulaciju genomom *M. suis*, između ostalog, otvara mogućnosti za razumevanje važnih bioloških osobina hemotropnih mikoplazmi koje su odgovorne za inficiranje sisara. Kao efikasna molekularna tehnika za identifikaciju hemotropnih mikoplazmi kod životinja navodi se PCR, koja se zasniva na amplifikaciji 16S rRNK gena, *rpoB* gena ili specifičnog fragmenta genoma od 1,8 kb za *M. suis*. Ovi testovi mogu da se koriste i za dijagnostiku latentne infekcije *M. suis* kod svinja, kada životinje ne ispoljavaju kliničke simptome bolesti. Molekularne tehnike za dijagnostiku eperitroozoonoze su unapređene uspostavljanjem LightCycler real-time PCR metode za kvantitativnu detekciju *M. suis*. Visoko konzervirani *msg1* gen, koji kodira površinski lokalizovani protein sličan sa GAPDH, a ima ulogu u adheziji za eritrocite, predstavlja gen izbora za definisanje prajmera koji se koriste za PCR. Prednosti ove metode jesu: smanjen rizik kontaminacije, visoka produktivnost, standardizacija i mogućnost korišćenja različitih bioloških materijala - uzoraka (krv, organi itd.). Novi real-time protokol za identifikaciju *M. suis* je specifičan, senzitan, reproducibilan i pouzdan. Kvantitativni metodi omogućavaju uspostavljanje i procenu značaja terapijskih i profilaktičkih procedura, kao što su vakcinacija i aplikacija antibiotika. Primenom visoko osetljivih i specifičnih tehnika molekularne biologije, moguće je identifikovati prisustvo *M. suis* kod klinički obolelih ili latentno inficira-

Vet. glasnik 63 (5-6) 353 - 358 (2009) A. Potkonjak i sar.: PCR – dijagnostika infekcije kod svinja koju izaziva *Mycoplasma suis*

nih svinja, kao i identifikovati vektore i rezervoare ovog uzročnika u prirodi (Hoelzle, 2008).

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Materijal / *Material*

Kao materijal za ovo istraživanje korišćeni su zbirni uzorci pune krvi sa EDTA, koja je prikupljena sterilnom venepunkcijom od svinja sa dve farme u Južnobačkom okrugu (farma A i farma B), sa jedne farme u Severnobačkom okrugu (farma C) i sa jedne farme u Braničevskom okrugu (farma D) u Republici Srbiji. Ukupan broj jedinki uključenih u istraživanje je bio 40 (po 10 jedinki sa svake farme, odnosno 2 zbirna uzorka sa po 5 pojedinačnih uzoraka krvi).

Metode / *Methods*

Ekstrakcija DNK

Za izolaciju DNK korišćen je komercijalni set (*QIAamp DNA Mini kit*, Qiagen) prema uputstvu proizvođača.

Reakcija lančane polimerizacije (PCR)

Umnožavanje specifičnog dela genoma *msg1 M. suis* obavljeno je sa sledećim parom prajmera: 5'- AC AACTAATGCACTAGCTCCTATC - 3' forward prajmer za *msg1* i 5' - GCTCCTGTAGTTGTAGGAATAATTGA - 3' reverse prajmer. Reakcija lančane polimerizacije je izvršena upotrebom komercijalnog seta za izvođenje reakcije (*HotStarTaq Master Mix kit*, Qiagen) prema uputstvu proizvođača sa aktivacijom polimeraze na temperaturi od 95°C tokom 15 min., 35 ciklusa (denaturacija na temperaturi od 94°C tokom 0,5 min., anilizacija na temperaturi od 50°C tokom 0,5 min., ekstenzija na 72°C tokom 0,5 min.) i krajnjom ekstenzijom na temperaturi od 72°C tokom 7 min.

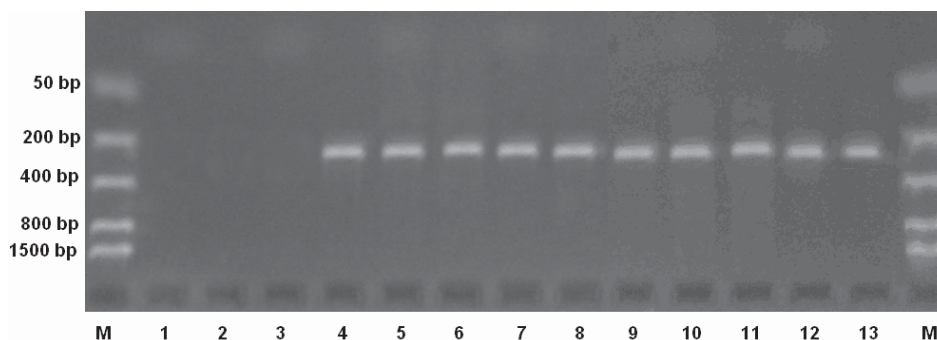
Gel elektroforeza

Vizuelizacija reakcije lančane polimerizacije je izvršena gel elektroforezom, u agaroznom gelu koncentracije 2%, u 1 x TAE puferu, sa dodatkom etidium bromida kao fluorescentnog indikatora. Proces elektroforeze je obavljen u *Hoeffer submarine* aparatu za elektroforezu, pri naponu od 60V i jačini struje od 10 mA, tokom 30 minuta. Radi određivanja karakteristične dužine amplifikovanog segmenta korišćen je molekularni marker *Fast Ruler DNA ladder, low range*, Fermentas.

Rezultati i diskusija / *Results and Discussion*

Primenom PCR utvrđeno je prisustvo *M. suis* na ispitivanim farmama svinja u Republici Srbiji. U svim zbirnim uzorcima pune krvi svinja identifikovano je prisustvo specifičnog dela genoma *msg1 M. suis* (Fotografija 1).

Vet. glasnik 63 (5-6) 353 - 358 (2009) A. Potkonjak i sar.: PCR – dijagnostika infekcije kod svinja koju izaziva *Mycoplasma suis*



Fotografija 1. Gel elektroforeza produkata PCR reakcije
Figure 1. Gel electrophoresis of PCR reaction products

Legenda:

M – molekularni marker / molecular marker, 1 – voda / water,
2 i 3 – negativna kontrola / negative control, 4 i 5 – pozitivna kontrola / positive control,
6 do 13 – zbirni uzorci krvi svinja / collective samples of swine blood

PCR – dijagnostika infekcije kod svinja izazvane *M. suis* ima prednost u odnosu na serološku dijagnostiku ove infekcije iz nekoliko razloga. Do danas ne postoji ni jedan komercijalni test za serološku dijagnostiku infekcije svinja izazvane *Mycoplasma suis*, a dosadašnja istraživanja i razvoj seroloških testova bili su bazirani na tri metode: RVK, ELISA i test indirektne hemaglutinacije. Za ove serološke testove, korišćeni su nedefinirani antigeni *Mycoplasma suis* iz periferne krvi eksperimentalno inficiranih svinja, što predstavlja smetnju za postavljanje tačne dijagnoze. Antigeni dobijeni iz krvi eksperimentalno inficiranih svinja i purifikovani u laboratorijama pokazuju veliku varijabilnost i upravo to predstavlja prepreku za standardizaciju seroloških testova za dijagnostiku infekcije kod svinja izazvane *M. suis*. Osim toga, svi serološki testovi pre određuju titar IgM hladnih aglutinina, nego titar specifičnih antitela klase IgG na *M. suis*. Utvrđivanje titra antitela klase IgM protiv *M. suis* ima ograničenu dijagnostičku vrednost, s obzirom da su vrednosti visine titra varijabilne i zavise od faze infekcije. Sve ovo ukazuje na značaj PCR u dijagnostici infekcije svinja sa *M. suis* (Hoelzle, 2008).

U našem istraživanju, PCR test se pokazao kao jednostavan, brz, specifičan i osetljiv za dijagnostiku infekcije svinja izazvane *M. suis*.

Zaključak / Conclusion

Primenom PCR testa je identifikovano prisustvo *M. suis* na farmama svinja u Republici Srbiji. Neophodna su dalja epizootiološka istraživanja u cilju utvrđivanja prisustva i raširenosti infekcije svinja sa hemotropnim mikoplazmama u Republici Srbiji. Osim toga, istraživanja hemotropnih mikoplazmi su potrebna i zbog: mogućnosti učestvovanja hemoplazmi kao kofaktora u progresiji retrovi-

Vet. glasnik 63 (5-6) 353 - 358 (2009) A. Potkonjak i sar.: PCR – dijagnostika infekcije kod svinja koju izaziva *Mycoplasma suis*

rusnih, neoplastičnih i imunološki posredovanih oboljenja; nepoznavanja faktora virulencije i patogenetskih mehanizma u razvoju ovih infekcija; kao i potrebe razumevanja funkcije imunološkog sistema, koji je i u ovom slučaju odgovoran za pojavu oportunističnih infekcija.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENTS:

Ovaj rad je deo projekta "Razvoj i standardizacija imunodijagnostičkih testova (ELISA i WB) za dijagnostiku infekcija životinja i ljudi sa hemotropnim mikoplazmama", broj: 20124, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, 2008-2011.

Literatura / References

1. Guimaraes AM, Biondo AW, Lara AC, Messick JB. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. Vet Rec 2007; 160: 50-3.
2. Gwaltney SM. *Eperythrozoon suis* infections in pigs: Clinical syndromes and diagnosis. J Swine Health Prod 1995; 3: 25-7.
3. Hoelzle LE. Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. Vet Microbiol 2008; 130: 215-26.
4. Li W, Du N, Xu B, Dong W, Qu Z, Wang Y, Sui Y. Alteration of integrin-associated protein (CD47) on experimental porcine eperythrozoonosis. Vet Res Commun 2008; 32: 411-8.
5. Messick JB, Smith G, Berent L, Cooper S. Genome size of *Eperythrozoon suis* and hybridization with 16S rRNA gene. Can J Microbiol 2000; 46: 1082-6.
6. Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. Vet Clin Pathol 2004; 33: 2-13.
7. Nonaka N, Thacker BJ, Schillhorn van Veen TW, Bull RW. *In vitro* maintenance of *Eperythrozoon suis*. Vet Parasitol 1996; 61: 181-99.
8. Ritzmann M, Grimm J, Heinritzi K, Hoelzle K, Hoelzle LE. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. Vet Microbiol 2009; 133: 84-91.
9. Wu J, Yu J, Song C, Sun S, Wang Z. Porcine eperythrozoonosis in China. Ann N Y Acad Sci 2006; 1081: 280-5.

ENGLISH

PCR – DIAGNOSTICS OF SWINE INFECTION CAUSED BY *Mycoplasma suis*

A. Potkonjak, B. Lako, Vesna Milićević, B. Savić, V. Ivetić, Dobrila Jakić-Dimić, O. Stevanović, B. Toholj

The presence of two types of haemoplasm can be established in the swine population. Pathogenic haemoplasm, named *Mycoplasma suis* (previously called *Eperythrozoon suis*) is the cause of swine eperythrozoonosis or swine ichtheroanaemia. The cause of this disease can also infect humans. The disease has spread all over the world. The most frequent form is latent infection of swine caused by *M. suis*. The disease is clini-

Vet. glasnik 63 (5-6) 353 - 358 (2009) A. Potkonjak i sar.: PCR – dijagnostika infekcije kod svinja koju izaziva *Mycoplasma suis*

cally manifest following action by the stress factor. The acute course of the disease is characterized by the occurrence of a febrile condition and ichtheroanaemia. The disease is usually diagnosed based on an epizootiological poll, a clinical examination, and a microscopic examination of a blood smear stained most often according to Giemsa. Contemporary methods of molecular biology have been developed, such as PCR, which are more sensitive and specific in making a diagnosis of swine infection caused by *M. suis*. In these investigations, the presence of *M. suis* on pig farms in the Republic of Serbia has been determined using the PCR test.

Key words: *Mycoplasma suis*, *Eperythrozoon suis*, anaemia, swine, diagnostics, PCR

РУССКИЙ

ПЦР – ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИИ У СВИНЕЙ, ВЫЗЫВАЮЩУЮ *Mycoplasma suis*

А. Потконяк, Б. Лако, Весна Миличевич, Б. Савич, В. Иветич,
Добрила Якич-Димич, О. Стеванчевич, Б. Тохоль

В популяции свиней можно утвердить присутствие две гемоплазмы. Патогенная гемоплазма, обозначена как *Mycoplasma suis* (предварительное название *Eperythrozoon suis*) - возбудитель эперитрозооноза свиней или иктероанемии свиней. Возбудитель может инфицировать и людей. Заболевание распространено по всему миру. Наиболее частая латентная инфекция свиней, вызванная *M. suis*. После действия факторов стресса, заболевание клинически проявляется. Острое течение отличается явлением фебрильного состояния и иктероанемии. Диагноз заболевания, обычно, поставляется а основе эпизоотологической анкеты, клинического осмотра и микроскопического осмотра мазка крови свиней, окрашенного, чаще всего, по Гимзе. Развита современные методы молекулярной биологии как ПЦР, которые более чувствительные и более специфические в определении диагноза инфекции свиней, вызванных *M. suis*. Применением ПЦР теста, этим испытанием утверждено присутствие *M. suis* на фермах свиней в Республике Сербии.

Ключевые слова: *Mycoplasma suis*, *Eperythrozoon suis*, анемия, свиньи,
ПЦР диагностика

**ANALIZA INFEKCIJA MLIJEČNE ŽLIJEZDE NA OSNOVU
REZULTATA KALIFORNIJA MASTITIS TESTA I
BAKTERIOLOŠKIH NALAZA SEKRETA***
*ANALYSIS OF MAMMARY GLAND ACCORDING TO RESULTS OF
CMT (CALIFORNIA MASTITIS TEST) AND BACTERIOLOGICAL
FINDINGS IN SECRETION*

N. Varatanović, Amela Katica, T. Mutevelić, Nadžida Mlaćo, E. Hamzić**

Kontrolu zdravlja mliječne žlijezde u stadu crnošarih istočno-frizijskih krava vršili smo upoređivanjem rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza uzoraka mlijeka u toku godine. Ukupno su testirana i bakteriološki pregledana 3863 uzorka sekreta mliječne žlijezde. U 85,3% slučajeva je utvrđena podudarnost rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza. Najčešće izolovani uzročnici su stafilokoke u 52,4% slučajeva, streptokoke u 23,5% slučajeva, miješane infekcije u 13,1% i enterobakterije u 10,3% slučajeva. Poremećaji sekrecije i upalna stanja mliječne žlijezde se javljaju najčešće u ljetnom periodu, a najrjeđe u zimskom. Kotinuiranom upotrebom ove dvije metode moguće je dobiti zadovoljavajuće rezultate u poboljšanju količine i kvaliteta mlijeka, te zdravstvenog stanja mliječne žlijezde.

Ključne riječi: mastitis, Kalifornija mastitis test, krava

Uvod / Introduction

Mastitis je zapaljenski proces parenhima mliječne žlijezde. Karakteriše se patološkim promijenama u tkivu mliječne žlijezde i fizičkim, hemijskim i mikrobiološkim promijenama u mlijeku.

Upala mliječne žlijezde (mastitis) je odgovor na djelovanje različitih unutrašnjih i vanjskih faktora. Tokom posljednjih nekoliko decenija mastitis je postao vrlo skupa bolest muznih krava (Bennett i sar., 1999; Fourichon i sar., 2001; Kossabiati i sar., 1997). Pokazalo se da postoji visok rizik od razvoja subkliničkih

* Rad primljen za štampu 01. 06. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Nazif Varatanović, profesor, dr sci. med. vet. Amela Katica, docent, dr sci. med. vet. Tarik Mutevelić, docent, dr sci. med. vet. Nadžida Mlaćo, viši asistent, Edin Hamzić, dr vet. med., asistent, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Sarajevu, BiH

Vet. glasnik 63 (5-6) 359 - 367 (2009) N. Varatanović i sar.: Analiza infekcija mliječne žlijezde na osnovu rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza sekreta

mastitisa i visok procenat intramamarnih infekcija u periodu rane laktacije (Trinidad i sar., 1990; Oliver i sar., 1992; De Vieghe i sar., 2005). Naponi su usmjereni prema poboljšanju uspjeha liječenja kliničkih mastitisa i nadzoru subkliničkih mastitisa u cilju dobijanja mlijeka dobrog kvaliteta (Fabre i sar., 1999; Hillerton, 1998).

Identifikacija i uklanjanje intramamarnih infekcija u ranom periodu laktacije daje značajne ekonomske koristi. Na pojavu mastitisa prema Alandu (2003) i Barkemu i sar. (1999) poseban utjecaj ima menadžment stada, uključujući smještaj, ishranu i sistem muže. U razumijevanju epidemiologije i terapije mliječne žlijezde veoma je važna bakteriologija mastitisa. Kao najčešći uzročnici mastitisa (Jonsson i sar., 1991; Myllys i sar., 1995; Waage i sar., 1999; Tertu, 2004) smatraju se *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* i *Streptococcus dysgalactiae*.

Upala mliječne žlijezde je obično karakterizirana porastom somatskih ćelija u mlijeku (Rodriguez i sar., 2000). Za njihovo otkrivanje postoji niz metoda, ali je najjednostavniji i pouzdano praktičan California Mastitis Test (CMT) (De Vieghe i sar., 2005). Njegovu primjenu i preporuku u cilju otkrivanja i suzbijanja mastitisa kao metodu izbora preporučuju Dingwell i sar. (2003).

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti rezultate Kalifornija Mastitis Testa (CMT) i bakterioloških nalaza sekreta mliječne žlijezde uz indentifikaciju uzročnika u različitim periodima godine.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Istraživanja smo vršili na stadu crnošarih istočnofrizijskih krava u kontrolisanom farmerskom uzgoju kod Sarajeva u toku četiri godišnja doba. Zimski period obuhvata XII, I i II mjesec, proljetni III, IV i V mjesec, ljetni VI, VII i VIII mjesec i jesenski IX, X i XI mjesec. Kontrolu zdravlja mliječne žlijezde vršili smo kliničkim pregledom mliječne žlijezde, testiranjem mlijeka pomoću CMT-a kao i bakteriološkim pregledom uzoraka mlijeka.

Kliničkim metodama pretrage ustanovili smo sve promjene koje su nastale u tkivu žlijezde bilo akutnim bilo hroničnim upalnim procesom. Inspekcijom smo sagledali asimetriju četvrti i razlike u obliku, razvijenosti i položaju sise. Od vrha vimena preko mliječne cisterne prema parenhimu žlijezde, palpacijom smo utvrđivali nepravilnosti vrha sise, zadebljanja i oteknuća u sisnom kanalu, cisterni i parenhimu uspoređujući međusobno četvrti.

Nakon kliničkog pregleda mliječne žlijezde vršili smo testiranje mlijeka svake četvrti pomoću CMT-a (SOMA TEST i testatora proizvođača FARM d.o.o. Vrbanovac RH). Test smo radili direktno na testatorima u štalama, neposredno nakon kliničkog pregleda. Reagens se miješa sa približno istom količinom mlijeka (1-2 ml) i laganim kružnim pokretima testatora očitava se nastala promjena unutar 1-2 minute. Mliječni uzorci koji su bogati sa staničnim elementima su davali vidljive promjene unutar nekoliko sekundi. Sadržaj iz testatora smo nakon ispitivanja

Vet. glasnik 63 (5-6) 359 - 367 (2009) N. Varatanović i sar.: Analiza infekcija mliječne žlijezde na osnovu rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza sekreta

izlijevali u posebne posude, testatore oprali u mlakoj vodi, osušili i ponovno koristili za pretragu. Prezentacija reakcije je bila: negativna (–) u slučajevima gdje smo imali mješavinu mlijeka i reagensa homogeno mutnu, sumnjiva (±) kada su prisustne grudvice i krpice koje daljnjim miješanjem nestaju, pozitivna (+) kada su prisustne pahuljice koje se daljnjim miješanjem koncentrišu u sredinu i izrazito pozitivnu reakciju (++) gdje se prilikom miješanja reagensa i mlijeka stvara gusta viskozna masa sa odvajanjem bistre tekućine ili se stvara želatinozna masa.

Prije uzimanja uzoraka za bakteriološku pretragu, sise smo oprali i dezinficirali sa 70%-nim alkoholom, te u sterilnu epruvetu uzimali svaki treći izmužaj kao uzorak za analizu. Svaka epruveta je označena brojem četvrti i brojem životinje. Uzorke nismo uzimali iz četvrti sa vidno upalnim procesima, a uzeti su uzorci svih četvrti bez obzira da li je CMT reagovao pozitivno ili negativno. Za izolovanje uzročnika mastitisa koristili smo krvni i endo agar, Edwardsovu i TKT podlogu. Nasađane hranjive podloge mliječnim uzorcima smo očitavali nakon inkubacije 24 - 48 sati pri temperaturi od 37°C. Determinaciju *Streptococcus agalactiae* smo radili na CAMP ploči, a identifikaciju stafilokoka prema pigmentu izraslih kolonija, stvaranju hemolize na krvnom agaru, koagulaza testom i testom fermentacije manitola. Izolaciju enterobakterija smo radili na MacConkey agaru, a korinebakterije (*Arcanobacter pyogenes*) na krvnom agaru.

Rezultati / Results

Reakcije CMT-a i nalazi bakteriološke pretrage iskazani su procentualno kroz sva četiri godišnja perioda u tabeli 1.

U zimskom periodu (decembar, januar i februar) ishrana krava se sastojala od kukuruzne silaže, sijena i koncentrata. Fiziološki gledano ovo je period sa najvećim brojem teljenja. U toku ovog perioda ukupno je pregledano 765 uzoraka mlijeka. Broj pozitivnih reakcija CMT-a se mijenjao po mjesecima, a najmanja vrijednost od 17,6% je zabilježena u februaru, što ujedno predstavlja i najmanju zabilježenu vrijednost u toku cijele godine. Bakteriološkom pretragom uzoraka mlijeka izolovali smo prosječno 14,83% pozitivnih slučajeva od čega je najveći broj pozitivnih nalaza bio u decembru, a najmanji u januaru.

Proljetni period (mart, april i maj) donosi promjene u ishrani, jer se krajem aprila krave počinju hraniti djelimično svježom zelenom masom. Uzorci mlijeka, njih 748, prilikom testiranja CMT-om su dali nešto veći procenat pozitivnih reakcija nego u zimskom periodu. Variranja pozitivnih reakcija CMT-a su očigledna, pri čemu je najveći broj pozitivnih reakcija utvrđen u maju, 91 (23,5%). Uporedimo li broj pozitivnih bakterioloških nalaza uočljivo je da je on veći nego u zimskom periodu. U martu je zabilježen najveći procenat bakteriološki pozitivnih nalaza, 18,8%. Nalaz iz aprila je interesantan po tome što su ispitivani uzorci dali najmanji postotak pozitivnih reakcija sa CMT kao i bakterioloških nalaza.

Vet. glasnik 63 (5-6) 359 - 367 (2009) N. Varatanović i sar.: Analiza infekcija mliječne žlijezde na osnovu rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza sekreta

Tabela 1. Uporedni prikaz rezultata bakteriološkog pregleda uzoraka mlijeka i Kalifornija mastitis testa (CMT) po godišnjim dobima /
Table 1. Comparative presentation of results of bacteriological examination of milk samples and the California mastitis test (CMT) according to the seasons of the year

Godišnje doba / Season	Mesec / Month	Broj pregledanih uzoraka / Number of examined samples	Bakteriološki negativno / Bacteriologically negative		Bakteriološki pozitivno / Bacteriologically positive		CMT pozitivno / CMT positive		CMT negativno / CMT negative	
			Broj / Number	%	Broj / Number	%	Broj / Number	%	Broj / Number	%
Zima / Winter	Decembar / December	194	103	84	31	16	43	21,1	151	77,9
	Januar / January	327	285	87,1	42	12,9	67	20,6	260	79,4
	Februar / February	244	206	84,4	38	15,6	43	17,6	201	82,4
Proleće / Spring	Mart / March	122	99	81,2	23	18,8	27	22,1	95	77,9
	April / April	240	207	86,3	33	13,7	51	21,2	189	77,8
	Maj / May	386	324	83,9	62	16,1	91	23,5	295	76,5
Leto / Summer	Juni / June	484	404	83,4	80	16,6	128	26,5	356	73,5
	Juli / July	513	405	78,9	108	21,1	155	30,2	358	69,8
	August / August	513	419	81,7	94	18,3	113	22,1	400	77,9
Jesen / Autumn	Septembar / September	513	433	84,4	80	15,6	125	24,3	388	75,7
	Oktober / October	102	81	79,4	21	20,6	23	22,5	79	77,5
	Novembar / November	225	188	83,5	37	16,5	43	19,2	182	80,8

Vet. glasnik 63 (5-6) 359 - 367 (2009) N. Varatanović i sar.: Analiza infekcija mliječne žlijezde na osnovu rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza sekreta

U ljetnom periodu (juni, juli i august) ishrana krava je bila kabasta sa zelenom masom uz dodatak manjih količina koncentrata. Od ispitanih 1510 uzoraka mlijeka najveći procenat pozitivnih reakcija CMT-a je bilo u julu, a nešto niži u junu i augustu.

Procenat pozitivnih bakterioloških nalaza se slično kretao rezultatima CMT-a. Najviše pozitivnih nalaza je bilo u julu, zatim u augustu dok je najniži procenat zabilježen u junu

Jesenji period predstavlja prelazno razdoblje u ishrani u kojem dolazi do postepenog prelaska sa ljetne na zimsku prehranu. Za vrijeme ovog perioda je ispitano 870 uzoraka mlijeka i primjećen je pad pozitivnih reakcija na CMT po mjesecima. Najveći broj pozitivnih reakcija utvrđen je u septembru, 125 (24,3%). Bakteriološki nalazi variraju u odnosu na nalaze CMT-a. Najveći procenat pozitivnih bakterioloških nalaza je bio u oktobru zatim novembru, a najmanji u septembru.

Od izolovanih bakterija u zimskom periodu najviše je bilo stafilokoka (7,8%), zatim streptokoka (3,8%), a u 2,4% slučajeva ostali uzročnici miješanih infekcija. Hemolitičnih stafilokoka je bilo podjednako u decembru i januaru, a najmanje u februaru. *Sc. agalactiae* je izolovan u najvećem procentu u decembru, a ostale streptokoke u februaru (tabela 2).

Kada je riječ o izolovanim bakterijama u proljetnom periodu najzastupljenije su bile nehemolitične stafilokoke, onda hemolitične stafilokoke, streptokoke te enterobakterije i korinebakterije. U najvećem broju slučajeva je utvrđena miješana infekcija.

Hemolitični stafilokoki su najčešći u maju, augustu i oktobru, a najrjeđi u februaru i martu. U oktobru su najčešće zabilježeni streptokoki, a najrjeđe u martu i septembru. Kada je riječ o streptokokama koje uzrokuju mastitise, najčešće su izolovane u julu, a zatim u avgustu i junu. Mješovitih infekcija je zabilježeno najviše u martu, a najmanje u junu i septembru.

Od izoliranih uzročnika u jesenskom periodu najviše su zastupljeni stafilokoki i streptokoki u oktobru, dok su drugi uzročnici mastitisa češći u septembru.

Rezultati CMT-a i bakteriološkog nalaza u toku godine ukazuju na to da je tokom ljeta najveći broj slučajeva poremećaja sekrecije, pozitivnih bakterioloških nalaza, a shodno tome i upala mliječne žlijezde. U ovom periodu su stafilokoke i streptokoke kao uzročnici oboljenja mliječne žlijezde izolovani u najvećem broju. Usporedbom dobivenih rezultata reakcija CMT-a i bakterioloških pretraga u toku godine vidi se podudarnost u 85,3% slučajeva. Bitno je napomenuti da je bilo uzoraka mlijeka koji su dali negativnu reakciju sa CMT-om, ali pozitivan bakteriološki nalaz i obrnuto.

Iz reakcija CMT-a i bakteriološkog nalaza po mjesecima vidna je podudarnost, pri čemu je najveći procenat pozitivnih reakcija testom zabilježen u martu, septembru i julu, a bakterioloških nalaza u martu, julu i oktobru.

Vet. glasnik 63 (5-6) 359 - 367 (2009) N. Varatanović i sar.: Analiza infekcija mliječne žlijezde na osnovu rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza sekreta

Tabela 2. Rezultati bakteriološkog ispitivanja uzoraka mlijeka pojedinih četvrti vimena krava tokom godine iskazani u procentima /
Table 2. Results of bacteriological examinations of milk samples of individual udder quarters of cows in the course of the year presented in percentages

Izolovani mikroorganizmi / <i>Isolated microorganisms</i>	Mesec u godini / <i>Month of the year</i>											
	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	Maj	Juni	Juli	Avg.	Sep.	Okt.	Nov.	Dec.
Negativni nalaz / <i>Negative finding</i>	87,1	84,4	81,2	86,3	83,9	83,3	78,8	81,7	84,4	79,3	83,5	84,0
Nehemolitične stafilocoke / <i>Nonhaemolytic staphylococci</i>	4,7	4,9	6,5	5,4	5,9	6,2	6,2	4,9	5,8	7,9	7,0	5,2
Hemolitične stafilocoke / <i>Haemolytic staphylococci</i>	3,1	2,5	2,5	3,3	3,9	3,1	2,8	3,9	2,0	3,9	3,6	3,1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,6	0,8	-	-	0,8	0,6	1,1	0,9	0,6	1,0	0,4	2,1
<i>Streptococcus uberis</i>	-	-	0,9	-	-	0,2	0,8	0,4	0,4	-	0,4	-
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	-	-	0,8	-	-	0,2	0,4	0,4	-	-	0,5
Ostali streptokoki / <i>Other streptococci</i>	2,1	3,3	1,6	2,5	2,1	2,7	3,3	2,5	1,7	4,9	3,9	2,1
Miješana infekcija / <i>Mixed infection</i>	2,4	2,5	4,8	-	3,4	2,0	2,2	2,8	1,5	2,9	-	2,5
<i>Enterobacteriae</i>		1,6	2,5	1,2		1,6	4,5	2,5	2,0	-	1,2	0,5
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	-	-	-	0,5	-	0,2	-	-	0,2	-	-	-
Broj ispitanih uzoraka / <i>Number of examined samples</i>	327	244	122	240	386	484	513	513	513	102	225	194

Vet. glasnik 63 (5-6) 359 - 367 (2009) N. Varatanović i sar.: Analiza infekcija mliječne žlijezde na osnovu rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza sekreta

Diskusija / Discussion

Dosadašnja nastojanja u suzbijanju mastitisa i kontrole zdravstvenog stanja mliječne žlijezde se zasnivaju na otkrivanju grla sa poremećenom sekrecijom i identifikacijom uzročnika takvih stanja. Da bi se spriječile i umanjile infekcije mliječne žlijezde patogenim bakterijama iz okoline neophodno je voditi brigu o kompletnom menadžmentu proizvodnje (Compton i sar., 2007; Kelmus i sar., 2006; Ferguson i sar., 2007) što i mi podupiremo.

Odnos podudarnosti reakcije CMT-a i bakteriološkog nalaza se kreće od 70 do 86% ovisno o vrsti uzročnika (Sanfordu i sar., 2006), dok Bastan i sar. (2008) iznose podatak podudarnosti od 85%. Navodi ovih autora se slažu sa rezultatima naših istraživanja, koji iznose 85,3%.

Kao najčešće izolirane uzročnike niz autora (Milne i sar., 2002; Bradley, 2002; Sol i sar., 2002; Schukken i sar., 1989; Fatur i sar., 2000; Dingvell i sar., 2003) navode stafilokoke i streptokoke, te koliformne bakterije, što je u saglasnosti sa rezultatima naših istraživanja.

Zaključak / Conclusion

Na osnovu analiza sekreta mliječne žlijezde kroz duži period CMT-om i bakteriološkom pretragom može se zaključiti:

1. Poremećaj sekrecije mliječne žlijezde je otkriven CMT-om u 23,5% slučajeva.
2. Procenat slaganja CMT-a i bakteriološkog nalaza je bio 85,3%.
3. CMT-om i bakteriološkim analizama je utvrđeno da se poremećaji sekrecije i upalna stanja mliječne žlijezde najčešće javljaju u ljetnom periodu, a najrijeđe u zimskom.
4. Najčešće su kao uzrok subkliničkih mastitisa dokazane stafilokoke 52,4%, zatim streptokoke 23,8%, miješana infekcija 13,1% i enterobakterije 10,3%.

Literatura / References

1. Aland A. Lüksikarja teryise seiremundel niny sellerakendamine loomade teruise hindamisel ja parandamisel. Agricultural University, Tarfu 2003.
2. Barkema HW, Van Der Ploeg JD, Schukken YH, Lam TJ, Benedictus G, Brand A. Management style and its association with bulk milk somatic cell count and incidence rate of clinical mastitis. J Dairy Sci 1999; 82: 1655-63.
3. Bastan A, Kacar C, Acar BD, Sahin M, Cengiz M. Investigation of the incidence and diagnosis of subclinical mastitis in early lactation period cows. Turk J Vet Anim Sci 2008; 32(2): 119-21.
4. Bennett RM, Christjansen K, Clifton-Hadley RS. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. J Dairy Res 1999; 66: 455-59.
5. Bradley AJ. Bovine mastitis: An evolving disease. Vet J 2002; 164: 116-28.

Vet. glasnik 63 (5-6) 359 - 367 (2009) N. Varatanović i sar.: Analiza infekcija mliječne žlijezde na osnovu rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza sekreta

6. Compton CW, Heuer C, Parker K, McDougall S. Epidemiology of mastitis in pasture grazed peripartum dairy heifers and its effects on productivity. *J Dairy Sci* 2007; 90(9): 4157-70.
7. De Viegheer S, Barkema HW, Stryhn H, Opsomer G, De Kruif A. Impact of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the first lactation. *J Dairy Sci* 2005; 88: 938-47.
8. Dingvell RT, Leslie KE, Schukken YH, Sargeant JM, Timms LL. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. *Can Vet J* 2003; 44: 413-6.
9. Estonian Veterinary and Food Laboratory: Animal report, Tartu 2004.
10. Fabre JM, Berthelot X, Bousquet E, Bosquet G, Laumonnier G, Seegers H. Traitement des mammites subcliniques en lactation: expérimentation d'un nouveau protocole dit "traitement en parallèle". *Bulletin des GTV* 1999; 1: 49-58.
11. Fatur B, Mavsar N, Verdnik M. Sezonska pojavnost subkliničkih mastitisa. XXII savjetovanje s međunarodnim učešćem. Pliva i stočarska proizvodnja, Govedarstvo. Supetar, 2000.
12. Ferguson JD, Azzaro G, Gambina M, Licitra G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily from 2000 to 2006. *J Dairy Sci* 2007; 90(12): 5798-813.
13. Fourichon C, Beudeau F, Bareille N, Seegers H. Incidence of health disorders in dairy farming systems in western France. *Livestock Prod Sci* 2001; 68: 157-70.
14. Hillerton JE. Mastitis therapy is necessary for animal welfare. *Bulletin of the IDF* 1998; 330: 4-5.
15. Jonsson P, Olsson SO, Olofson AS, Fätth C, Holmberg O, Funke H. Bacteriological investigation of clinical mastitis in heifers in Sweden. *J Dairy Res* 1991; 58: 179.
16. Kelmus P, Viltrop A, Aasmäe B, Kasr K. Occurrence of clinical mastitis primiparous Estonian dairy cows in different housing conditions. *Acta Vet Scand* 2006; 10. 1186/1751-0147-48-21.
17. Kossabiati MA, Esslemont RJ. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet J* 1997; 154: 41-51.
18. Leslie KE, Jansen JT, Lim GH. Opportunities and implications for improved on-farm cowside diagnostics. *Proc DeLaval Hygiene Symp* 2002; 147-60.
19. Milne MH, Barret DC, Fitzpatrick JL, Biggs AM. Prevalence and aetiology of clinical mastitis on dairy farms in Devon. *Vet Rec* 2002; 151: 241-3.
20. Myllys V. Staphylococci in heifer mastitis before and after parturition. *J Dairy Sci* 1995; 62: 51-60.
21. Oliver SP, Lewis MJ, Gillespie BE, Dowlen HH. Influence of prepartum antibiotic therapy on intramammary infections in primigravid heifers during early lactation. *J Dairy Sci* 1992; 75: 406-8.
22. Rodriguez-Zas SL, Gianola D, Shook GE. Evaluation of models for comatoc cell score lactation patterns in Holsteins. *Livest. Prod Sci* 2000; 67: 19-30.
23. Sanford CJ, Keffe GP, Sanchez J, Dingwell RT, Barkema HW, Leslie KE, Dohoo IR. Test characteristics from latent-class models of the California Mastitis test. *Prevent Vet Medicine* 2006; 77(1-2): 96-108.
24. Schukken YH, Smit JAH, Grommers J, Vandegeer D, Brand A. Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *J Dairy Sci* 1989; 72: 1900-6.
25. Sol J, Sampimon OC, Hartman E, Barkema HW. Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. *Vet Microbiol* 2002; 85: 241-9.

Vet. glasnik 63 (5-6) 359 - 367 (2009) N. Varatanović i sar.: Analiza infekcija mliječne žlijezde na osnovu rezultata Kalifornija mastitis testa i bakterioloških nalaza sekreta

26. Trinidad P, Nickerson SC, Alley TK. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonisation in unbred and primigravid dairy heifers. J Dairy Sci 1990; 73: 107.
27. Waage S, Hørk T, Rørø A, Aasland D, Hunshamar A, Ødegaard SA. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. J Dairy Sci 1999; 82: 712-9.

ENGLISH

ANALYSIS OF MAMMARY GLAND ACCORDING TO RESULTS OF CMT (CALIFORNIA MASTITIS TEST) AND BACTERIOLOGICAL FINDINGS IN SECRETION

N. Varatanović, Amela Katica, T. Mutevelić, Nadžida Mlačo, E. Hamzić

Health control of the mammary gland was conducted comparing results of CMT (California Mastitis Test) and bacteriological findings of milk samples during one year. A total of 3863 secretion samples of mammary glands were collected. There were 85.3% matches for CMT and bacteriological findings.

The most frequently isolated causative agents were: staphylococci (52.4%), streptococcus bacteria (23.5%), mixed infections (13.1%), and enterobacteria (10.3%). Secretions disorder and inflammations of mammary gland are most common for the warm period of the year, and very rare for the winter period. With permanent use of these two methods it is possible to obtain satisfactory results in order to get better milk production and health condition of the mammary gland.

Key words: mastitis, California Mastitis Test, cow

РУССКИЙ

АНАЛИЗ ИНФЕКЦИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ОСНОВЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КАЛИФОРНИЯ МАСТИТ ТЕСТА И БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ РЕЗУЛЬТАТОВ СЕКРЕТА

Н. Варатанович, Амела Катица, Т. Мутавелич, Наджида Млачо, Э. Хамзич

Контроль здоровья молочной железы в стаде чёрнопёстрых Восточно-Фризийских коров мы совершали сравнением результатов Калифорния мастит теста и бактериологических результатов образчиков молока в течение года. Совокупно проведены испытания и бактериологически осмотрен 3863 образчика секрета молочной железы. В 85,3% случаев утверждено совпадение результатов Калифорния мастит теста и бактериологических результатов. Как чаще всего изолированные возбудители стафилококки в 52,4% случаев, стрептококки в 23,5% случаев, смешанные инфекции в 13,1% и энтеробактерии в 10,3% случаев. Расстройство секреции и воспалительные состояния молочной железы являются чаще всего в летнем периоде, а реже всего в зимнем. Непрерывным употреблением этих двух методов возможно получить удовлетворительные результаты в улучшении количества и качества молока, да состояние здоровья молочной железы.

Ключевые слова: мастит, Калифорния мастит тест, корова

**STANDARDI DOBROBITI I BIOSIGURNOSTI NA FARMAMA
GOVEDA I SVINJA - USLOVI SMEŠTAJA I DRŽANJA
GOVEDA I SVINJA***

***WELFARE AND BIOSECURITY STANDARDS ON CATTLE AND PIG
FARMS - CATTLE AND PIG REARING CONDITIONS***

S. Hristov, B. Stanković, T. Petrujkić**

U radu se detaljno razmatraju osnovni elementi uslova smeštaja i držanja goveda i svinja u cilju formulisanja standarda dobrobiti i biosigurnosti. Ovi elementi, koji obuhvataju relevantne prostorne, mikroklimatske i higijenske uslove gajenja različitih kategorija goveda i svinja, definisani su na osnovu detaljnih jednogodišnjih istraživanja na 11 farmi goveda i 5 farmi svinja u našoj zemlji. Od prostornih uslova za formulisanje standarda dobrobiti i biosigurnosti u radu se naročito ističe značaj korektne izgradnje i redovnog održavanja higijene ležišta, boksova i ispusta. U formulisanju standarda dobrobiti i biosigurnosti naročita pažnja se posvećuje osobinama materijala koji se koriste za izgradnju zidova i ležišta staja, obezbeđenju površina za ležanje i mogućnostima kretanja u stajama i ispuštima koje zadovoljavaju fiziološke i etološke potrebe u skladu sa najnovijim naučnim saznanjima. Od mikroklimatskih faktora razmatra se značaj obezbeđenja odgovarajuće temperature, relativne vlažnosti i brzine strujanja vazduha. U radu se, pored navedenog, ističe značaj obezbeđenja odgovarajuće ventilacije u stajama radi očuvanja optimalnih mikroklimatskih uslova (uklanjanje čestica prašine i gasova neprijatnog mirisa). Od higijenskih uslova naglašava se redovno održavanje higijene stajskih površina i tela svih kategorija goveda i svinja.

U radu su izneti osnovni principi i kriterijumi za procenu nivoa dobrobiti i biosigurnosti. Na osnovu utvrđenih rezultata u jednogodišnjem istraživanju posebno se razmatraju mogućnosti korekcije uslova smeštaja i držanja goveda na farmama u našoj zemlji.

Ključne reči: goveda, svinje, uslovi gajenja, dobrobit, biosigurnost

* Rad primljen za štampu 08. 07. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Slavča Hristov, redovni profesor, mr sci. med. vet. Branislav M. Stanković, asistent, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr sci. med. vet. Tihomir Petrujkić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Vet. glasnik 63 (5-6) 369 - 379 (2009) S. Hristov i sar.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja

Uvod / Introduction

U stočarstvu i veterinarskoj medicini danas se sve veći značaj pridaje obezbeđenju dobrobiti životinja i biosigurnosti na farmama. Dobrobit životinja predstavlja stepen njihove prilagođenosti na uslove kojima se omogućavaju kvalitetna ishrana i napajanje, smeštajni prostor, fizička, psihička i termička udobnost, sigurnost, ispoljavanje osnovnih oblika ponašanja, socijalnih kontakata sa životinjama iste vrste, odsustvo neprijatnih emocionalnih i telesnih iskustava, kao što su bol, patnja, strah, stres, dosada, bolesti i povrede (Broom, 1996; Bracke, 2001; Hristov i sar., 2007b). Pri sveobuhvatnom definisanju stanja biosigurnosti na farmama, treba imati u vidu četiri povezana koncepta: planove biosigurnosti, procenu rizika na kritičnim kontrolnim tačkama (*Hazard Analysis and Critical Control Points – HACCP*), menadžment rizika i planove za urgentne situacije. Biosigurnosni planovi su namenjeni sprečavanju neželjenih situacija i unapređenju poslovanja farmi, a, u suštini, omogućavaju efikasnu preventivu bolesti (Uhlehoop, 2007).

Detaljan i ilustrativan opis dobrobiti i ponašanja goveda i svinja može se naći u delima Fräsera i Brooma (1990), Webstera (2005) i Vučinićeve (2006). Najnoviji podaci o dobrobiti životinja i biosigurnosti na farmama izneti su u radu Hristova i sar. (2008). Novi standardi o uslovima gajenja domaćih životinja razmatrani su i u radu Hristova (2003). Pored toga, uslovi gajenja, dobrobit i ponašanje farmskih životinja opisani su u radu Hristova i sar. (2006c). U revijalnom radu Hristova i sar. (2007c) izneti su najznačajniji aspekti pitanja zašto je potrebno obezbediti odgovarajuću dobrobit životinja u farmskim uslovima gajenja. Minimalni standardi o uslovima gajenja i dobrobiti goveda detaljno su opisani u radu Hristova i sar. (2007a), a o uslovima gajenja svinja u radu Petrovićeve i sar. (2007). Rezultati procene uslova smeštaja u našoj zemlji, sa osvrtom na dobrobit krava prikazani su u radu autora Hristova i Relićeve (2009), a mikroklimatski i higijenski uslovi gajenja goveda u poglavlju monografije autora Hristova i sar. (2006). Veoma korisni i iscrpni podaci o uticaju toplotnog stresa na proizvodnju mlečnih krava mogu se naći u revijalnom radu Hristova i sar., (2007). Rezultati procene uslova gajenja i dobrobiti muznih krava prikazani su u radovima Maksimovićeve i Hristova (2007) i Relićeve i sar. (2008). Najznačajniji propusti u obezbeđenju dobrobiti životinja na farmama goveda izneti su u radu Hristova i Stankovića (2009).

Higijenski uslovi gajenja svinja opisani su u knjizi Hristova (2002), higijenski standardi u uzgoju prasadi u radu Hristova i sar., (2006a), a primena određenih sredstava koja poboljšavaju uslove gajenja u radu Hristova i sar. (2006b). Biosigurnosne mere na farmama goveda u našoj zemlji razmatrane su u radu Hristova i sar. (2007a), a najčešći propusti u obezbeđenju biosigurnosti na farmama goveda i svinja u radu Stankovića i Hristova (2009).

Vet. glasnik 63 (5-6) 369 - 379 (2009) S. Hristov i sar.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja

Najznačajniji indikatori i parametri uslova gajenja /
Most important indicators and parameters of rearing conditions

Da bi se negativni uticaji na dobrobit životinja i biosigurnost na farmama, vezani za stajski način držanja životinja, sveli na najmanju moguću meru, neophodni preduslovi su detaljna analiza lokacije za podizanje staja, svrsishodno građevinsko projektovanje staja, izbor odgovarajućeg građevinskog materijala i korektna gradnja samih staja. Pri svemu tome treba voditi računa da se u stajama stvore uslovi za kvalitetan život životinja. Ovi uslovi treba da štite dobrobit životinja i biosigurnost na farmama i omogućavaju rentabilnu proizvodnju. Ni u kom slučaju uslovi u stajama ne smeju pogodovati nastajanju i širenju bolesti, kao i bilo kom drugom remećenju dobrobiti životinja i biosigurnosti na farmama (Fraser i Broom, 1990; Hristov 2002; Vučinić, 2006; Hristov i sar., 2008).

Staje treba da se grade na način koji omogućava lako i brzo obavljanje svih aktivnosti vezanih za držanje, ishranu, negu i proizvodnju životinja i da omogućuju lako čišćenje i dezinfekciju, kao i primenu svih drugih higijenskih mera u vezi sa eventualnom pojavom i suzbijanjem zaraznih i parazitskih bolesti. Zbog toga se naglašava potreba upoznavanja sa pojedinim, čisto tehničkim detaljima građenja staja, jer su oni od značaja sa stanovišta dobrobiti životinja i biosigurnosti na farmama (Hristov i sar. 2006).

U tabeli 1 navedeni su najznačajniji indikatori i parametri za ocenu uslova smeštaja i držanja, definisani na osnovu detaljnih jednogodišnjih istraživanja na 11 farmi goveda i pet farmi svinja u našoj zemlji. Pri formulisanju parametara i indikatora dobrobiti goveda korišćena su i saznanja Sandruma i sar. (1994), Bartusseka (2000), Brackea i sar., (2001), Keelinga i Veisseira (2005) i Blokhuisa (2008).

Detaljni podaci o izboru mesta za podizanje staja za goveda i svinja mogu se naći u knjizi Hristova (2002), a za podizanje staja za goveda i u poglavlju monografije Hristova i sar. (2006). Izbor mesta za podizanje staja u našoj zemlji razmatra se uglavnom na većim gazdinstvima, dok je na malim individualnim posjedima mesto za lokaciju staje većinom unapred određeno opštim planom naselja, položajem i veličinom okućnice i ekonomskim mogućnostima odgajivača. Izbor mesta treba da omogući propisno postavljanje staja za životinje, objekata za skladištenje hrane, deponija stajnjaka, osočnih jama i drugih neophodnih objekata. Pravilan izbor mesta za podizanje staja predstavlja osnovni preduslov za zaštitu dobrobiti životinja i biosigurnosti na farmama (Hristov i Relić, 2009).

Za podizanje staja za goveda i svinja najpovoljnija su suva i lako propusna zemljišta, s tim da se podzemna voda u njima nalazi na dubini od najmanje 2 m. Vlažne i močvarne terene treba izbegavati za lokaciju staja, a ako je to nemoguće ove terene treba najpre drenirati, odnosno potpuno osušiti, a eventualno i nasuti. Kotline, blizinu reka i šuma treba takođe izbegavati. Zemljište za lokaciju staja treba da bude krupnozrnasto, ali ni u kom slučaju čisti pesak ili šljunak (Hristov, 2002; Hristov i Relić, 2009).

Vet. glasnik 63 (5-6) 369 - 379 (2009) S. Hristov i sar.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja

Tabela 1. *Indikatori i parametri uslova gajenja /*
Table 1. Indicators and parameters of rearing conditions

Indikatori / <i>Indicators</i>	Parametri / <i>Parameters</i>
Mesto za podizanje staja / <i>Place for facility construction</i>	• Zemljište / <i>Soil</i> • Podzemna voda / <i>Ground water</i> • Mogućnost dobijanja hrane / <i>Possibility for securing forage</i> • Lokacija i raspored staja za životinje, deponija stajnjaka, osočnih jama, objekata za hranu i drugih neophodnih objekata / <i>Location and layout facilities, manure storage, drain pit, forage facilities etc.</i> • Nagib terena / <i>Court slope</i> • Izloženost suncu i hladnim vetrovima / <i>Sun and cold wind exposure</i> • Higijenski ispravna voda / <i>Clean water</i> • Postavljanje čeonog bočnog zida / <i>Front side facility orientation</i>
Prostorni i smeštajni uslovi / <i>Space and accommodation conditions</i>	• Zapremina staje / <i>Stable volume</i> • Površina staje / <i>Stable surface</i> • Tip ležišta / <i>Floor type</i> • Površina ležišta / <i>Floor space</i> • Kvalitet poda ležišta / <i>Floor quality</i> • Zidovi staja / <i>Stable walls</i> • Oprema za ishranu i napajanje / <i>Feeding and watering equipment</i> • Oprema za izdubavanje / <i>Manure removal equipment</i> • Nagib ležišta / <i>Floor slope</i> • Prostirka / <i>Bedding quality</i>
Mikroklimatski uslovi / <i>Microclimatic conditions</i>	• Temperatura / <i>Temperature</i> • Relativna vlažnost / <i>Relative humidity</i> • Brzina strujanja vazduha / <i>Air velocity</i> • Gasovi neprijatnog mirisa / <i>Noxious gases</i> • Prašina / <i>Dust</i> • Mikroorganizmi / <i>Microorganisms</i> • Buka i vibracije / <i>Noise and vibrations</i>
Higijenski uslovi / <i>Sanitary conditions</i>	• Mehaničko čišćenje / <i>Mechanical cleaning</i> • Sanitarno pranje / <i>Sanitary washing</i> • Dezinfekcija, dezinsekcija, deratizacija / <i>Disinfection, disinsection, deratisation</i> • Ventilacija / <i>Ventilation</i> • Kanalizacija / <i>Sewage</i>

Mesto za podizanje objekata treba da je nešto uzdignuto od okoline, uz blag nagib terena od 4%. Time se smanjuje mogućnost plavljenja i direktnog vlaženja staja. Zidovi podignutih staja na povišenom terenu su suvlji, a funkcionisanje kanalizacije znatno olakšano. Pri izboru terena za lokaciju staja treba voditi računa da objekti imaju što dužu insolaciju i da ne budu suviše izloženi delovanju hladnih vetrova. Od važnosti je, takođe, da u blizini objekata postoji higijenski ispravna voda u dovoljnoj količini za potrebe napajanja životinja, kao i za proizvodne i sanitarne potrebe. Za stvaranje povoljnih mikroklimatskih uslova u stajama od velikog značaja je pravac postavljanja frontalne duže osovine staje. Staja treba da bude pravilno postavljena u smislu da se što manje nekontrolisano

Vet. glasnik 63 (5-6) 369 - 379 (2009) S. Hristov i sar.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja

rashlađuje, odnosno njeni duži zidovi treba da budu što manje izloženi stalnim vetrovima. Pored toga, ona treba da u dovoljnoj meri omogućuje delovanje direktnih sunčevih zraka. Zbog toga, duža osovina staje treba da se postavi paralelno sa pravcem duvanja vetrova karakterističnih za dato klimatsko područje. U našem klimatskom području najpovoljniji je severoistočno-jugozapadni smer podužne ose staje. U principu, bočni zid staje može biti okrenut i prema istoku ili jugoistoku. U našem klimatskom području to su povoljni položaji, jer staje u jutarnjim časovima imaju dovoljno sunčeve svetlosti, koja obiluje ultravioletnim zracima, a vazduh nije suviše zagrejan. Jugozapadni i južni položaji pročelja su manje pogodni zbog suvišnog zagrevanja staje tokom leta. Sasvim zapadni položaj je takođe manje pogodan. Staje u tom položaju dobijaju suviše infracrvenih zraka na račun ultravioletnih, čija se zastupljenost smanjuje posle podne usled povećane količine prašine u vazduhu. Severni položaj je najnepovoljniji, jer isključuje direktnu sunčevu svetlost, a izlaže staju hladnim vetrovima i kišama. Severni položaj moguće je primeniti jedino za životinje u tovu. Od dominantnih i hladnih vetrova objekti moraju biti zaštićeni zelenim pojasom (Hristov, 2002; Hristov i sar., 2006).

Ležišta su, praktično, najznačajnije površine u staji, odnosno površine na kojima životinje provode najviše vremena. Od njihove veličine i načina izgradnje zavisi u velikoj meri dobrobit životinja i biosigurnost na farmama, odnosno zdravlje i proizvodnja životinja u celini. Podaci o veličini i načinu izgradnje ležišta mogu se naći u delu Hristova (2002;7), a i ocena ležišta u sklopu uslova smeštaja sa osvrtnom na dobrobit u radu Hristova i Relićeve, (2009). Pod ležišta za krave mora imati odgovarajući nagib prema kanalu radi oticanja mokraće (1-2%). Ako je pod hrapaviji nagib mora biti veći, dok glatki podovi dozvoljavaju blaži nagib. Suviše strmi nagib poda može imati za posledicu oboljenja tetiva i nepravilne stavove ekstremiteta, a u krava prolapsus vagine ili materice.

Danas su dobrobit i ponašanje svinja u različitim boksovima veoma česta pitanja (Fraser i Broom, 1990; Webster, 2005; Vučinić, 2006; Petrović i sar., 2007). Boksovi su praktično najznačajnije površine u stajama za svinje. Oni mogu biti postavljeni na različite načine, svrstani u jedan ili više redova i izgrađeni od različitog materijala. Pored toga, oni mogu biti različite veličine i obezbeđivati životinjama različit komfor. Problemi dobrobiti se uočavaju gotovo u svim boksovima za svinje u našoj zemlji, a tiču se fizičkog, termalnog i psihičkog komfora svinja, uskraćivanja nekih značajnih bihevioralnih potreba, naročito u domenu socijalnog i pretraživačkog ponašanja. Pored toga, neodgovarajuće biosigurnosne mere, naročito po pitanju sanitacije, često doprinose pojavi infektivnih bolesti, najčešće kod prasadi. Istraživanja pokazuju da se u našoj zemlji često nailazi na vrlo loše uslove gajenja čiji su uzroci neodgovarajuća kanalizacija i ventilacija (Stanković i Hristov, 2009). Podaci o veličini i načinu izgradnje boksova za različite kategorije svinja mogu se naći u delu Hristova (2002).

Za dobrobit životinja od mikroklimatskih faktora najznačajniji su temperatura, vlažnost, brzina strujanja vazduha, sunčevo zračenje sa svetlosnim ul-

Vet. glasnik 63 (5-6) 369 - 379 (2009) S. Hristov i sar.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja

travioletnim i toplotnim spektrom i toplotno zračenje, vazdušni pritisak, buka i vibracije. Gasovi najznačajniji za dobrobit životinja su kiseonik, ugljen-dioksid, amonijak, sumpor-vodonik, a od korpuskularnih zagađenja vazduha prašina i mikroorganizmi. Optimalne vrednosti za pojedine mikroklimatske faktore mogu se naći u delu Hristova (2002).

Optimalna temperatura vazduha u stajama za evropske rase goveda iznosi 8-18°C, za krmače i nerastove 10-18°C, nazimad 18-20°C i novorođenu prasad 32-22°C u zavisnosti od uzrasta. Optimalna relativna vlažnost vazduha u stajama za goveda i svinje uz malobrojne izuzetke iznosi od 65 do 70%. Najpovoljnija brzina strujanja vazduha u zoni ovih vrsta životinja iznosi od 0,3-0,5 m/s. Relativna vlažnost vazduha od 40 do 90% uz optimalnu temperaturu sredine ne utiče značajno na fiziološke reakcije i proizvodnju. Međutim, ako temperatura pređe optimalne vrednosti, uticaj većih vrednosti relativne vlage izrazitiji je od nižih vrednosti. Ako temperatura vazduha padne ispod optimalnih vrednosti, mora se nastojati da u stajskom vazduhu bude što niža relativna vlaga, jer vlažan vazduh povećava odavanje toplote (Hristov, 2002; Hristov i sar., 2006).

Kondicioniranje mikroklimе u zatvorenim stajama obavlja se dobrom termoizolacijom površina, grejanjem, ventilacijom i prikladnom populacijom životinja. Detaljan opis toplotnog balansa staja u zimskom i letnjem periodu iznet je u delu Hristova (2002).

Najmanja jačina osvetljenja u stajama u zavisnosti od vrste i kategorije životinja kreće se od 10 do 130 luksa. Na ležištu za odbijenu telad i junad najmanja jačina osvetljenja iznosi 10 luksa, a u porodilištu pri teljenju 130 luksa. Obično se u stajama za goveda preporučuju vrednosti od 30 do 50 luksa, osim u izmuzištu, gde se zahteva jačina osvetljenja od 100 luksa. U objektima za svinje najmanja jačina osvetljenja treba da iznosi 25 luksa na ležištu za krmače i nerastove i 70 luksa u prasilištu. Za ostale kategorije najmanja jačina osvetljenja kreće se od 20 do 50 luksa. Pored prirodne treba obezbediti i odgovarajuće veštačko osvetljenje (Hristov, 2002).

Radi očuvanja optimalnih mikroklimatskih uslova, naročito po pitanju uklanjanja čestica prašine i gasova neprijatnog mirisa, veliki značaj ima obezbeđenje odgovarajuće ventilacije u stajama. Od higijenskih uslova značajnih za dobrobit životinja i biosigurnost na farmama veliki značaj ima redovno održavanje higijene stajskih površina i tela svih kategorija goveda i svinja.

Principi i kriterijumi za procenu dobrobiti životinja izneti su u radovima Bartusseka i sar. (2000), Blockhiosa (2008), Webstera (2005) i Vučinićeve (2006). Dobrobit farmskih životinja se uglavnom procenjuje na osnovu: 1. kliničkog pregleda i utvrđivanja zdravstvenog statusa životinja (fiziološka, funkcionalna dobrobit), 2. ispitivanja ispoljenosti fizioloških oblika ponašanja i mogućnosti zadovoljenja urođenih životnih potreba (bihevioralna dobrobit), 3. ispitivanja prisustva pozitivnih emocija i odsustva negativnih emocija kod životinja (emocionalna dobrobit) i 4. ispitivanja pogodnosti uslova života - koji treba da odgovaraju vrsti, rasi, polu, starosnoj kategoriji i drugim osobinama farmskih životinja.

Vet. glasnik 63 (5-6) 369 - 379 (2009) S. Hristov i sar.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja

Najčešći propusti u obezbeđenju dobrobiti goveda i svinja na našim farmama ogledaju se u nepostojanju pisanog plana obezbeđenja dobrobiti i zdravstvenog stanja, zatim u neadekvatnim prostornim, mikroklimatskim i higijenskim uslovima gajenja, koji dovode do pojave tehnopatija i etopatija i smanjenja proizvodnih rezultata (Hristov i Stanković, 2009).

Na osnovu utvrđenih rezultata u našim istraživanjima može se konstatovati da postojeći nivo biosigurnosti uglavnom zadovoljava, ali postoje kritična mesta u tehnološkom procesu proizvodnje koja mogu omogućiti prodor infektivnih agenasa i ugrožavanja proizvodnje. Fragmenti koncepcije biosigurnosti generalno postoje, ali se uočava i nedostatak jasnih pisanih uputstava koja moraju postati uobičajena praksa u svakodnevnom radu i način rešavanja problema u ostvarivanju zadovoljavajućeg nivoa biosigurnosti (Stanković i Hristov, 2009).

Naučne strategije u oblasti stočarstva i veterinarske medicine u budućnosti će biti fokusirane na definisanje indikatora dobrobiti i biosigurnosti životinja, koji će biti primenjivani u cilju procene prihvatljivosti pojedinih tehnoloških procesa proizvodnje. Ovi indikatori treba da omoguće sagledavanje uslova gajenja koji će omogućiti svrsishodnu primenu biosigurnosnih mera, odgovarajući komfor i isključiti pojavu stanja koja su suprotna dobrobiti, kao što su stres, bol, anksioznost, frustracije, konflikti, averzije i patnje životinja. Stres uzrokovan socijalnim i sredinskim stresorima i njihovim interakcijama trebalo bi naučnim istraživanjima preciznije da se definiše, da bi se limitirali njihovi negativni uticaji na proizvodnu efikasnost i dobrobit životinja (Webster, 2005).

Zaključak / Conclusion

Na osnovu sagledavanja uslova smeštaja i držanja u cilju formulisanja standarda dobrobiti i biosigurnosti goveda i svinja može se zaključiti sledeće:

- na farmama goveda i svinja značajni indikatori dobrobiti i biosigurnosti su mesto lokacije staja, prostorni i smeštajni uslovi, mikroklimatski uslovi i higijenski uslovi u stajama;
- ležišta i boksovi su, praktično, najznačajnije površine u stajama, od čije veličine i načina izgradnje zavisi u velikoj meri dobrobit, zdravlje i proizvodnja životinja;
- mikroklimatski uslovi u stajama (temperatura, vlažnost, brzina strujanja vazduha, vazdušni pritisak, sunčevo zračenje, kiseonik, ugljen-dioksid, amonijak, sumpor-vodonik, prašina i mikroorganizmi, buka i vibracije) su veoma značajni parametri za dobrobit životinja i biosigurnost na farmama;
- naučne strategije u oblasti stočarstva i veterinarske medicine u budućnosti će biti fokusirane na definisanje indikatora dobrobiti i biosigurnosti životinja, koji će biti primenjivani u cilju procene prihvatljivosti pojedinih tehnoloških procesa proizvodnje.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENTS:

Rad je finansiran sredstvima projekta Ministarstva nauke TR 20110 Razvoj i implementacija standarda dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja

Vet. glasnik 63 (5-6) 369 - 379 (2009) S. Hristov i sar.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja

Literatura / References

1. Bartussek H, Leeb CH, Held S. Animal needs index for cattle. Federal Research Institute for Agriculture in Alpine Regions BAL Gumpenstein. Austria, 2000.
2. Blockuis JH. International cooperation in animal welfare: the Welfare Quality project®. Acta Vet Scand 2008; 50(1): 10.
3. Bracke MBM, Metz MHJ, Dijkhuizen AA, Spruijt MB. Development of a decision support system for assessing farm animal welfare in relation to husbandry systems: strategy and prototype. J Agric Environ Ethics 2001; 14: 321-37.
4. Bracke MBM. Modelling of Animal Welfare. PhD Thesis, Institute of Agricultural and Environmental Engineering, Wageningen, 2001; 150.
5. Broom DM. Animal welfare defined in terms of attempts to cope with the environment. Acta Agric Scand 1996; 27: 22, 28.
6. Fraser D, Broom DB. Farm animal behaviour and welfare. CAB International, Wallingford, Oxon, 1990.
7. Hristov S. Zoohigijena. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2002.
8. Hristov S, Bešlin R. Stres domaćih životinja. Monografija. Poljoprivredni fakultet. Beograd, 1991.
9. Hristov S, Relić R. Ocena uslova smeštaja sa osvrtom na dobrobit krava. Zbornik naučnih radova, Agroekonomik 2009; 3-4: 79-87.
10. Hristov S, Relić R, Joksimović-Todorović M, Davidović V. Mikroklimatski i higijenski uslovi gajenja goveda. Poglavlje u monografiji: Ostojić M. Zlatarski sir. Institut za ekonomiku poljoprivrede, Beograd, 2006; 55-78.
11. Hristov S, Stanković B, Joksimović Todorović M, Bojkovski J, Davidović V. Uticaj toplotnog stresa na proizvodnju mlečnih krava. Zbornik naučnih radova, Agroekonomik 2007; 13(3-4): 47-54.
12. Hristov S, Stanković B, Joksimović-Todorović M, Davidović V. Biosigurnosne mere na farmama goveda. Tematski zbornik "Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama", 1. Međunarodna konferencija o dobrobiti i biosigurnosti na farmama u Srbiji, Poljoprivredni fakultet-Beograd, 2007a; 259-69.
13. Hristov S, Stanković B, Relić R. Higijenski standardi u uzgoju prasadi. Zbornik radova 6. simpozijuma "Uzgoj i zaštita zdravlja svinja", Vršac, 17-24, 2006a.
14. Hristov S, Stanković B, Relić R, Joksimović-Todorović M. Dobrobit i biosigurnost na farmama. Biotehnologija u stočarstvu, 24, spec. izdanje 2008; 39-49.
15. Hristov S, Stanković B, Relić R, Todorović-Joksimović M, Davidović V, Novaković I. Primena Mistral-a TM u očuvanju zdravlja novorođene prasadi. Zbornik radova XVII savetovanja "Dezinfekcija, dezinsekcija i deratizacija u zaštiti životne sredine" sa međunarodnim učešćem, Morović, 2006b; 219-28.
16. Hristov S, Stanković B. Najznačajniji propusti u obezbeđenju dobrobiti životinja na farmama goveda i svinja. Zbornik naučnih radova, Agroekonomik 2009; 3-4: 95-102.
17. Hristov S, Vučinić M, Maksimović N, Stanković B. Minimalni standardi o uslovima gajenja i dobrobiti goveda. Tematski zbornik "Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama", 1. međunarodna konferencija o dobrobiti i biosigurnosti na farmama u Srbiji, Poljoprivredni fakultet, Beograd 2007b; 131-9.
18. Hristov S, Vučinić M, Relić R, Stanković B. Uslovi gajenja, dobrobit i ponašanje farmških životinja. Biotehnologija u stočarstvu 2006c; 22: 73-84.

Vet. glasnik 63 (5-6) 369 - 379 (2009) S. Hristov i sar.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja

19. Hristov S, Vučinić M, Stanković B. Zašto nam je potrebna dobrobit životinja. Tematski zbornik "Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama", 1. međunarodna konferencija o dobrobiti i biosigurnosti na farmama u Srbiji, Poljoprivredni fakultet, Beograd 2007c; 5-21.
20. Hristov S. Novi standardi o uslovima gajenja domaćih životinja. Zbornik radova Simpozijuma agroekonomista sa međunarodnim učešćem "Poljoprivreda i ruralni razvoj u evropskim integracijama", Beograd, 2003; 461-7.
21. Keeling L, Veissier I. Developing a monitoring system to assess welfare quality in cattle, pigs and chickens. In Science and society improving animal welfare. Welfare Quality conference proceedings 17/18 November 2005. Edited by: Butterworth A. Brussels, Belgium; 46-50.
22. Maksimović N, Hristov S. Procena uslova gajenja i dobrobiti muznih krava. Tematski zbornik "Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama", 1. međunarodna konferencija o dobrobiti i biosigurnosti na farmama u Srbiji, Poljoprivredni fakultet, Beograd 2007; 141-7.
23. Petrović M, Stanković B, Hristov S, Joksimović-Todorović M, Davidović V, Božić A. Minimalni standardi o uslovima gajenja i dobrobiti svinja. Tematski zbornik "Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama", 1. međunarodna konferencija o dobrobiti i biosigurnosti na farmama u Srbiji, Poljoprivredni fakultet, Beograd 2007; 173-85.
24. Relić R, Hristov S, Zlatanović Z, Stanković B, Joksimović-Todorović M, Davidović V. Procena dobrobiti muznih krava. Biotehnologija u stočarstvu, 24, spec. izdanje, 2008; 589-99.
25. Rousing T, Bonde M, Sorensen TJ. Indicators for the assessment of animal welfare in a dairy cattle herd with a cubicle housing system. In: Blokhuis, Ekel and Wechsler, Editors. Improving health and welfare in animal production, EAAP Publ vol. 102, Wageningen Pers Publ., Wageningen, The Netherlands, 2000; 37-44.
26. Rushen J, de Passille AMB. Behaviour, welfare and productivity of dairy cattle. Can J Anim Sci 1998; 78: 3-12.
27. Stanković B, Hristov S. Najčešći propusti u obezbeđenju biosigurnosti na farmama goveda i svinja. Zbornik naučnih radova, Agroekonomik 2009; 3-4: 103-10.
28. Sundrum A, Andersson R, Postler G. Animal needs index 200 - a guide for the assessment of housing systems, Köllen-Verlag, Bonn, Germany, 1994.
29. Uhlenhoop E. Plan biosigurnosti na stočarskim farmama. Tematski zbornik "Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama". 1. međunarodna konferencija o dobrobiti i biosigurnosti na farmama u Srbiji, Poljoprivredni fakultet, Beograd 2007; 227-38.
30. Vučinić M. Ponašanje, dobrobit i zaštita životinja. Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 2006.
31. Vučinić M, Hristov S. Poremećaji ponašanja kao pokazatelji grešaka u gajenju životinja. Biotehnologija u stočarstvu 2002; 18(5-6): 161-6.
32. Webster J. Animal Welfare: Limping Towards Eden. Blackwell Publishing, 2005.

Vet. glasnik 63 (5-6) 369 - 379 (2009) S. Hristov i sar.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja

ENGLISH

WELFARE AND BIOSECURITY STANDARDS FOR DAIRY COW AND PIG FARMS – CATTLE AND SWINE REARING CONDITIONS

S. Hristov, B. Stanković, T. Petrujkić

In this paper the essential elements concerning cattle and swine rearing and growing conditions were given in order to establish welfare and biosecurity standards. These elements were formed according to detailed annual investigations on 11 cattle and 5 swine farms and include relevant spatial, microclimate and hygienic conditions. In order to establish welfare standards, certain spatial conditions have higher importance, such as correct construction and maintenance of beds, pens and yards, and type and quality of materials used to build beds and walls. It is necessary to enable movement of animals in stables and yards as basic physiological and ethologic needs, according to latest scientific data. Also, optimal temperature, relative humidity and air velocity insuring have to be considered, as well as quality ventilation in order to establish and preserve optimal microclimate conditions. Also, it must be pointed out that hygiene maintenance of stable surfaces and animal bodies on a regular bases is essential.

Basic principles and criteria for welfare level assessment are given in this paper. According to results obtained in previous investigations, special attention is given to possibilities to correct rearing and growing conditions in cattle and swine farms in our country.

Key words: cattle, swine, rearing conditions, welfare, biosecurity

РУССКИЙ

СТАНДАРТЫ БЛАГОСОСТОЯНИЯ И БИОБЕЗОПАСНОСТИ НА ФЕРМАХ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СВИНЕЙ – УСЛОВИЯ РАЗМЕЩЕНИЯ И СОДЕРЖАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СВИНЕЙ

С. Христов, Б. Станкович, Т. Петруйкич

В работе детально рассматриваются основные элементы условий размещения и содержания крупного рогатого скота и свиней с целью формулировки стандартов благосостояния и биобезопасности. Эти элементы, охватывающие релевантные просторные, микролиматические и гигиенические условия разведения различных категорий крупного рогатого скота и свиней, определены на основе детальных однолетних исследований на 11 ферм крупного рогатого скота и пять ферм свиней в нашей стране. От просторных условий для формулировки стандартов благосостояния и биобезопасности в работе особенно подчёркивается значение корректного строительства и регулярного содержания гигиены лежбищ, боксов и выпасов. В формулировке стандартов благосостояния и биобезопасности особое внимание посвящается свойствами материалов, используемые для строительства стен и лежбищ хлевов, обеспечению поверхностей для лежания и возможностям движения в хлевах и выпасах, удовлетворяющие физиологические и этиологические нужды в соответствии с самыми новыми научными познаниями. От микрокли-

Vet. glasnik 63 (5-6) 369 - 379 (2009) S. Hristov i sar.: Standardi dobrobiti i biosigurnosti na farmama goveda i svinja – uslovi smeštaja i držanja goveda i svinja

матических факторов рассматривается значение обеспечения отвечающей температуры, релятивной важности и скорости струения воздуха. В работе, наряду с приведённым, выделяется значение обеспечения отвечающей вентиляции в хлевах ради сохранения оптимальных микроклиматических (убирание частиц пыли и газов неприятного запаха). От гигиенических условий делается ударение регулярное содержание гигиены хлевных поверхностей и тел всех категорий крупного рогатого скота и свиней.

В работе внесены основные принципы и критерии для оценки уровня благосостояния и биобезопасности. На основе утверждённых результатов в одно-летнем исследовании отдельно рассматриваются возможности коррекции условий размещения и содержания на фермах крупного рогатого скота в нашей стране.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, свиньи, условия разведения, благосостояние, биобезопасность

MOŽDANI NATRIJUMURETIČNI PEPTID: DIJAGNOSTIČKI POTENCIJAL KOD PASA*

BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE: DIGANOSTIC POTENTIAL IN DOGS

Ljubica Spasojević Kosić**

Endokrina uloga srca ogleda se u lučenju noradrenalina i natrijum-uretičnih peptida. Lučenje natrijumuretičnih peptida predstavlja koristan mehanizam za različita stanja srčane disfunkcije. Moždani natrijumuretični peptid (BNP) je u humanoj kardiologiji prihvaćen kao biomarker srčane insuficijencije i koronarne arterijske bolesti. Specifičnost strukture BNP-a vezana je za vrstu, pa se za ispitivanje dijagnostičkog i prognostičkog potencijala kod pasa zahteva postojanje testa koji je homologan za ovu životinjsku vrstu. Postojanje adekvatne metode merenja koncentracije BNP-a omogućava njegovu primenu kao skrining testa u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Ključne reči: srčana oboljenja, srčana insuficijencija, dijagnostika, BNP, pas

Srce kao sekretorni organ / *Engleski*

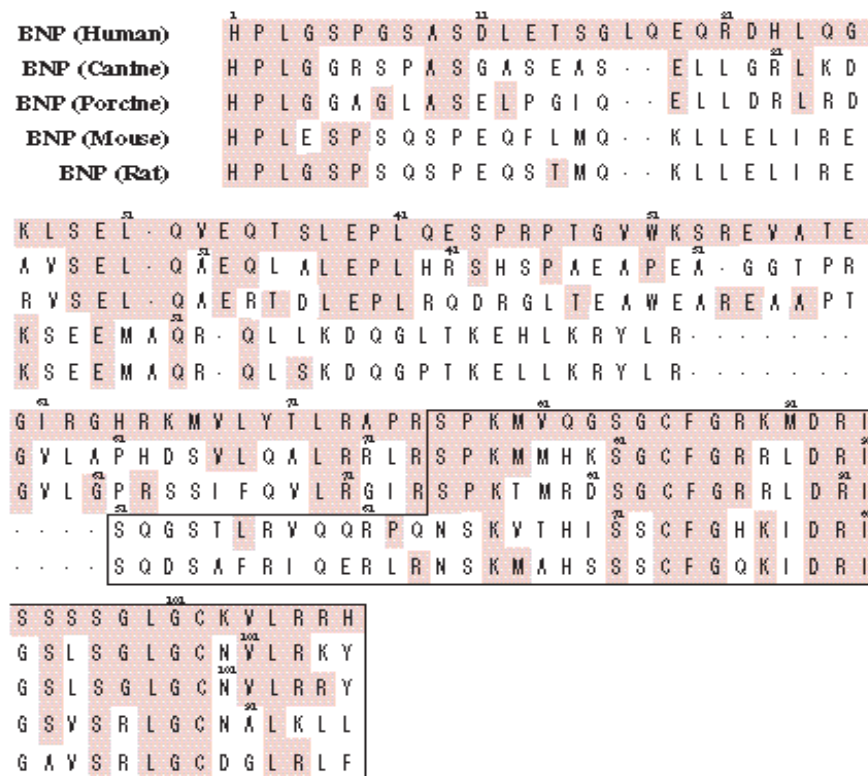
Srce ne posmatramo samo kao pumpu, već ovaj organ pored kontraktilne uloge poseduje i endokrinu ulogu. U srcu se obavlja sinteza i oslobađanje noradrenalina (Baunwald i sar., 1964). Osim toga, hormonalna aktivnost srca ostvaruje se i preko natrijumuretičnih peptida. Ispitivanja sprovedena pedesetih godina prošlog veka su pokazala da pretkomore srca sisara sadrže granule koje morfološki podsećaju na sekretorne granule u endokrinim ćelijama (Kirsh, 1956). Razumevanje njihovog funkcionisanja počelo je sa dokazivanjem njihovih natrijumuretičnih, diuretičnih i vazodilatatornih efekata (deBold i sar., 1981), a potom je usledila i njihova izolacija (Kanagawa i Matsuo, 1984; Sudoh i sar., 1988; Sudoh i sar., 1990). Otkriće natrijumuretičnih peptida je obeležilo poslednju deceniju dvadesetog veka i izazvalo najveći pomak u kardiologiji od uvođenja ehokardiografije kao dijagnostičke metode.

* Rad primljen za štampu 10. 07. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Ljubica Spasojević Kosić, asistent, Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijumuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

Porodicu natrijumuretičnih peptida sačinjavaju tri posebna peptida: natrijumuretični peptid tip A (ANP), natrijumuretični peptid tip B (BNP) i natrijumuretični peptid tip C (CNP). ANP je peptid koji se sastoji od 28 aminokiselina, a njegova sekrecija se odvija na nivou pretkomora. Natrijumuretični peptid tip A deluje kao srčani hormon sa raznovrsnim fiziološkim dejstvima uključujući natrijumuazu, diurezu, vazorelaksaciju i inhibiciju sekrecije renina i aldosterona (Nakao i sar., 1992). BNP je peptid sačinjen od 32 aminokiseline, koji pokazuje strukturnu i biološku sličnost sa ANP. Sinteza i sekrecija ovog srčanog hormona se odvijaju na nivou pretkomora i komora (Mukoyama i sar., 1991; Ogawa i sar., 1991). CNP je peptid koji se sastoji od 22 aminokiseline i pokazuje strukturnu sličnost sa srčanim hormonima ANP i BNP (Komatsu i sar. 1991). Natrijumuretični peptid tip C je široko rasprostranjen na nivou vaskularnog endotela (Espiner, 1994) i ima značajnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa (Clavell i sar., 1993).



M.E. Steinhilber, *Circulation Research* 72, NO. 5, 984 (1993)

Slika 1. Aminokiselinski niz prohormona BNP različitih životinjskih vrsta. Zasencene oblasti predstavljaju regije homologije /
Figure 1. Amino acid sequence of BNP prohormones of different animal species. Framed regions present homologue regions

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijumuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

Karakteristika peptida porodice natrijumuretičnih peptida je da se sintetisu u obliku preprohormonskih formi. Od preprohormonskog oblika ovih peptida u endoplazmatskom retikulumu dolazi do odvajanja malog peptida, a potom se kao prohormoni deponuju u citoplazmatskim granulama. Posle oslobađanja proforme se cepaju kako bi se proizvele aktivne forme (C – terminalne aminokiseline (aa)) i N – terminalni peptidni fragmenti.

Nivoi peptida u cirkulaciji regulišu se preko vezivanja za receptore i neutralne endopeptidaze. Postoje tri transmembranska receptora za natrijumuretične peptide (NPR-A, NPR-B, NPR-C). Natrijumuretični peptidi se najviše vezuju za receptor A, budući da on vezuje i ANP i BNP, dok se za receptor B vezuje CNP. Vezivanje za receptore A i B dovodi do stvaranja intracelularnog cGMP, čime se ostvaruju kardiovaskularni i renalni efekti peptida. Ovi receptori se u značajnom iznosu nalaze u endotelnim ćelijama bubrega i srca, kao i vaskularnim glatkomišićnim ćelijama. Suprotno receptorima A i B, NPR-C deluje kao receptor klijrensa. Vezivanjem za ovaj receptor stvara se NPR-C ligand kompleks, koji podleže endocitozi i degradaciji. Drugi put eliminacije natrijumuretičnih peptida obavlja se preko neutralnih peptidaza koji se nalaze u renalnim tubulima i vaskularnom endotelu (Koller, Goeddel, 1992).

Aminokiselinski niz i od ANP i od CNP je u visokom stepenu očuvan među vrstama, dok struktura BNP u mnogome varira. Zbog nepostojanja homologije između vrsta za natriuretični peptid B, istraživači su se fokusirali na kloniranje za vrstu specifičnih gena i definisanje nukleotidne i aminokiselinske strukture peptida. Komplementarna DNK sekvenca psećeg BNP je determinisana (Asano i sar., 1999a). Prijavljeno je postojanje visokog stepena homologije BNP za pse, krave, svinje i ovce (Aitken i sar. 1999).

Natrijumuretični peptid B (BNP) / *Sodiumuretic peptide B (BNP)*

Mada je natrijumuretični peptid tip B (BNP, brain natriuretic peptide) inicijalno izolovan iz mozga (Sudoh i sar., 1988), on se u većoj meri oslobađa na nivou srčanih komora (Turk, 2000) kao odgovor na stimuluse slične onima kod ANP (povećanje pritiska i istezanje komora). Tenzija, naprezanje zida komore (stres zida srčane šupljine) je faktor koji najviše određuje sintezu i sekreciju BNP (Magga i sar., 1998). I mehaničko istezanje i povećanje pritiska indukuju ekspresiju gena BNP i povećanje njegove sekrecije (Magga i sar., 1994; Liang i sar., 1997). Indukcija proizvodnje BNP odvija se direktno mehaničkim rastezanjem (zida komora) i/ili preko neurohumoralne stimulacije (posredstvom reninangiotenzinaldosteron i endotelina 1) (Liang i sar., 1997; Liang i Gardner, 1998).

Regulacija sinteze BNP u pretkomorama i komorama je različita (Bianciotti i de Bold, 2001). Sekrecija BNP iz ćelija komora odvija se brzo posle sinteze, dok se u pretkomorama BNP deponuje u granulama i oslobađa kontrolisanim mehanizmima (regulatornim putevima) (Nakagawa i sar., 1995). Endotelin 1 (ET-1) prouzrokuje ventrikularnu, ali ne i atrijalnu sintezu BNP kod hipertenzivnih pacova

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijumuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

(Bianciotti i de Bold, 2000). Kod zdravih pasa srčani BNP, iRNK i BNP tkiva srca je atrijalnog porekla. U ranoj disfunkciji leve komore, BNP, iRNK i tkivni BNP su značajno povećani u levoj pretkomori zajedno sa povećanjem cirkulirajućeg BNP, ali ostaje ispod granica ili pri granici detekcije u levoj komori. Kod manifestne CHF, BNP i iRNK se dalje povećava u levoj pretkomori i u levoj komori zajedno sa povećanjem tkivnog BNP leve komore i daljeg povećanja cirkulirajućeg BNP (Luchner i sar., 1998). Aktivacija transkripcije BNP je jedna od najranijih i najpouzdanijih markera hipertrofije ventrikularnih kardiomiocita (Liang i sar., 2001). Ventrikularna sekrecija BNP se takođe povećava sa povećanjem ozbiljnosti disfunkcije leve komore (Yasue i sar., 1994).

Ekspresija BNP i iRNK pasa je otkrivena ne samo u pretkomorama već i u komorama zahvaćenim infarktom. Sinteza psećeg BNP se povećava zajedno sa ishemičnim oštećenjem miokarda, pa BNP kod pasa može da se koristi kao indikator ozbiljnosti oštećenja miokarda komora (Asano i sar., 1999b).

BNP je prisutan i proizvodi se u kulturi psećih fibroblasta srca, gde smanjuje sintezu kolagena i povećava metalproteinaze matriksa preko cGMP-protein kinaze G. Mada je teško utvrditi biološke i kliničke implikacije ovakvih *in vitro* nalaza, ovi rezultati obezbeđuju uvid u antifibrotična svojstva srčanog hormona BNP i njegovog signalnog sistema, koja mogu da budu značajna u progresiji srčane insuficijencije. Ovakvi *in vitro* nalazi govore u prilog ulozi BNP u regulaciji strukture miokarda preko kontrole funkcije srčanih fibroblasta (Tsuruda i sar., 2002).

Primarni direktni biološki efekat BNP je proizvodnja natrijumureze u proksimalnim i distalnim renalnim tubulima (Nakao i sar., 1992). Koncentracija natrijuma u plazmi je usko povezana sa volumenom plazme. Angiotenzin II (All) stimuliše sekreciju aldosterona, koji potom stimuliše reabsorpciju natrijuma u bubrezima, što je praćeno povećanjem volumena plazme. Ovo povećanje prouzrokuje distenziju srčanih mišića i oslobađanje ANP i BNP. Hormoni ANP i BNP stimulišu natrijumurezu, a time i redukciju volumena plazme. Na taj način su natrijum plazme i volumen plazme pod dvostrukom hormonalnom kontrolom (Velle, 2002).

BNP inhibira sekreciju ET-1 i renina, čime prouzrokuje sekundarno smanjenje All i koncentracije aldosterona (Woods i Jones, 1999). Posledično, on proizvodi sekundarne biološke efekte koji obuhvataju vazodilataciju i natrijumurezu (Nishida i sar., 1990). Natrijumuretični peptidi takođe poseduju antiproliferativna svojstva u mezangijalnim ćelijama bubrega, astrocitima, endotelijalnim ćelijama, srčanim fibroblastima, vaskularnim glatkomišićnim ćelijama i kardiomiocitima (Calderone i sar., 1998). BNP inhibira sintezu kolagena, verovatno preko inhibicije ET-1 (Ogawa i sar., 2001).

Povišena koncentracija BNP i proBNP u krvi ne znači nužno i srčanu insuficijenciju, već može proizilaziti iz srčane ishemije. Ishemija miokarda prouzrokuje povećanje koncentracije BNP i proBNP. Efekat akutne hipoksije miokarda može da se registruje merenjem proBNP koncentracije u plazmi. BNP je moćan

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijumuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

vazodilatator na nivou koronarnih krvnih sudova. Hipoksijom indukovano povećanje u ekspresiji BNP gena ima teleološki smisao, ako BNP funkcioniše kao parakrini mehanizam da poveća lokalno snabdevanje krvlju hipoksične oblasti. Na taj način, čak i skromno povećanje ekspresije gena za BNP može da ima značajnu lokalnu funkciju. Ovo može delimično da objasni zašto koncentracija pro BNP u plazmi predstavlja prognostički faktor za srčanu smrt, čak i kod pacijenata bez srčane disfunkcije (Goetze i sar., 2003; 2004).

Srčani biomarkeri / *Cardiac biomarkers*

Biološki marker ili biomarker je karakteristika koja se objektivno meri i procenjuje kao indikator normalnih bioloških procesa, patogenih procesa ili farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju. Kao srčani biomarkeri su se pokazale supstance koje su uključene u sistemski neurohumoralni odgovor na srčanu insuficijenciju (natriuretični peptidi, angiotenzin II i endotelin) ili supstance koje se oslobađaju iz tkiva miokarda kao odgovor na oštećenje (kreatin kinaza izoenzimi i troponini). U humanoj medicini došlo je do prave revolucije u upotrebi biomarkera za dijagnostiku srčanih oboljenja i srčane insuficijencije.

Na polju veterinarske medicine nalazimo se na početku ispitivanja srčanih biomarkera. Mada ljudi predstavljaju pogodan i dobro izučavan model za naše pacijente, postoji fundamentalna razlika između vrsta: razlike između bolesti koje ih zahvataju, a koje su karakteristične za pse kao vrstu, razlika u strukturi određenih molekularnih markera, moguće razlike u prirodi i redosledu aktivnosti neurohumoralnog odgovora (Boswood, 2004).

Koristan biomarker, koji bi se upotrebljavao u ispitivanju životinja sa oboljenjem srca, treba da nas snabde informacijama koje mogu da se koriste da poboljšaju naše razumevanje bolesnog procesa ili da pomogne tretman individualnih pacijenata. Biomarker može da se koristi da pomogne u dijagnostici bolesti, određivanju stadijuma bolesti, identifikaciji subpopulacije koja zahteva specifičnu intervenciju, prepoznavanju odgovora na određenu terapiju ili da pomogne u prognozi (Boswood, 2004).

Srčano oboljenje može da bude asimptomatsko tokom različitog vremena. Važeća sredstva u dijagnostici kardiovaskularnih oboljenja obuhvataju radiografiju, koja je neegzaktna i subjektivna pri interpretaciji, i ehokardiografiju, koja zahteva sofisticiranu opremu i interpretaciju od strane specijaliste. Razvoj pouzdanog, jednostavnog, jeftinog skrining testa za dijagnostiku srčanih oboljenja kod pasa i mačaka, mogao bi da potvrdi potrebu sprovođenja daljeg ispitivanja (npr. ehokardiografije) (Sisson, 2000, 2001; Archer, 2003).

Mesto BNP u kliničkoj praksi / *Place of BNP in clinical practice*

Ispitivanja na ljudima su dokazala dijagnostički i prognostički značaj natrijumuretičnog peptida tipa B (BNP i NT-proBNP) kod srčane insuficijencije,

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijumuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

asimptomatske disfunkcije leve komore, dijastolne disfunkcije srca, kao i poremećaja funkcija desne komore. Natrijumuretični peptid tip B (BNP) je prihvaćen u humanoj medicini kao biomarker srčane insuficijencije i ishemije/hipoksije miokarda (Matunović i sar., 2005). Sa druge strane, ispitivanja obavljena u veterinarskoj medicini su mnogo manjeg obima i po broju ispitivanja i po broju životinja na kojima su ispitivanja sprovedena.

Dijagnostički značaj BNP kod pasa / Diagnostic significance of BNP in dogs

Klinička ispitivanja kod King Čarls španijela, rase sa predispozicijom za mitralnu regurgitaciju, pokazala su postojanje povećanja koncentracije BNP-a samo kod pasa sa dekompenzovanom srčanom insuficijencijom, sa dvostruko višom koncentracijom ovog peptida u odnosu na zdrave pse. Primarni faktor, koji je uticao na koncentraciju sva tri ispitivana peptida (ANP, NT-proANP i BNP) bila je veličina leve pretkomore i komore. Međutim, NT-proANP i ANP predstavljaju pouzdane parametre od BNP za kardiomegaliju ili srčanu insuficijenciju izazvanu mitralnom regurgitacijom (Häggström i sar., 2000).

Nasuprot ovome, ispitivanja sprovedena na psima različitih rasa sa mitralnom regurgitacijom zbog mitralne endokardioze (MacDonald i sar., 2003) su utvrdila postojanje visoke koncentracije BNP u plazmi kod pasa sa umerenim do ozbiljnim miksotomnim oboljenjem mitralne valvule (MVD) u odsustvu kongestivne srčane insuficijencije (CHF). Koncentracija BNP u plazmi se dalje povećavala sa kongestivnom srčanom insuficijencijom. Postojalo je minimalno preklapanje u koncentraciji BNP u plazmi kod normalnih pasa i pacijenata sa umerenim do ozbiljnim oboljenjem mitralne valvule, ali bez CHF. Vrednost koncentracije BNP u plazmi od 23 pg/ml obezbeđuje najbolju senzitivnost i specifičnost u odvajanju zdravih od obolelih jedinki. Koncentracija BNP u plazmi veća od 35 pg/ml je bila umereno senzitivna i specifična za diferenciranje pasa koji nisu bili u srčanoj insuficijenciji od pasa sa kongestivnom srčanom insuficijencijom.

Prva studija koja je ispitivala koncentraciju ANP i BNP u plazmi kod specifičnog asimptomatskog poremećaja srca kod pasa, bilo je ispitivanje kardiomiopatije kod mišićne distrofije zlatnih retrivera (GRMD - Golden Retriever Muscular Dystrophy) (Chetboul i sar., 2004). Kao i kod Duchenne distrofije kod ljudi, GRMD kardiomiopatija inicijalno se karakteriše nekrozom miokarda, a potom regeneracijom i zamenom mišićnog tkiva fibroznim tkivom, mastima i mineralima. Ovakve promene mogu da se jave veoma rano, već od trećeg meseca po rođenju psa (Valantine i sar., 1988; Valantine i sar., 1989). Sekundarna sistolna disfunkcija, dilatacija leve komore i kongestivna srčana insuficijencija se razvijaju u kasnom stadijumu bolesti, tako da postoji relativno duga asimptomatska faza bolesti od nekoliko meseci do godina (Valantine i sar., 1988).

Vrednosti koncentracije ANP nemaju značaja u ranoj dijagnostici GRMD kardiomiopatije, ali je koncentracija BNP u plazmi značajno povećana u okultnoj kardiomiopatiji kod GRMD. Povećanje koncentracije BNP u plazmi se

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijurmuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

dešava pre bilo kakvog kliničkog simptoma srčanog oboljenja (Chetboul i sar., 2004) i pre promena ehokardiografskih parametara (Chetboul i sar., 2004). Pretpostavlja se da ovakvo odstupanje može da bude u vezi sa suptilnim promenama u funkciji miokarda koje se ne mogu identifikovati putem konvencionalnih imidžing metoda. Ovakva hipoteza je podržana nedavnim ispitivanjima kod ljudi (Giglioli i sar., 2003; Agretto i sar., 2002) i GRMD pasa (Chetboul i sar., 2001; Chetboul i sar., 2002), koja prijavljuju da ultrazvučne tkivne karakterizacije i dopler imidžing miokarda mogu da pokažu abnormalnosti pre pojave promene u morfologiji leve komore. Senzitivnost i specifičnost koncentracije BNP u plazmi za identifikaciju GRMD pasa nije bila veoma visoka kod svih ispitivanih pasa (senzitivnost od 57% i specifičnost od 93%), sa vrednošću koncentracije BNP u plazmi od 65 pg/ml, koja odvaja obolele od zdravih pasa. Dijagnostički potencijal koncentracije BNP u plazmi zavisi od obima srčanih alteracija (Chetboul i sar., 2004), za koje se zna da zavise od starosti GRMD pasa (Moise i sar., 1991; Valentine i sar., 1988; Valentine i sar., 1989).

Merenje koncentracije BNP u krvi može da posluži kao skrining za subkliničku (okultnu) dilatacionu kardiomiopatiju (DCM) kod pasa. Koncentracije BNP koje su veće od 6,21 pg/ml imaju senzitivnost od 92,5% i specifičnost od 61,9% u identifikaciji pasa sa okultnom DCM (Oyama i sar., 2007).

Ispitivanja na psima su takođe pokazala klinički značaj merenja koncentracije BNP-a u otkrivanju uzroka dispnoje i određivanju da li je ona srčanog ili nesrčanog porekla (Prošek i sar., 2007; DeFrancesco i sar., 2007). Kod pasa sa dispnojom nesrčanog porekla koncentracija BNP je bila 12,18 pg/ml (10,91 – 16,17 pg/ml), dok je kod pasa sa dispnojom srčanog porekla koncentracija iznosila 34,97 pg/ml (23,51 – 52,02 pg/ml) (Prošek i sar., 2007).

Dosadašnja ispitivanja koncentracije BNP kod pasa navode različite koncentracije kod različitih rasa pasa, ali se razlikovala i metodologija merenja koncentracije BNP. Ovo ukazuje na potrebu sistematizacije rezultata i utvrđivanja pozitivne vrednosti za dokazivanje postojanja disfunkcije miokarda ili srčane insuficijencije, odnosno utvrđivanje negativne vrednosti koja bi isključila postojanje disfunkcije srca. S obzirom na težnju da se ispitivanje koncentracije BNP koristi kao skrining na osnovu čega bi se životinje upućivale na dalje dijagnostičke pretrage, veliki značaj u veterinarskoj kardiologiji bi imalo ispitivanje koje bi obuhvatilo veliki broj pasa po rasama.

Određivanje koncentracije BNP kod pasa u većini dosadašnjih ispitivanja sprovedena su korišćenjem radioimunotesta (RIA). Način prikupljanja, priprema i čuvanje uzoraka do analiza, kao i posebne laboratorije koje se zahtevaju za izvođenje RIA metoda ne idu u prilog brzom dijagnostici. Određivanje koncentracije BNP pomoću enzimoimunosorbentnog testa (ELISA) specifičnog za pse omogućavaju razvoj brzog skrining testa (DeFrancesco i sar., 2007).

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijumuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

*Druge mogućnosti primene BNP u kliničkoj praksi /
Other possibilities for BNP application in clinical practice*

Određivanje koncentracije BNP kod pasa značajno je za definisanje rizika za pojavu oboljenja, prognoze bolesti i optimalnog delovanja lekova kod pasa sa srčanim oboljenjima. Jedino veterinarsko ispitivanje, koje je ispitivalo BNP kao prognostički indikator smrti od kardiovaskularnog oboljenja, pokazalo je da što je bila veća koncentracija BNP to je učestalost pojavljivanja smrti bila viša kod pasa. Doza-odgovor odnos između koncentracije BNP u plazmi i tendence uginjavanja jedinki u okviru 4 meseca (kratkotrajno preživljavanje) je nađen: za svako povećanje koncentracije BNP od 10 pg/ml mortalitet se povećava aproksimativno 44%. Nije postojala veza između koncentracije BNP u plazmi i dugotrajnog preživljavanja od 18 meseci nakon inicijalne dijagnoze (MacDonald i sar., 2003).

Korisni kompenzatorni efekti natrijumuretičnih peptida suprotstavljaju se štetnim efektima drugih hormona, kao što su noradrenalin, All, aldosteron, ET-1 i vazopresin. Tokom ranih stadijuma srčane insuficijencije kompenzatorni mehanizmi su tako uspešni da oko 50% pacijenata sa disfunkcijom leve komore nema kliničke simptome. Tokom kasnijih stadijuma srčane insuficijencije, kao i u dekompenzovanim stanjima (akutna srčana insuficijencija) ravnoteža neurohormonalnih mehanizama se pomera prema povišenju nivoa medijatora koji dovode do kongestije i redukovane perfuzije. Koristan tretman korišćenjem sistema natrijumuretičnih peptida ostvaruje se inhibicijom neutralne endopeptidaze i egzogenom aplikacijom sintetskih ANP i BNP (Burnett, 2005; Kalra i Coats, 2002). Pozitivni efekti, naročito u pogledu terapije srčane insuficijencije, koronarne arterijske bolesti i hipertenzije, već su postignuti u kliničkim ispitivanjima kod ljudi, ali i na psima koji su u ispitivanjima poslužili kao eksperimentalni model (Lisy i sar., 2001; Chen i sar., 2006).

Literatura / References

1. Baunwald E, Harrison DC, Chidsey CA. The heart as an endocrine organ. Am J Med 1964; 36:1-4.
2. Kirsh B. Electronmicroscopy of the atrium of the heart. Guinea pig. Exp Med Surg 1956; 14: 99-112.
3. deBold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrialmyocardial extract in rats. Life Sci 1981; 28: 89-94.
4. Kanagawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of α -human natriuretic polypeptide (α -hANP). Biochem Biophys Res Commun 1984; 118: 131-9.
5. Sudoh T, Kanagawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. Nature 1988; 332: 78-81.

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijumuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

6. Sudoh T, Minamino N, Kanagawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 863-70.
7. Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of natriuretic peptide system I: Natriuretic peptides. *J Hypertension* 1992; 10: 907-12.
8. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kamabayashi Y, Inouye K, Imura H. Brain natriuretic peptide (BNP) as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 1991; 87: 1402-12.
9. Ogawa Y, Nakao K, Mukoyama M, Hosoda K, Shirakami G, Arai H, Saito Y, Suga S, Jougasaki M, Imura H. Natriuretic peptides as cardiac hormones in normotensive and spontaneously hypertensive rats. The ventricle is a major site of synthesis and secretion of natriuretic peptide. *Circ Res* 1991; 69: 491-500.
10. Komatsu Y, Nakao K, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Arai H, Shirakami G, Hosoda K, Nakagawa O, Hama N. C-type natriuretic peptide in rats and human. *Endocrinology* 1991; 129: 1104-6.
11. Espiner EA. Pathophysiology of natriuretic peptide. *J Intern Med* 1994; 235: 527-41.
12. Clavell AL, Stingo AJ, Wei C-M, Heublein DM, Burnett J CJr. C-type natriuretic peptide: a selective cardiovascular peptide. *Am J Physiol* 1993; 264: R590-4.
13. Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 1992; 86: 1081-8.
14. Asano K, Murakami M, Endo D, Kimura T, Fujinaga T. Complementary DNA cloning, tissue distribution, and synthesis of canine brain natriuretic peptide. *Am J Vet Res* 1999a; 60: 860-4.
15. Aitken GD, Raizis AM, Yandle TG, George PM, Espiner EA, Cameron VA. The characterization of ovine genes for atrial, brain and C-type natriuretic peptides. *Dom Anim Endocrinol* 1999; 16: 115-21.
16. Turk RJ. Physiologic and pathophysiologic effects of natriuretic peptides and their implications in cardiopulmonary disease. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 1970-6.
17. Magga J, Mäkinen M, Romppanen H, Vuolteenaho O, Tokola H, Marttila M, Ruskoaho H. Coronary pressure as a determinant of B-type natriuretic peptide gene expression in isolated perfused adult rat heart. *Life Sci* 1988; 63: 1005-15.
18. Magga J, Marttila M, Mantymä P, Vuolteenaho O, Ruskoaho H. Brain natriuretic peptide in plasma, atria, and ventricles of vasopressin – and phenylephrine- infused conscious rats. *Endocrinology* 1994; 134: 2505-15.
19. Liang F, Wu J, Garami M, Gardner D. Mechanical strain increases expression of the brain natriuretic peptide gene in rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 28050-6.
20. Liang F, Gardner DG. Autocrine/paracrine determinants of strain-activated brain natriuretic peptide gene expression in cultured cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 14612-9.
21. Bianciotti L, deBold AJ. Modulation of cardiac natriuretic peptide gene expression following endothelin type A receptor blockade in renovascular hypertension. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 808-16.
22. Nagagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Kishimoto I, Nishino K, Yoshimasa T, Nakao K. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of BNP in

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijumuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

- cardiocyte hypertrophy: evidence for BNP as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 1995; 96: 1280-7.
23. Bianciotti LG, deBold AJ. Effect of selective ET(A) receptor blockade on natriuretic peptide gene expression in DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H93 – H101.
24. Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, Redfield M, Wei CM, Porter JG, Burnett JCIr. Differential atrial and ventricular expression of BNP during evolution of heart failure. *Am J Physiol* 1998; 274 (Heart Circ Physiol 43): H1684-9.
25. Liang F, Kovačić-Milivojević B, Chen S, Cui J, Raediger F, Intenqan H, Gardner DG. Signaling mechanisms underlying strain-dependent brain natriuretic peptide gene transcription. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79: 640-5.
26. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kuqiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okimura K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation* 1994; 90: 195-203.
27. Asano K, Masuda K, Okumura M, Kadosawa T, Fujinaga T. Plasma atrial and brain natriuretic peptide levels in dogs with congestive heart failure. *J Vet Med Sci* 1999b; 61(5): 523-9.
28. Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK, Noser JA, Cataliotti A, Costello-Boerrigter LC, Chen HH, Burnett JC. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ Res* 2000; 91: 1127-34.
29. Velle W. Hormones of the vascular system. *Acta vet scand* 2002; Suppl 96: 135-7.
30. Woods RL, Jones MJ. Atrial, B-type, and C-type natriuretic peptides cause mesenteric vasoconstriction in conscious dogs. *Am J Physiol* 1999; 276: R1443-52.
31. Nishida Y, Morita H, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, Hosomi H. Effects of brain natriuretic peptide on hemodynamics and renal function in dogs. *Jpn J Physiol* 1990; 40: 531-40.
32. Calderone A, Thaik CM, Takahashi N, Chang DLF, Colucci WS. Nitric oxide, atrial natriuretic peptide and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest* 1998; 101: 812-8.
33. Ogawa Y, Tamura N, Chusho H, Nakao K. Brain natriuretic peptide appears to act locally as an antifibrotic factor in the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79: 723-9.
34. Goetze JP, Christoffersen C, Perko M, Arendrup H, Rehfeld JF, Kastrup J, Nielsen LB. Increased cardiac BNP expression associated with myocardial ischemia. *FASEB J* 2003; 17: 1105-7.
35. Goetze JP, Gore A, Moller CH, Steinbruchel DA, Rehfeld JF, Nielsen LB. Acute myocardial hypoxia increases BNP gene expression. *FASEB J* 2004; 18: 1928-30.
36. Boswood A. Editorial: The rise and fall of the Cardiac Biomarker. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 797-9.
37. Sisson D. The diagnostic potential of natriuretic peptides in heart failure. *J Vet Cardiol* 2000; 2: 5 -6.
38. Sisson D. Detection of asymptomatic cardiac disease in dogs and cats: Neuroendocrine tests. *Proc Br Sm Anim Vet Assoc* 2001; 174-6.
39. Archer J. Cardiac biomarker: a review. *Comp Clin Path* 2003; 12: 121-8.
40. Matunović R, Stojanović A, Damjanović R. Natriuretski peptidi u kliničkoj praksi. *Vojnosanit Pregl* 2005; 62 (2): 147-53.

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijumuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

41. Häggström J, Hansson K, Kvart C, Pedersen HK, Vuolteenaho O, Olsson L. Relation between different natriuretic peptides and severity of naturally acquired mitral regurgitation in dogs with chronic myxomatous valve disease. *J Vet Cardiol* 2000; 2: 7-16.
42. MacDonald KA, Kittleson MD, Munro C, Kass PH. Brain natriuretic peptide concentration in dogs with heart disease and congestive heart failure. *J Vet Intern Med* 2003; 17: 172-7.
43. Chetboul V, Tessier-Vetzel D, Escriou C, Tissier R, Carlos C, Boussouf M, Pouchelon J-L, Blot S, Derumeaux G. Diagnostic potential of natriuretic peptides in the occult phase of golden retriever muscular dystrophy cardiomyopathy. *J Vet Intern Med* 2004; 18: 845-50.
44. Valantine BA, Cooper BJ, DeLahunta A, O'Quinn R, Blue JT. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J Neurol Sci* 1988; 88 (1-3): 69-81.
45. Valantine BA, Cummings JF, Cooper BJ. Development of Duchenne-type cardiomyopathy. Morphologic studies in a canine model. *Am J Pathol* 1989; 135: 671-8.
46. Giglio V, Pasceri V, Messano L, Mangiola F, Pasquini L, Russo AD, Damiani A, Mirabella M, Galluzzi G, Tonali P, Ricci E. Ultrasound tissue characterization detects pre-clinical myocardial structural changes in children affected by Duchenne muscular dystrophy. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 309-16.
47. Agretto A, Politano L, Bossone E, Petretta VR, D'Isa S, Passamano L, Comi LI, Erbel R. Pulsed Doppler tissue imaging in dystrophinopathic cardiomyopathy. *J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15: 891-9.
48. Chetboul V, Escriou C, Blot S, Tessier D, Pouchelon JL, Litzler PY, Derumeaux G. Early detection of regional myocardial functional alterations in a dog model of dilated cardiomyopathy by tissue Doppler imaging study. *Circulation* 2001; 104 (Suppl 17): 351.
49. Chetboul V, Escriou C, Thibaud JL, Pouchelon JL, Blot S, Derumeaux G. Antenatal detection of Duchenne's cardiomyopathy by tissue Doppler. *Circulation* 2002; 106 (Suppl 19): 397.
50. Moise NS, Valantine BA, Brown CA, Erb HN, Beck KA, Cooper BJ. Duchenne's cardiomyopathy in a canine model: electrocardiographic and echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 812-29.
51. Oyama MA, Sisson DD, Solter PF. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measuring of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and troponin I concentrations. *Am J Vet Res* 2007; 68(1): 42-7.
52. Prošek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin and cardiac troponin I. *J Vet Intern Med* 2007; 21(2): 238-42.
53. DeFrancesco TC, Rush JE, Rozanski EA, Hansen BD, Keene BW, Moore DT, Atkins CE. Prospective clinical evaluation of an ELISA B-type natriuretic peptide assay in the diagnosis of congestive heart failure in dogs presenting with cough or dyspnea. *J Vet Intern Med* 2007; 21 (2): 243-50.
54. Burnett JC. Nesiritide: a new hope for acute heart failure syndromes. *European Heart Journal Supplement* 2005; 7(B): 25-30.
55. Kalra PR, Coats AJS. Therapeutic potential of the natriuretic peptide system. *The British journal of cardiology* 2002; 9(5): 273-8.

Vet. glasnik 63 (5-6) 381 - 392 (2009) Ljubica Spasojević Kosić: Moždani natrijūmuretični peptid: dijagnostički potencijal kod pasa

56. Lisy OA, Lainchbury JG, Leskinen H, Burnett JC Jr. Therapeutic actions of a new synthetic vasoactive and natriuretic peptide, dendroaspis natriuretic peptide, in experimental severe congestive heart failure. Hypertension 2001; 37: 1089-94.
57. Chen HH, Schirger JA, Cataliotti A, Burnett JC Jr. Intact acute cardiorenal and humoral responsiveness following chronic subcutaneous administration of the cardiac peptide BNP in experimental heart failure. European Journal of Heart Failure 2006; 8: 691-6.

ENGLISH

BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE: DIGANOSTIC POTENTIAL IN DOGS

Ljubica Spasojević Kosić

The endocrine role of the heart is evident in the secretion of noradrenaline and natriuretic peptides. The secretion of natriuretic peptides presents a useful mechanism for different conditions of cardiac disfunction. Brain natriuretic peptide (BNP) has been accepted in human cardiology as a biomarker for cardiac insufficiency and coronary arterial disease. The specificity of the BNP structure is specie-specific, so that the testing of diagnostic and prognostic potential in dogs requires the existence of a test that is a homologue for that animal specie. The existence of an adequate method for measuring BNP concentration makes possible its implementation as a screening test in everyday clinical practice.

Key words: heart diseases, cardiac insufficiency, diagnostics, BNP, dog

РУССКИЙ

МОЗГОВОЙ НАТРИЙУРЕТРИЧЕСКИЙ ПЕПТИД: ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ У СОБАК

Любица Спасоевич Косич

Эндокринная роль сердца отражается в выделении норадреналина и натрийуретрических пептидов. Выделение натрийуретрических пептидов представляет собой полезный механизм для различных состояний сердечной дисфункции. Мозговой натрийуретрический пептид (МНП) в гуманной кардиологии принят как биомаркер сердечной недостаточности и коронарной артериальной болезни. Специфичность структуры МНП-а связана для вида, да для испытания диагностического и прогностического потенциала у собак требует существование теста, который гомологический для этого животного вида. Существование адекватного метода измерения концентрации МНП-а представляет возможность его применения как скрининг теста в ежедневной клинической практике.

Ключевые слова: сердечные заболевания, сердечная недостаточность, диагностика, МНП, собака

TROVANJA DOMAĆIH ŽIVOTINJA TEŠKIM METALIMA* *POISONING OF DOMESTIC ANIMALS WITH HEAVY METALS*

R. Velev, Nataša Krleska-Veleva, V. Čupić**

Termin teški metali odnosi se na metale koji imaju relativno visoku gustoću i koji su toksični za životinjski i ljudski organizam u niskim koncentracijama. Oni su prirodni sastojci zemljine kore, ne mogu biti razgrađeni ili uništeni, a u malim količinama ulaze u životinjski organizam hranom, vodom ili vazduhom. Pojedini teški metali kao bakar, gvožđe, hrom i cink u malim količinama su esencijalni za živi organizam, ipak kada su prisutni u većim količinama remete normalne životne procese, odnosno izazivaju trovanje. Za razliku od njih teški metali kao olovo, kadmijum, živa i talijum nisu esencijalni i toksični su za organizam već u veoma malim količinama. Trovanje domaćih životinja ovim teškim metalima je rezultat njihovog neplaniranog ulaska u životinjski organizam, najčešće preko kontaminirane hrane, vode ili vazduha. Oni imaju tendenciju bioakumulacije u živom organizmu, a pojava manifestnih znakova njihove toksičnosti varira u zavisnosti od prirode hemijskog jedinjenja u kojem se nalaze, zatim količine i vremena izloženosti, životinjske vrste, uzrasta, pola, kao i uticaja okoline i svakako načina ishrane. Kod pojedinih teških metala postoje velike razlike u izazivanju toksičnih efekata, kako posle jednokratnog izlaganja životinja njihovim visokim koncentracijama ili pak izlaganja životinja niskim koncentracijama ovih toksikanata u toku dužeg vremenskog perioda (hronično izlaganje). Cilj ovog rada je da prikaže moguće izvore trovanja i toksičnost pojedinih teških metala (olovo, živa, kadmijum, talijum), kao i novija saznanja o toksičnim efektima ovih metala na zdravlje domaćih životinja.

Ključne reči: teški metali, domaće životinje, toksičnost, olovo, kadmijum, živa, arsen, talijum

* Rad primljen za štampu 19. 10. 2009. godine

** Dr sci. med. vet. Romel Velev, docent, Fakultet za veterinarna medicina, Skopje, R Makedonija; Nataša Krleska-Veleva, dr vet. med., Replekfarm AD, Skopje, R Makedonija; dr sci. med. vet. Vitomir Čupić, redovni profesor Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. Velez i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

Uvod / Introduction

Metali su elementi koji u hemijskim reakcijama otpuštaju elektrone i prelaze u pozitivno naelektrisane jone (katjone). Poseduju najviše dva elektrona u poslednjem energetsom nivou zbog čega su veoma aktivni pri dolasku u organizam, što je i razlog njihove visoke toksičnosti. Metali zauzimaju najveći deo tabele periodnog sistema elemenata. Generalno metali su oni hemijski elementi u periodnom sistemu između grupe IIA i grupe VIB. Od ostalih toksičnih jedinjenja metali se razlikuju u tome što ih ljudi ne stvaraju i ne mogu ih uništiti, pa zbog toga imaju tendenciju akumulacije u zemlji, morskoj i svežoj vodi i sedimentu. Termin *teški metali* može imati različito značenje, opšte ili specifično. Prema jednoj definiciji teški metali su grupa elemenata u periodnom sistemu hemijskih elemenata između bakra i olova, koji imaju relativnu atomsku masu između 63.546 i 200.590 i specifičnu masu najmanje 4 do 5 puta veću od one za vodu. Stroža definicija ograničava termin na one hemijske elemente sa metalnim svojstvima (na dnu periodnog sistema iza lantanoida) sa velikom atomskom masom i specifičnom masom iznad 8 pri 20°C (živa, talijum, olovo). Sa medicinskog stanovišta pojedini teški metali kao bakar, gvožđe, kobalt, hrom i cink u malim količinama su neza-menljivi (biogeni) i veoma potrebni za odvijanje biohemijskih procesa u životinjskom organizmu, deluju kao kofaktori u enzimskim sistemima, poboljšavaju funkciju nervnog sistema ili učestvuju u reakcijama zakiseljavanja ili redukcije promenom njihove valence. Oni su poznati i kao esencijalni elementi u tragovima. Ipak, kada su prisutni u većim količinama mogu delovati štetno i izazvati poremećaj u funkcionisanju normalnih životnih procesa, odnosno uzrokovati trovanje. Za razliku od njih teški metali kao što su olovo, kadmijum, živa i talijum nisu esencijalni i toksični su za organizam već u veoma malim količinama. Oni se kumuliraju u organizmu i međusobno su slični po toksogenezi (blokiraju SH-grupe i formiraju metalotionine), po kliničkim simptomima (zahvataju nervni sistem) koje izazivaju i po antidotskoj terapiji (koriste se helatogene supstancije). U ovu grupu spada i arsen (iako po hemijskim svojstvima pripada metaloidima, koji nemaju izrazita svojstva metala, te nemaju veliku atomsku masu i gustinu), zato što poseduje toksikološka svojstva teških metala. U teške metale se ponekad ubrajaju i torijum i uranijum, ali oni se češće nazivaju jednostavno radioaktivnim metalima.

Trovanja teškim metalima kroz istoriju / Heavy metal poisoning through history

Metali najverovatnije spadaju u najstarije otrove koje je čovek upoznao. Na jednom od najstarijih medicinskih zapisa zapadne civilizacije Ebersovom papirusu (1552. g. p.n.e.) pored velikog broja (preko 700) nabrojanih lekovitih supstancija i pripravaka, navedeni su i podaci o mogućem toksičnom delovanju nekih teških metala. Hipokrat (460-370. g. p.n.e.) je prvi koji je identifikovao živu, olovo, antimon i arsen kao otrovne, dok je Aristotel (350-250. g. p.n.e.) opisao veliki broj biljnih, životinjskih i mineralnih otrova. Za otrovnost, odnosno

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. Velež i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

toksičnost *olova*, čija je proizvodnja započela još pre 4500 godina u topionicama srebra znali su stari grčki i arapski lekari. Tako, prvo trovanje olovom, pod nazivom *plumbismus* opisao grčki pesnik i lekar Nikander pre više od 2000 godina.

U drevnom Rimu soli olova su dodavane u hranu i vino za poboljšanje varenja (digestije) i za ublažavanje unutrašnjih i bolova za vreme porođaja, a u javnoj higijeni se olovo koristilo za izradu cevi za vodu. Danas se između ostalog smatra da je trovanje olovom (nastalo kao rezultat konzumiranja vode kontaminirane olovom ili konzumiranja vina iz pehara izrađenih od olovnih legura) bio i jedan od razloga propasti Rimske imperije, budući da je dovelo do postepenog nestajanja ljudi iz viših vladajućih krugova. Tako se na primer misli da je narušeno mentalno zdravlje imperatora Klaudija (54. g. n.e.) i Nerona (68. g. n.e.) bilo posledica nastanka encefalopatije, izazvane hroničnim trovanjem olovom. Kao posledica intenzivne primene olovnih boja i olovnih cevi za vodu u javnoj higijeni, ljudi su ne samo u prošlosti, već i danas (kao i životinje) takođe izloženi ovom teškom metalu. Izloženost dece olovu danas je od posebnog pedijatrijskog značaja. Dobijanje i upotreba žive isto tako je poznata od davnina, a prvi podatak o otrovnom dejstvu ovog metala datira iz prvog veka pre n.e. u Plinijevom zapisu o bolesti u rudnicima žive. Izraz "ludi šeširdžija" potiče od izrađivača šešira iz 19. veka, koji su hronično bili izloženi jedinjenjima žive pri njihovoj izradi. Iz istorije je poznato i lekovito i otrovno delovanje *arsenovih* jedinjenja. Još 2000 g. p.n.e. arsenovtrioksid koji je dobijan pri topljenju bakra i kalaja, upotrebljavao se kao lek i otrov. Stari Grci i Rimljani upotrebljavali su arsenovdisulfid i trisulfid, pa i sam naziv arsenik dolazi od grčke riječi arsenikon (moćan, jak). Hipokrat (460-377. pre n.e.) i Galen (138-201. n.e.) pravili su smeše od jedinjenja sumpora i arsena i koristili ih za lečenje kožnih čireva, a prve pisane propise o upotrebi arsena u medicini dao je Paracelsus (oko 1520 g. n.e.). U to vreme dobijen je i elementarni arsen, pa je ovaj metal u vidu različitih jedinjenja upotrebljavan, a i danas se upotrebljava u industriji, poljoprivredi, te u humanoj i veterinarskoj medicini. Arsenik, t.j. arsenovtrioksid, vekovima je bio i zloglasni otrov, a 1786. god. je uveden u medicinu kao tonik i kao lek za astmu i psorijazu u obliku Fovlerove solucije (1% arsenovtrioksid). Arsenova jedinjenja su bili i prvi hemioterapeutici, koji su se koristili protiv spiroheta i tripanosoma, što je otkrio 1905. god. Erlih. Nakon toga sintetisano je oko 12500 lekova koji sadrže kao aktivnu supstanciju arsen (Lisella i sar., 1972). Danas se jedinjenja arsena skoro više i ne koriste u kliničkoj praksi (samo ponegde za liječenje tripanosomijaze u humanoj medicini) jer je dokazano da je arsen karcinogen.

*Teški metali u prirodi i njihovi izvori kao uzročnici trovanja domaćih životinja /
Heavy metals in nature and their sources of poisoning for domestic animals*

Teški metali su prirodni sastojci zemljine kore i vode i prisutni su u različitim koncentracijama u svim ekosistemima. Teoretski svakih 1000 kg zemlje sadrži 200 g hroma, 80 g nikla, 16 g olova, 0,5 g žive i 0,2 g kadmijuma. U zemlji se

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. VeleV i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

teški metali nalaze pretežno u obliku polimetalnih ruda. Danas postoji velik broj izvora teških metala koji mogu biti uzrok trovanja domaćih životinja. Kao klasičan i najvažniji izvor kontaminacije okoliša, odnosno potencijalni izvor trovanja teškim metalima smatraju se područja oko rudnika i topionica olova, cinka, žive i drugih metala, kao i industrije koja ove metale koristi u svojim tehnološkim procesima i u proizvodnji najrazličitijih proizvoda široke potrošnje (Petkov i sar., 1979).

Otpadnim vodama i dimom iz takvih preduzeća zagađuje se životna sredina olovom, kadmijumom, živom, arsenom i drugim metalima, t.j. zagađuju se vazduh, tlo, voda i biljna vegetacija (Koh i Badridge, 1986). Iako je, za razliku od šesdesetih i sedamdesetih godina prošlog veka, godišnja emisija kadmijuma, olova i cinka na prostoru Evrope u opadanju, emisija ovih metala je još uvek velika. I u Makedoniji je emisija ovih teških metala u zadnjih 15 godina u drastičnom opadanju, ali se smatra da je to pre svega rezultat procesa tranzicije kroz koju zemlja prolazi, kao i ostale zemlje u okruženju. Najveći zagađivač okoliša teškim metalima u Makedoniji je topionica olova i cinka Zletovo iz Velesa (Veličkov i sar., 1976). Najnovija ispitivanja pokazuju da je tlo u okolini Velesa najzagađenije tlo na Balkanu. Apsorpcijski kapacitet tla za prihvatanje novih količina teških metala je na graničnom nivou. U određenim područjima olova ima u 3 puta većoj količini od tolerantnog nivoa, a 10 puta više od svetskog proseka. Kadmijuma ima 7 puta više od nivoa koji se još uvek toleriše, a 20 puta više od maksimalno dozvoljene količine (na nekim mestima i 70 puta više) (Veličkov i sar., 1990). Kao rezultat ovakvog stanja u prošlosti su zabeleženi brojni slučajevi trovanja kod domaćih životinja, čiji su uzročnici bili teški metali. Tako je na primer u toku 1975. godine u okolini Velesa bilo dijagnostikovano masovno trovanje ovaca i jagnjadi, koje se kod jedinki manifestovalo anemijom, promenama u muskulaturi i povećanim brojem abortusa (Petkov i sar., 1980). Pri ispitivanju travnog pokrivača nađene su povećane koncentracije olova, kadmijuma i cinka, a u unutrašnjim organima obolele jagnjadi količina ovih metala je bila iznad dozvoljenih. U 1988. godini zabeleženo je takođe akutno trovanje krava hranjenih svežim repinim rezancima, koji su bili kontaminirani za vreme transporta u kamionima (kiperima) u kojima se pre toga prevozila ruda teških metala (Bošnjakovski i sar., 1990). Ispitivanjem sadržaja kadmijuma u toku 1991. godine u mišićima, jetri i bubrezima kod junadi slobodno napasanih u okolini topionice, utvrđene su takođe koncentracije ovog metala iznad dozvoljenih (Bošnjakovski i sar., 1991).

Važan izvor olova, kadmijuma i žive u gradskim sredinama predstavljaju i izduvni gasovi benzinskih motora, odnosno izgaranje fosilnih goriva (ugljena, nafte i prirodnog gasa) koji zagađuju atmosferu i životnu sredinu (Cannon i Bowles, 1962). Sirovi fosfati u veštačkim đubrivima i stočnoj hrani izvor su zagađenosti tla i vegetacije kadmijumom, kao i mulj iz kanala gradskih otpadnih voda (Pahren i sur., 1980).

Veoma važan izvor zagađivanja životne sredine, bez strogo definisanih geohemijskih zona predstavlja i široka primena različitih pesticida koji u sebi sadrže teške metale kao na primer neorganska jedinjenja arsena, koja se koriste

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. Velez i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

kao insekticidi, herbicidi ili rodenticidi, živa jedinjenja koja se koriste kao insekticidi, herbicidi ili fungicidi, kadmijum-sukcinat koji se upotrebljava kao fungicid ili soli talijuma, koje se upotrebljavaju kao rodenticidi. Dospevanjem u zemlju, oni se raspadaju i oslobađaju metale, koji se u zavisnosti od pokretljivosti u obliku soli kreću po ekološkom lancu do životinja i ljudi. Danas je upotreba proizvoda za zaštitu biljaka koji sadrže teške metale (živa, olovo, arsen, molibden) značajno ograničena.

Važan izvor koji često predstavlja i direktan uzrok trovanja životinja su i različiti anthelmintici, koji sadrže arsen, olovo ili kadmijum; antiprotozalna jedinjenja, hemioterapeutici ili stimulatori rastinja koji sadrže arsen; zatim antiseptici koji sadrže kadmijum; adstringensi koji sadrže olovni acetat; živa jedinjenja koja se koriste kao laksansi ili iritansi u veterinarskoj ili diuretici u humanoj medicini.

Toksičnost i metabolizam teških metala / *Toxicity and metabolism of heavy metals*

U organizam životinja teški metali uglavnom ulaze ingestijom kontaminirane hrane i vode. Apsorpcija teških metala iz gastrointestinalnog trakta iznosi svega 2-10% i zavisi od različitih faktora (hemijske prirode jedinjenja, njegove rastvorljivosti, polariteta, vrste i starosti životinje itd.). Metali, koji se u prirodi najčešće nalaze u obliku helata (kompleks sa organskim molekulama), imaju bolja apsorptivna svojstva u poređenju sa samim metalima ili njihovim neorganskim solima.

Od neorganskih jedinjenja žive, živindihlorid (sublimat) je dobro rastvorljiv u vodi i predstavlja veoma jak otrov za razliku od živinoghlorida (kalomela) koji se praktično ne rastvara, ne apsorbuje i nije toksičan. Ipak, ne treba zaboraviti da u digestivnom traktu neka nerastvorljiva jedinjenja mogu preći u rastvorljiva pod uticajem hlorovodonične kiseline i pH vrednosti, kao što je to slučaj sa jedinjenjima olova. U tankom crevu olovo stvara i komplekse sa žuči, koja takođe pospješuje njegovu apsorpciju (Clarke, 1973). Stepem apsorpcije ponekad zavisi i od polariteta jedinjenja, pa tako anjonski oblik arsena se bolje i brže apsorbuje nego katjonski. Stepem i brzina apsorpcije iz digestivnog trakta mogu zavisi i od starosti životinje, što je takođe slučaj kod olova. Kod odraslih životinja stepem apsorpcije nije visok i kreće se od 1 do 10% u zavisnosti od hemijske prirode jedinjenja i vrste životinje (ovca 1-2%, odrastao pas 10%, štene do 36%). Kod odraslog čoveka stepem apsorpcije olova iz creva iznosi ispod 10%, a kod dece u postnatalnom periodu do 50% (Mahaffey, 1983). Kada je u pitanju apsorpcija metala iz gastrointestinalnog trakta, treba istaći da ona ponekad zavisi i od mogućih interakcija između njih samih. Na primer, prisustvo malih koncentracija kalcijuma, cinka i gvožđa u hrani pojačava apsorpciju i toksičnost olova i kadmijuma, a prisustvo kadmijuma u digestivnom traktu smanjuje apsorpciju hranljivih materija i gvožđa. Višak molibdena izaziva deficit bakra, što je najbolje izraženo kod goveda. Kod svinja visok nivo kalcijuma u hrani dovodi do deficita cinka.

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. Velez i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

Nakon apsorpcije, teški metali se obično kumuliraju u određenim tkivima (olovo u kostima, metilovana živa u mozgu, kadmijum u bubrezima), gde najčešće i nastaju određene toksične promene (olovo čini izuzetak). Ipak metali deponovani u nekim organima često i nemaju toksikološki značaj, t.j. ne mogu izazvati trovanje (deponovanje arsena u dlačnom pokrivaču). Toksični efekti teških metala u organizmu zavise i od njihove hemijske forme. Tako, na primer neorganski oblici arsena i žive obično deluju štetno na jetru i bubrege, a organska arsenova i živina jedinjenja uglavnom deluju toksično na nervni sistem. U principu organska jedinjenja metala lakše prolaze biološke membrane. Neorganska jedinjenja arsena su mnogo toksičnija od organskih, a među neorganskim arseniti (As^{3+} koji su trovalentni) su toksičniji od arsenata (As^{5+}) petovalentnih.

Razlog za ovo delimično leži u činjenici što se petovalentna jedinjenja brže izlučuju od trovalentnih, odnosno trovalentna se duže zadržavaju u organizmu. I toksičnost organskih jedinjenja arsena takođe zavisi od valentnosti inkorporiranog arsena, koja utiče na stepen apsorpcije, raspodelu u organizmu i izlučivanje. Petovalentna organska jedinjenja arsena su manje toksična od trovalentnih i zbog toga što neznatno utiču na procese respiracije u ćelijama, dok su trovalentni jaki inhibitori. Petovalentna jedinjenja se u organizmu mogu metabolisati i preći u trovalentne i obrnuto, što takođe utiče i bitno je za procenu toksičnosti. Kod pojedinih teških metala toksični učinak zavisi i od prethodnog opterećenja organizma tim metalom. Tako, na primer osetljivije su one životinje koje unose hranu siromašnu olovom, t.j. higijenski ispravniju hranu i obrnuto. Veličina otrovne doze za svaku životinju delom zavisi i od postojećeg sadržaja olova u organizmu. Isto tako, osetljivost na olovo se razlikuje kod pojedinih vrsta životinja, što znači da olovo ne izaziva podjednako toksične efekte kod svih životinja. Preživari, konji i ptice su osetljiviji od pasa, svinja i kunića. Ovce su podjednako osetljive na olovo, kao i goveda, dok se konji pasući na kontaminiranim pašnjacima češće otruju od goveda, jer dublje hvataju vlati trave, pa pojedu i koren na kojem zaostaje zemlja zagađena olovom. Trovanje svinja olovom je retka pojava, a razlog je i urođena otpornost. Ulazak teških metala u organizam preko pluća nije karakteristično, iako se kroz pluća oni lakše apsorbuju nego kroz gastrointestinalni trakt. Naime, životinje retko kada borave duže vreme u atmosferi zasićenoj teškim metalima. To je jedino slučaj kod pasa koji se koriste kao čuvari objekata, smeštenih pored magistralnih puteva ili u preduzećima, odnosno industrijskim objektima u kojima se prerađuje ruda. Inače kroz respiratorni trakt u organizam mogu ući, odnosno apsorbovati se samo manje čestice, jer one sa većim prečnikom (na primer za olovo iznad $0,5 \mu\text{m}$) zaostaju na trepljama respiratornih epitelnih ćelija i ne prolaze u niže delove. Respiratorni put je najčešći način dospevanja kadmijuma u organizam čoveka i životinja. Inače i apsorpcija kadmijuma preko pluća zavisi od veličine i oblika čestica ovog metala i njegovih jedinjenja (20-40% u obliku dima, 60 % u obliku pare) (Moor i sar., 1973). Zdrava nepovređena koža je aktivna barijera za ulazak teških metala, ali ako je njen integritet narušen i preko nje se mogu apsorbovati teški metali, što dovodi do trovanja.

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. Velez i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

Klinička slika kod domaćih životinja otrovanih teškim metalima /

Clinical picture in domestic animals poisoned with heavy metals

Klinička slika trovanja olovom manifestuje se poremećajem u funkcionisanju nervnog sistema i probavnog trakta, a kod nekih vrsta životinja i hematopoetskog sistema. Tok je po pravilu akutan, subakutan ili hroničan sa akutnim ili perakutnim pogoršanjima. Akutni i subakutni tok su slični kod goveda, ovaca, pasa i svinja, a razlikuju se od toka bolesti kod peradi i konja. Hronični tok se javlja kod svih vrsta životinja, a najčešće kod močvarnih ptica. Kod preživara sa akutnim oblikom trovanja karakterističan je gubitak apetita, zatvor i naduvenost, te izrazito uzbuđenje s manijakalnim napadima, konvulzivno grčenje skeletnih mišića, depresija i stupor (ređe). Životinje besciljno lutaju, muču, obilno sline i slabije vide (Dorn i sar., 1986). Ponekad se javlja i nistagmus, znojenje i škrgranje zubima. Telad ponekad imaju proliv.

Kod manjeg broja otrovanih goveda su primećeni i poremećaji u gutanju i žvakanju (sumnja na parezu žvakaćih mišića i mišića ždrele). Kod određenog broja jedinki se javlja i prividno slepilo (zamućenje mrežnjače), kao i oslabljen refleks zenica (Hamond i Sorensen, 1957). Hronično trovanje olovom je ređa pojava kod preživara, a znakovi su gubitak apetita, loša telesna kondicija, zatvor i slabokrvnost, kod gravidnih ovaca se čak može javiti i abortus (Egan i Cvill, 1969), a jagnjad koja sišu mleko majki koje su kontaminirane olovom mogu oboleti od osteoporoze (Singer, 1973). Kod konja akutno otrovanih olovom javljaju se kolike i proliv, potištenost, pareza i paraliza nerava ekstremiteta (konji povremeno klecaju i posrću). Hronično trovanje je kod ovih životinja karakteristično. Jedinke gube apetit, telesnu masu, nastaje anemija, pareza nerava usana i zadnjih nogu, te hemiplegija larinksa, kao rezultat oštećenja n. recurensa i posledično poremećaj gutanja, pa čak i aspiraciona pneumonija. Javlja se i otežano disanje, a isto tako i plava linija na desnim (Bartonova linija) kao rezultat prisustva olovo-sulfida (Burrows i sur. 1982). Svinje su prirodno otporne na trovanje olovom i klinički znaci su slabo izraženi i nedovoljno specifični (izgube apetit, imaju proliv, slabe, ređe povraćaju, koža im ohrapavi, kasnije se javlja nekoordinirano kretanje, lateralni nistagmus, trzanje glavom i prednjim nogama) (Link i Pesinger, 1966). Kod živine koja je akutno otrovana olovom javlja se gubitak apetita, žeđ, snuženost, slabost mišića, plavilo kreste i podbradnjaka, izmet je svetlozelene boje. Jedinke bespomoćno stoje, opuštenih krila i vrte glavom, a pre uginuća leže kao oduzete ili su u komi. Hronično trovanje se javlja samo kod divljih ptica (močvarica), a manifestuje se gubitkom apetita, slabošću mišića, anemijom, jedinke ne mogu da polete, gube na telesnoj masi i imaju zeleno obojen izmet (Simpson, 1981).

Trovanja životinja kadmijumom su retkost i ukoliko se desi znaci akutnog trovanja su nespecifični. Nakon ingestije javlja se obilno slinjenje, povraćanje, kolike, proliv, vrtoglavica i gubitak svesti, a nakon inhalacije dugotrajno kihanje i kašalj, pa čak bronhitis, emfizem pluća i oštećenje njuha (Venugopal i Luckey, 1978). Hronično trovanje se manifestuje smanjenim apetitom, zastojem u rastu

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. Velez i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

(jagnjad, svinje, telad, pilići), hipohromnom anemijom (posledična hiperplazija kostne srži), smanjenom produkcijom i sekrecijom mleka, poremećajem funkcije bubrega (proteinurija, glukozurija, hipertenzija), jetre, polnih žlezda (distrofija i degeneracija testisa, inhibicija spermatogeneze), srca i prostate, poremećajima u metabolizmu ugljenih hidrata i minerala (nedovoljna mineralizacija kostiju, anomalije na kostima embriona, osteomalacija i osteoporoza), zatim poremećajima u reprodukciji (sterilnost), te teratogenim, karcinogenim i mutagenim promenama (Doyle i sar., 1974). Kod goveda i ovaca kadmijum ima embriotoksično delovanje (resorpcija fetusa, pobačaj) i izaziva malformacije (lateralna rotacija prednjih nogu i promene na kičmi) (Wright i sar., 1977). Kod goveda hronično otrovanih kadmijumom smanjuje se keratinizacija papaka, rožni sloj je suv i krhk, sluznice su blede, dlačni pokrivač neuredan, često se javlja abortus i teratogeni efekti. Kod teladi nastaje teška hipohromna anemija, a kod ovaca anemija, nefropatija i demineralizacija kostiju. Kod svinja se javlja mikrocitna i hipohromna anemija, a kod ptica je prisutno slabije iskorišćavanje hrane i usled toga slabiji prirast.

Klinička slika trovanja živom zavisi od prirode jedinjenja, mesta ulaska u organizam, doze ili količine i dužine izloženosti. Preovladavaju tri vida kliničkih simptoma: respiratorni (kod inhalacije živinih para), bubrežni (posle peroralne ingestije neorganskih soli žive) i nervni (kod organskih jedinjenja žive). Živine pare kod akutnog trovanja izazivaju intersticijalnu pneumoniju i difuzni bronhitis (kašalj, gušenje), a kod većih doza edem pluća. Pored toga, javlja se i salivacija, povraćanje i dijareja. Hronično trovanje je retko, a manifestuje se upalom usne sluzokože i desni, slinom sa primesama krvi i dermatitisom. Neorganska jedinjenja žive posle ingestije odmah na početku (u prvoj, agresivnoj) fazi izazivaju stomatitis, faringitis, povraćanje i dijareju. Za 1-2 dana nastupa druga (anurična) faza koja se manifestuje oligurijom i azotemijom. Treća faza traje duže i manifestuje se istim efektima, koji se javljaju u toku dužeg vremenskog perioda. Goveda su osetljivija od drugih životinja i kod njih se mogu javiti pustulozne promene na koži, petehije na sluznicama, erozije u usnoj sluznici, pneumonija, ataksija i pareze. Kod hroničnog trovanja javljaju se dijareja, slabost i emfizem pluća. Kod ovaca otrovanih živinim dihidloridom može nastati atonija predželudaca, smanjen apetit, žeđ, pojačana salivacija, dijareja, teško disanje, ubrzan puls, bolnost u području bubrega, stomatitis, sekrecija iz nosa, edemi na glavi i grudima, depresija, klonični grčevi i treperenje, svrab kože. Kod hroničnog trovanja dolazi do oštećenja bubrega, javlja se hipohromna anemija, smanjena rezistentnost eritrocita i trombocita. Kod konja se živa kumulira u bubrežima, mozgu i drugim unutrašnjim organima. Klinički se ovo trovanje manifestuje dijarejom, slabošću i polidipsijom. Kod hroničnog trovanja se javlja glukozurija, proteinurija, fosfaturija i azotemija. Trovanje organskim jedinjenjima se na početku manifestuje crvenilom kože, konjunktivitisom, suzenjem i stomatitisom, posle čega slede nervni simptomi (depresija, ataksija, inkoordinacija, pareza i slepilo). Na kraju se javljaju dermatološki simptomi (dermatitis, čirevi, ulceri). Organska živina jedinjenja kod teladi, pasa i mačaka izazivaju stimulaciju, a kod odraslih goveda, svinja i ptica depresiju CNS-

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. Velev i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

a. Telad postupno izgubi vid, javljaju se konvulzije i gastrointestinalni poremećaji, životinje guraju glavu u razne predmete, leže, a mogu nastupiti koma i smrt. Kod odraslih goveda intoksikacija organskim živinim jedinjenjima teče protrahirano (nekoliko nedelja do 5 ili 6 meseci), a manifestuje se anoreksijom, gubljenjem telesne mase, slabošću, depresijom, lošom orijentacijom, spazmom mišića lica, čestim uriniranjem s primesama krvi, dijarejom, kolitisom, ispadanjem zuba, povećanjem limfnih čvorova, hemoragijama na sluznicama, poremećajem rada srca i pluća, dermatitisom, ekzemom, konvulzijama, komom i smrću. Kod svinja su simptomi isti kao kod goveda, samo što su gastrointestinalni izraženiji.

Na arsen su osetljive sve životinje. Trovanja neorganskim i organskim alifatskim arsenovim jedinjenjima su učestalija kod goveda, nego kod ovaca, konja i pasa, a velika su retkost kod svinja i peradi. Svinje i perad se češće otroju fenilarsoničnim jedinjenjima. Tok je perakutan, akutan, subakutan i hroničan. Perakutan i akutan traje 2-3 dana. Manifestuje se poremećajima u respiratornom, gastrointestinalnom, kardiovaskularnom, nervnom i hematopoetskom sistemu.

Protiče sa simptomima jake boli u stomaku, ukočenim hodom, prisutna je izrazita slabost, drhtanje, slinjenje, povraćanje (čak i kod goveda), krvavi proliv, ubrzan rad srca, iscrpljenost, atonija buraga, normalna ili subnormalna telesna temperatura, kolaps i smrt (Riviere i sar., 1981). Uz to se javlja vodenast izmet s krpicama crevne sluznice i krvi. Kod trovanja arsenovim kupkama, pored ovih simptoma po koži se mogu razviti i mehurići, a potkožno edem i krvarenje (Robertson i sar., 1984). Hronično trovanje je retka pojava kod životinja, a znaci su opšta slabost, nevoljnost, neuredan dlačni pokrivač i sluznice ciglastocrvene boje. Životinje otrovane fenilarsoničnim jedinjenjima imaju drugačiju kliničku sliku: prisutna je inkoordinacija i nesposobnost kontrolisanog pokretanja nogu, ataksija, a kasnije i potpuna adinamičnost ili paraliza uz sačuvan apetit i živahnost (Sabec i sar., 1978). Neka jedinjenja (arsanilna kiselina) izazivaju i slepilo, crvenilo kože i osetljivost na sunčevu svetlost. Kod svinja hronično trovanje se manifestuje progresivnim razvojem slepila i djelimičnom paralizom nogu, a kod peradi se javlja ataksija, gubitak apetita i jedinke obično kunjaju (Harding i sar., 1968). Kod teladi se javljaju gastrointestinalni poremećaji slični onim koji nastaju posle trovanja izazvanih neorganskim jedinjenjima (Buck i sar., 1976).

Lečenje domaćih životinja otrovanih teškim metalima /

Treatment of domestic animals poisoned with heavy metals

Kod konja i preživara otrovanih olovom može se usporiti apsorpcija ovog metala iz probavnog trakta primenom magnezijumovog ili natrijumovog sulfata, koji s olovom grade nerastvorljivi olovo- sulfat, a deluju i laksativno. Najdelotvorniji hemijski antidot (helatogena supstancija) je kalcijumov versenat, odnosno monokalcijum-dinatrijumova so etilen-diamino-tetrasirćetne kiseline (Ca-Na₂EDTA). Pored toga, može se koristiti i BAL (dimerkaprol) i metalkaptaza (d-penicilamin). Kalcijumov versenat kod hronično otrovanih životinja može izazvati

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. Velež i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

stanje akutnog trovanja olovom jer mobilizira i veže (helira) olovo iz kostiju, ali ne i ono iz eritrocita. BAL helira olovo iz eritrocita pa se uspešno primenjuje zajedno sa kalcijumovim versenatom. Metalkaptaza se primenjuje oralno, a helira i olovo iz mekih tkiva. U novije vreme se primenjuje (kod ukrasnih ptica) i dimerkaptosukcinilna kiselina (DMSA) koja je visoko efikasna i manje toksična. Kod akutno otrovanih jedinki treba izvršiti rehidraciju, a uzbuđene životinje smiriti sedativima i hipnoticima. Kod goveda je dobro primeniti i tiamin jer sprečava deponovanje olova u mekana tkiva (jetra, bubreg, centralni i periferni nervni sustav).

Toksični učinak kadmijuma se ublažava dodatkom gvožđa, bakra, cinka i selen u suvišku hrani, te vitamina C i D (Weber i Reid., 1971). Selen umanjuje toksični učinak kadmijuma na testise. Hepatotoksični efekat se umanjuje stimulacijom sinteze glutaciona u jetri (Dudley i Klaassen, 1984). Antidot za kadmijum je kalcijumov versenat i d-penicilamin. Dimerkaprol je kontraindikovano, jer povećava toksičnost kadmijuma prema bubregu.

Živina jedinjenja s površine tela se odstranjuju vodom i sapunom. Ap-sorpcija iz probavnog kanala (svinja, pas, mačka) može se sprečiti životinjskim ugljenom. Isto tako kao lokalni antidot može poslužiti i magnezijum-hlorid, skrob u vreloj vodi i belance jajeta sa vodom ili mlekom.

Korisno je i ispiranje želuca (do 15 minuta) sa rastvorom formaldehid-hidrosulfita ili natrijum-bikarbonata. Pomaže i primena rastvora natrijum-tiosulfata. Sistemski su antidoti dimerkaprol i d-penicilamin koji su indikovani kod subakutnih i hroničnih trovanja organskim živinim jedinjenjima. Eksperimentalno je dokazano da selen, odnosno vitamin E štite organizam od toksičnog delovanja metil žive (Welsh i Soares, 1976), a isto i cink (Fukino i sar. 1984). Diuretik spironolakton sprečava toksični učinak živinog hlorida na bubreg (Selye, 1970).

Pri akutnom trovanju neorganskim i alifatskim jedinjenjima arsena veoma je značajna rana dijagnoza. Kod konja i preživara primenjuju se laksansi (gorka so) i sluz. Životinjama koje mogu povraćati daju se emetici, pa se zatim vrši ispiranje želuca mlakom vodom. Primenjuju se i infuzije elektrolita i parenteralno aplikuju vitamini B kompleksa i vitamin C. Sistemski antidot je natrijum-tiosulfat. Klasični sistemski antidot pri trovanju ljudi sa arsenom poznat kao BAL nije se pokazao uspešnim kod životinja. Lipoična kiselina se kod goveda pokazala efikasnijom nego dimerkaprol, a veliku nadu daju i novi analozi dimerkaprola mezodimerkaptosukcinilna i dimerkaptosukcinilna kiselina. U humanoj medicini dobri rezultati su postignuti D-penicilaminom koji se daje peroralno (Watson i sar., 1981). Za fenilarsenična jedinjenja nisu poznati antidoti.

Literatura / References

1. Bosnakovski J, Hristovski M, Tetikovic S, Danev M, Serafimovska V, Panevska M. Masovno akutno alimentarno truenje na kravi so teski metali. Mac Vet Rev 1990; 19(1-2): 15-20.

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. VeleV i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

2. Bosnakovski J, Hristovski M, Tetikovic S, Danev M, Serafimovska V, Panevska M. Higijenska procena na upotreblivost na mesoto, na organite i na mlekoto od goveda otrueni so teski metali. *Mac Vet Rev* 1991; 20(1-2): 55-9.
3. Buck WB, Osweiler GD, Van Geler GA. Clinical and diagnostic veterinary toxicology. II izd., Kendall Hunt Pbls., Comp. Dubuque 1976; 281.
4. Burrows GE. Lead poisoning in the horse. *Equine Practice* 1982; 4: 30-6.
5. Cannon HL, Bowles JM. Contamination of vegetation by tetraethyl lead. *Science* 1962; 137: 765-6.
6. Clarke EGC. Lead poisoning in small animals. *Small Anim Pract* 1973; 14: 183-93.
7. Dilov P, Chakarov R, Vrbcheva V, Malchevski M, Kuncheva S, Belchev L, Angelov A. Otravjane s teški metali pri kone i ovce, otglezdani v rayona na s. Dolni Voden, Plovdivska oblast. *Sbornik Naucni trudove. SSA, S*, 1990; 101-5.
8. Dilov P, Georgiev B, Borissova L, Stoyanov K, Vrbcheva V, Lazarova S, Kostadinov J, Kirov K, Alexandrov M, Angelov G. *Veterinary medical toxicology*. Sofia, 2005.
9. Dorn CR, Tuomari D, Reddy C, Logan TJ. Acute lead poisoning with eosinophilic meningoencephalitis in calves on farm receiving land application of sewage sludge. *JEPTO* 1986; 6: 305-14.
10. Doyle JJ, Pfander WH, Grenshaw DB, Snethen JM. The induction of chromosomal hypodiploidy in sheep leucocytes by cadmium. *Interface* 1974; 3: 9.
11. Dudley RE, Klaassen CD. Changes in hepatic glutathione concentration modify cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 72: 530-8.
12. Egan DA, Cville T. Opencast lead minig areas – a toxic hazard to grazing stock. *Vet Rec* 1969; 84: 230.
13. Fukino H, Hirai M, Hsueh YM, Yamane Y. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride induced lipid peroxidation in rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73: 395-401.
14. Hamond PB, Sorensen DK. Recent observation on the course and treatment of lead bovine poisoning. *JAVMA* 1957; 130: 23-6.
15. Harding JD, Lewis G, Done JT. Experimental arsanilic acid poisoning in pigs. *Vet Rec* 1968; 560-4.
16. Koh TS, Badridge PJ. A comparison of blood lead levels in dogs from a lead-mining, lead-smelting, urban and rural island environment. *Aust Vet J* 1986; 63: 282-5.
17. Link RP, Pensinger RR. Lead toxicosis in swine. *Am J Vet Res* 1966; 27: 759-63.
18. Lisella FS, Long KR, Schott HG. Heath aspects of arsenicals in the environment. *J Environ Health* 1972; 34: 511-8.
19. Mahhafey KR. Absorption of lead by infants and young children, 1983; 69-85.
20. Moore W, Stara JF, Crocker WC, Malanchuk M, Itis R. Comparison of cadmium retention in rats following different routes of administration. *Environ Res* 1973; 6: 473.
21. Pahren HR, Lucas JB, Rayan JA, Dotson GK. Health risks associated with land application of municipal sludge. *J Water Pollution Control Fed* 1980; 52: 2588-601.
22. Panchev I, Nikolov A, Dilov P i sar. Ostro olovno otravjane pri teleta za ugojavane. *Vet Sbirka* 1991; 1-2: 10-2.
23. Petkov K. Metabolizam i toksichnost na kadmiumot i olovoto kaj domasnite zivotni. *Socijalisticko zemjodelstvo* 1977; 29(7-8); 69-77.
24. Petkov K, Madzirov Z, Ilkovski R. Teški metali (olovo i kadmium) kao zagađivači životne sredine. *Vet Glasnik* 1979; 33(7): 511-8.

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. Velev i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

25. Petkov K, Madzirov Z, Ilkovski R. Ispitivanje na rasirenosta i etiologijata na miopatite kaj jagninjata i telinjata na podracjeto na SRM (1975-80). Istrazivacki projekt.
26. Riviere RJ, Boosinger TR, Everson RJ. Inorganic arsenic toxicosis in cattle. *Moder Vet Pract* 1981; 62: 209-11.
27. Robertson ID, Harms WE, Kemerer PJ. Accidental arsenical toxicity of cattle. *Austr Vet J* 1984; 61: 366-7.
28. Selye H. Mercuric poisoning: prevention by spirinolactone. *Science* 1970; 169: 775-6.
29. Simpson VR. Treating lead poisoned swans. *Vet Rec* 1981; 109: 342.
30. Singer RH. Arsene, lead and mercury poisoning in domestic animals. *Proc 76th. Ann Meeting of USA Anim Health Assoc Colleg Station, Texas, 1973.*
31. Srebočan V. Veterinarska toksikologija. Medicinska naklada, Zagreb, 1993.
32. Sabec D, Janc M, Doganc D, Milohnoja M. Zapazanja o trovanju svinja nakon tretiranja dizinterije preparatom arsonicne kiseline. *Vet Glasnik* 1972; 32: 807-11.
33. Veličkov A, Murgev D. Informacija za kontaminacijata na Veleskata okolina so prasina, cad, sulfuren dioksid i teski metali (olovo, cink i kadmium) od izvrsenite merenja vo 1974, 1975 i 1976 god.
34. Velickov A., Ristova V., Trajkova I., Vanov J., Stankovic M., Milic S.: Teskite metali olovo, kadmium i cink vo pocvata i zemjodelskite kulturi na podracjeto na Veles. Naucen sobir na drustvo za nauka i umetnost. *Zastita na zivotna sredina* 1990; 55-60.
35. Venugopal B, Luckey T. Metal toxicity in mammals vol. 2. Plenum press. New York 1978; 76-86.
36. Watson WA, Vetri JC, Metcalf TJ. Acute asrenic exposure treated with oral d-penicillamine. *Vet Hum Toxicol* 1981; 23: 164-6.
37. Weber CW, Reid CL. Cadmium studies in chic. *Poultry Sci* 1971; 50: 1644-50.
38. Welsh SO, Soares JH. The protective effect of vitamine E and selenium against methyl mercury toxicity in the Japanese quail. *Nutr Rep Int* 1976; 13: 43-51.
39. Wright C, Palmer JS, Riner JC, Haufler M, Miller JA, McBeth CA. Effects of dietary feeding of organo cadmium to cattle and steer. *Agric Food Chem* 1977; 25: 293-7.

ENGLISH

POISONING OF DOMESTIC ANIMALS WITH HEAVY METALS

R. Velev, Nataša Krleska-Veleva, V. Ćupić

The term heavy metal refers to a metal that has a relatively high density and is toxic for animal and human organism at low concentrations. Heavy metals are natural components of the Earth's crust. They cannot be degraded or destroyed. To a small extent they enter animal organism via food, drinking water and air. Some heavy metals (e.g. copper, iron, chromium, zinc) are essential in very low concentrations for the survival of all forms of life. These are described as essential trace elements. However, when they are present in greater quantities, like the heavy metals lead, cadmium and mercury which are already toxic in very low concentrations, they can cause metabolic anomalies or poisoning. Heavy metal poisoning of domestic animals could result, for instance, from drinking-water contamination, high ambient air concentrations near emission sources, or intake via the food chain. Heavy metals are dangerous because they tend to bioaccumulate in a biological or-

Vet. glasnik 63 (5-6) 393 - 405 (2009) R. Veleв i sar.: Trovanja domaćih životinja teškim metalima

ganism over time. Manifestation of toxicity of individual heavy metals varies considerably, depending on dose and time of exposure, species, gender and environmental and nutritional factors. Large differences exist between the effects of a single exposure to a high concentration, and chronic exposures to lower doses. The aim of this work is to present the source of poisoning and toxicity of some heavy metals (lead, mercury, cadmium, thallium, arsenic), as well as new data about effects of those heavy metals on the health of domestic animals.

Key words: heavy metals, domestic animals, toxicity, lead, mercury, cadmium, arsenic, thallium

РУССКИЙ

ОТРАВЛЕНИЯ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ ТЯЖЁЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Р. Велев, Наташа Крлеска-Велева, В. Чупич

Термин тяжёлые металлы относится к металлам, имеющие релятивно высокую густоту и которые токсические для животного и человеческого организма в низких концентрациях. Они природные составные части Земной коры, не могут быть разгорожены или уничтожены, а в маленьких количествах входят в животный организм кормом, водой или воздухом. Некоторые тяжёлые металлы как медь, железо, хром и цинк в маленьких количествах эссенциальные для живого организма, всётаки, когда присутствующие в больших количествах нарушают нормальные процессы то есть вызывают отравление. В отличие от них тяжёлые металлы как свинец, кадмий, ртуть и таллий не эссенциальные и токсические для организма уже в очень маленьких количествах. Отравление домашних животных этими тяжёлыми металлами результат их непланированного входа в животный организм, чаще всего через контаминированный корм, воду или воздух. Они имеют тенденцию биоаккумуляции в живом организме, а явление манифестных знаков их токсичности варьирует в зависимости от природы химического соединения в котором находятся, затем количества и времени подвергнутости, животного вида, возраста, пола словно и воздействия окрестности и неприменно способа кормления. У некоторых тяжёлых металлов существуют большие разницы в вызывании токсических эффектов, как после однократного подвергания их высокими концентрациями или же подвергания животных низкими концентрациями этих токсикантов в течение более долгого временного периода (хроническое подвергание). Цель этой работы показать возможные источники отравления и токсичность некоторых тяжёлых металлов (свинец, ртуть, кадмий, таллий) словно и более новые познания о токсических эффектах этих металлов на здоровье домашних животных.

Ключевые слова: тяжёлые металлы, домашние животные, токсичность, свинец, кадмий, ртуть, мышьяк, таллий

PRIKAZI KNJIGA – BOOK REVIEWS

Dr sci. med. vet. Snežana Ivanović:
BIBLIOGRAFSKA MONOGRAFIJA "NA PUTU"

Izdanje: Naučni institut, Beograd, 2008. god.

Monografske bibliografske publikacije su retkost kod nas. One nam daju prikaz opusa referenci autora sa sažecima i predstavljaju u mnogome koristan izvor podataka za sve potonje istraživače o oblastima kojima se autor bavi. Sada je pred nama jedno ovakvo delo bibliografska monografija "Na putu", autora dr Snežane Ivanović, višeg naučnog saradnika, zaposlenog u Naučnom institutu za veterinarstvo Srbije u Beogradu. Za razliku od sličnih štiva u kojima se daje taksativan prikaz naučnoistraživačkog rada autora kroz objavljene publikacije i separate, četo suvoparno nabrojane i složene po kriterijumima ili godištima, navedeno delo je autobiografski – lični pristup autora koja je načinila od bibliografskog istovremeno i narativno delo.

Svoj stav prema onome što je bilo i završnom koraku ka zvanju savetnika (koji je ujedno i najviše naučnoistraživačko zvanje) autor možda najbolje iznosi početnom rečenicom u knjizi: "Priča o mom hodu po putu do naučnog savetnika namenjena je mlađim kolegama". U njoj je definisana potka celog štiva, da kroz jedan narativan, ali i poučan način povede čitaoca kroz svoj dosadašnji radni vek, odnosno preko 26 godina rada, proveden prvo na stručnim, a zatim naučnoistraživačkim poslovima vezanim za bezbednost i kvalitet mesa.

Monografija "Na putu" je napisana na 265 stranica i podeljena je u XI poglavlja i to: Na putu do naučnog savetnika, *I Kako sam počela i dokle sam stigla*, *II Bakteriološka kontaminacija mesa*, *III Paraziti u mesu*, *IV uticaj probiotika na kvalitet i bakteriologiju mesa*, *V Kvalitet namirnica*, *VI Radovi iz proizvodnje u stočarstvu*, *VII Primenjena naučna istraživanja*, *VIII Šta mi se još našlo na putu*, *IX Šta dalje*, *X Kako stići do naučnog savetnika*, *XI Bibliografija radova dr Snežane Ivanović*.

Gledano u celini, osnovni i najvažniji delovi rukopisa odnose se na prikaz naučnoistraživačkog rada autora, a prateći tok knjige, ulazimo u svet istraživanja kojima se autor bavi i koja su podeljena na logične celine po vrsti problema koje prati. Iz njih se lako uočava da je najveći, a svakako i najvredniji deo naučnoistraživačkog rada autora posvećen bakterijskim agensima, kontaminacijama mesa (kampilobakterije, salmonelle, listerije) značajnim za zdravlje ljudi. Iz ove oblasti objavljeno je najviše radova, koji su štampani u svetskim naučnim časopisima. Pri tome, *Campylobacter* spp. je svakako dominantan agens koji je najviše obrađen od strane autora i za njega je vezana njena specijalizacija, magistarska teza i dobrim delom i doktorska disertacija.

Značajan deo njenog naučnog opusa vezan je i za izučavanje kontaminiranosti mesa parazitima značajnim za zdravlje ljudi (toksoplazmoza, ehinokokoza). U ovoj oblasti su posebno obimna njena istraživanja vezana za prevalencu toksoplazmoze u mesu (rađena u saradnji sa dr I. Pavlovićem) i ona su prva te vrste u našoj zemlji.

Veliki deo svog naučnoistraživačkog rada dr Snežana Ivanović je posvetila parametrima kvaliteta mesa različitih vrsta životinja, njegovim senzornim osobinama, hemijskom sastavu i nutritivnoj vrednosti, kao i činiocima koji utiču na parametre kvaliteta mesa. U ovaj deo istraživačkog rada ulaze i radovi u kojima se govori o prinosu mesa vezanih za uticaj načina proizvodnje u stočarstvu i ova istraživanja su mahom vršena u okviru naučnih (nacionalnog i razvojnog) projekata Ministarstva nauke.

Monografija se lako prati zahvaljujući pre svega ličnom pristupu autora, koji na lep i jasan način uvodi čitaoca u ovo štivo i pruža odgovore na pitanja koje je autor postavio i sebi i ispred sebe na putu do naučnog savetnika.

Beograd, 09. 11. 2008.

Dr Ivan Pavlović, naučni saradnik

VETERINARI IZ SRBIJE NA VETERINARSKOJ KONFERENCIJI U SLOVAČKOJ

Svetska organizacija veterinara Mađara, čiji su članovi veterinari iz Mađarske, Srbije, Rumunije, Slovačke i Ukrajine, svoju redovnu godišnju konferenciju ove 2009. godine je održala u Slovačkoj. Skup je održan u Visokim Tatrama u mesu Tatranske Lomnice. Bilo je više od 400 učesnika. Iz naše zemlje na skupu je učestvovalo 27 veterinara.

Učesnike je dočekaio divan prizor u Visokim Tatrama. Sneg do kolena, prava novogodišnja atmosfera.

16. 10. 2009. godine je bio prvi dan konferencije.

Predsednik SOVM, Sibert Istvan, pozdravio je skup i učesnicima poželio uspešan rad. Rad se odvijao u vidu plenarne sednice. Bilo je nekoliko izuzetnih predavanja.

Šotonji Peter i Frenjo Laslo su održali predavanje o anatomiji i fiziologiji muških i ženskih polnih organa. Šotonji Peter je prikazao svoju fenomenalnu i jedinstvenu kompjutersku animaciju determinacije pola u ranom embrionalnom razvoju, uključujući i ulogu X i Y polnih hromozoma. Publika je nagradila predavača velikim aplauzom.

Orban Eva, načelnik univerzitetske biblioteke na Veterinarskom fakultetu u Budimpešti, u svom predavanju je isticao značaj virtuelne biblioteke i interneta kako za studente, za postdiplomce, tako i za veterinare u svakodnevnoj praksi.

Dušan Rajsky, naučni saradnik Veterinarskog instituta u Zvolenu, održao je predavanje pod naslovom "Fibromatoza jelena".

Prvi dan konferencije se završio svečanom večerom na kojoj je prisutne pozdravio i potpredsednik Veterinarske komore Slovačke, Tibor Brauner. Posebno je istakao značaj kontinuirane edukacije veterinara u svakodnevnoj praksi.

Drugog dana, 17. 10. 2009. godine, rad konferencije se odvijao u dve sekcije.

U sekciji za velike životinje bilo je predavanja o sinhronizaciji estrusa, o novim metodama u veštačkom osemenjavanju svinja, kao i o ekonomskim gubicima koji su posledica problema u reprodukciji. U ovoj sekciji naš kolega iz Veterinarskog specijalističkog instituta "Subotica", mr Horvat Jožef, održao je predavanje pod naslovom "Reprodukcija nega u zapaćima mlečnih krava.

Vet. glasnik 63 (5-6) 409 - 410 (2009) Vesti

U sekciji za male životinje čuli smo interesantno predavanje o ishrani pasa i mačaka, sa naročitim osvrtom na greške u ishrani. Problematika kontracepcije i reprodukcije pasa i mačaka privukla je pažnju mnogih kolega.

Juhas Čaba je održao iscrpno predavanje o ovario-histerektomiji kuja. Predavanje je ilustrovaio filmom, a svaki učesnik je na kraju dobio brošuru, koja fotografijama prikazuje svaki korak ovog hirurškog zahvata.

Seminar se završio u subotu popodne. Učesnici su sa puno utisaka i novih informacija krenuli svojim domovima.

Veterinarska komora Srbije učesnicima ovog dvodnevnog naučnog skupa dodelila je ukupno 6 bodova.

Sečedi Ferenc

Koordinator SOMV za Srbiju

DIPLOMIRANI STUDENTI – DOKTORI VETERINARSKE MEDICINE
– GRADUATE STUDENTS – DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
U BEOGRADU 2009. GODINE

Jovanović S. Nikola

Rođen 27. 04. 1981. u Valjevu
Diplomirao 22. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Mionica
Radobić b.b.

Jovanović M. Vujadin

Rođen 09. 09. 1980. u Kragujevcu
Diplomirao 23. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Kragujevac
Svetozara Markovića 107

Mamula Đ. Danilo

Rođen 16. 03. 1979. u Ogulinu,
R Hrvatska
Diplomirao 23. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka N. Beograd
Bul. Zorana Đinđića 36

Mirilović G. Milena

Rođena 01. 03. 1983. u Karlovcu,
R Hrvatska
Diplomirala 23. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Borča
Borčanskih žrtava 1914/92

Petrović M. Aleksandar

Rođen 02. 06. 1981. u Beogradu
Diplomirao 24. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Mladenovac
Despota Stefana Lazarevića 58

Vladović V. Vladimir

Rođen 09. 04. 1979. u Zaječaru
Diplomirao 24. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Negotin
Đure Salaja 11

Božić R. Aleksandar

Rođen 05. 04. 1981. u Beogradu
Diplomirao 25. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Obrenovac
Zmaj Jovina 20

Laudanović M. Milan

Rođen 03. 09. 1983. u G. Milanovcu
Diplomirao 25. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka G. Milanovac
Rada Končar 23

Stevanović P. Ivan

Rođen 05. 07. 1977. u Smederevu
Diplomirao 25. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Smederevo
Despota Stevana 4/5

Kostadinović I. Vladimir

Rođen 17. 03. 1982. u Valjevu
Diplomirao 26. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Kozlajić
Brankovina

Smiljanić L. Slađana

Rođena 07. 08. 1980. u Rumi
Diplomirala 26. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Ruma
Ive Lole Ribara 153

Bulić D. Dragoljub

Rođen 16. 08. 1977. u Požegi
Diplomirao 29. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Požega
Ustanička 15

Jovanović B. Dejan

Rođen 10. 06. 1983. u S. Palanci
Diplomirao 29. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka S. Palanka
Crvene Armije 43

Jovičić A. Miloš

Rođen 28. 08. 1982. u Čačku
Diplomirao 29. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Kotraž

Mandić M. Marija

Rođena 26. 11. 1982. u Šibeniku
R Hrvatska
Diplomirala 29. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Kragujevac
Carice Milice 14

Radenković M. Bojana

Rođena 24. 04. 1981. u S. Palanci
Diplomirala 29. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Mionica
Selo Radobić b.b.

Terzić S. Petar

Rođen 06. 11. 1980. u Valjevu
Diplomirao 29. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Valjevo
Dupljaj, Divci

Čakarević B. Branko

Rođen 12. 10. 1982. u Arandelovcu
Diplomirao 30. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Arandelovac
Doktora Đike 14

Jevtić D. Predrag

Rođen 31. 08. 1981. u Valjevu
Diplomirao 30. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Valjevo
Marka Kraljevića 61

Sourtzopoulos G. Anastasios

Rođen 17. 04. 1981. u Peristeri,
Atika, Grčka
Diplomirao 30. 06. 2009. godine
Stalno mesto boravka Peristeri, Athens
Kountourioti 15

Miljas N. Jako

Rođen 25. 01. 1984. u Trebinju,
R Srpska, BiH
Diplomirao 17. 07. 2009. godine
Stalno mesto boravka Trebinje
Luke Vukalovića 33

Bjelac M. Boriša

Rođen 20. 06. 1978. u Gradišci,
R Srpska, BiH
Diplomirao 15. 09. 2009. godine
Stalno mesto boravka Gradiška
Nova ulica b.b., N. Topola

Lukač M. Bojan

Rođen 10. 11. 1984. u Zadru,
R Hrvatska
Diplomirao 15. 09. 2009. godine
Stalno mesto boravka Prijedor,
R Srpska, Ništavci 44

Nenadić M. Zoran

Rođen 01. 02. 1978. u Sisku,
R Hrvatska

Diplomirao 15. 09. 2009. godine
Stalno mesto boravka Zrenjanin
4. jul 27

Vešić M. Tamara

Rođena 20. 11. 1977. u Šapcu
Diplomirala 17. 09. 2009. godine
Stalno mesto boravka Šabac
Kralja Petra Prvog 16

Miloradović M. Miloš

Rođen 07. 03. 1982. u Požarevcu
Diplomirao 17. 09. 2009. godine
Stalno mesto boravka Kučevo
Slobodana Jovića 10

Atanasijević S. Nikola

Rođen 30. 01. 1982. u Beogradu
Diplomirao 01. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Pariske komune 8/51

Đokić R. Vitomir

Rođen 15. 12. 1984. u Beogradu
Diplomirao 12. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Todora Dukina 13

Jovetić J. Branko

Rođen 17. 03. 1982. u Beogradu
Diplomirao 12. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Salvadora Aljendea 29

Živković Z. Dejan

Rođen 18. 05. 1980. u Kraljevu
Diplomirao 14. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Medveđa,
Trstenik

Gajić V. Dragan

Rođen 30. 01. 1980. Beogradu
Diplomirao 14. 10. 2009. godine

Stalno mesto boravka Beograd
Kombinatova 14

Ćirić Đ. Tatjana

Rođena 12. 09. 1981. u Beogradu
Diplomirala 20. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Kraljice Katarine 93

Panić R. Vladimir

Rođen 20. 12. 1982. u Valjevu
Diplomirao 20. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Koceljeva
Diše Atića 39

Ćuić Ž. Nemanja

Rođen 25. 09. 1979. u Zemunu
Diplomirao 21. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Indija
Banović Strahinje 65

Đorđević M. Dragiša

Rođen 14. 09. 1983. u Kraljevu
Diplomirao 21. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Ratina
Ratina 170

Ivaštanin Ž. Siniša

Rođen 02. 10. 1978. u Gradišci,
R Srpska, BiH
Diplomirao 21. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Gradiška,
R Srpska, Vidovdanska 64

Živanović Ž. Dalibor

Rođen 16. 02. 1981. u Smederevu
Diplomirao 21. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Smederevo
Cara Dušana 34

Belić M. Spomenka

Rođena 31. 03. 1981. u Beogradu
Diplomirala 22. 10. 2009. godine

Stalno mesto boravka Mladenovac
Vladimira Čorovića 22

Đorić M. Vladimir

Rođen 21. 03. 1980. u Nišu
Diplomirao 22. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Niš
Đorđa Krstića 16

Filipović M. Vladan

Rođen 24. 08. 1981. u Valjevu
Diplomirao 22. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Koceljeva
Diše Atića 23

Mitrović Ž. Dejan

Rođen 26. 05. 1981. u Valjevu
Diplomirao 22. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Valjevo
Selo Gornja Grabovica b.b.

Lacko I. Irena

Rođena 30. 11. 1979. u Pančevu
Diplomirala 23. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Pančevo
Petefi Šandora 34

Ristić B. Jelisaveta

Rođena 16. 12. 1982. u Beogradu
Diplomirala 23. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Cerski venac 14

Mitić D. Biljana

Rođena 26. 09. 1980. u Zaječaru
Diplomirala 27. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Zaječar
Zagorska 9

Stamenković S. Radomir

Rođen 18. 10. 1981. u Priboju
Diplomirao 29. 10. 2009. godine
Stalno mesto boravka Krajčinoći

Bošnjak P. Jasna

Rođena 06. 03. 1982. u Pančevu
Diplomirala 06. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Pančevo
M. P. Alasa 5

Prokić B. Bogomir-Bolka

Rođen 21. 05. 1982. u Beogradu
Diplomirao 06. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Gandijeva 164

Jovanović M. Miroslav

Rođen 21. 07. 1982. u Bijeljini,
R Srpska, BiH
Diplomirao 17. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Ugljevik
Stari Ugljevik b.b.

Dimitrijević S. Darko

Rođen 03. 02. 1980. u Knjaževcu
Diplomirao 18. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Knjaževac
Vasilj

Šojić M. Aleksandar

Rođen 08. 10. 1978. u Užicu
Diplomirao 18. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Požega
Pavla Štula 19

Vučićević Z. Miloš

Rođen 17. 01. 1985. u Beogradu
Diplomirao 20. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Bulevar oslobođenja 43

Đorđević Z. Đorđe

Rođen 28. 08. 1981. u Nišu
Diplomirao 23. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Bor
Save Kovčevića 7

Đurić M. Jelena

Rođena 19. 01. 1986. u Beogradu
Diplomirala 20. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Jurija Gagarina 55

Ivanović S. Vladimir

Rođen 30. 01. 1983. u Kopru,
R Slovenija
Diplomirao 23. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Leskovac
Ilije Strele 6

Novaković S. Jovana

Rođena 14. 01. 1981. u Beogradu
Diplomirala 23. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Velislava Vulovića 1

Polić N. Draško

Rođen 06. 01. 1980. u Banja Luci,
R Srpska, BiH
Diplomirao 23. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Banja Luka
Braće Jugović 72

Branković Z. Ana

Rođena 10. 10. 1982. u Zemunu
Diplomirala 24. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Gandijeva 81

Ćosović M. Jelena

Rođena 26. 01. 1980. u N. Pazaru
Diplomirala 26. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Ranka Tajsića 32

Đekanović J. Radojica

Rođen 30. 04. 1982. u Doboju,
R Srpska, BiH
Diplomirao 26. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Doboj
Stanari b.b.

Jelić S. Živko

Rođen 04. 02. 1979. u Sisku,
R Hrvatska
Diplomirao 26. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Ban. Karlovac
Vuka Karadžića 112

Nadaškić R. Ivan

Rođen 17. 03. 1981. u Smederevu
Diplomirao 26. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Smederevo
Karađorđeva 55

Simeunović R. Predrag

Rođen 17. 04. 1984. u Šapcu
Diplomirao 26. 11. 2009. godine
Stalno mesto boravka Šabac
Kralja Milutina 32

Cvetanović T. Ivana

Rođena 18. 05. 1981. u Leskovcu
Diplomirala 03. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Despotovačka II deo 6A

Stanković A. Ivica

Rođen 12. 02. 1981. u Leskovcu
Diplomirao 16. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Turekovac
Blagoja Nikolića 7

Drinjak S. Dragana

Rođena 27. 12. 1984. u Trebinju,
R Srpska, BiH
Diplomirala 17. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Trebinje
Dr Draga Perovića 8

Čupić I. Mile

Rođen 23. 04. 1978. u Gradišci,
R Srpska, BiH
Diplomirao 22. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Zemun
Lazara Mamuzića 16c

Novaković T. Lazar

Rođen 29. 04. 1979. u Banja Luci,
R Srpska, BiH
Diplomirao 22. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Banja Luka
Cara Lazara 23

Petković R. Sanja

Rođena 16. 05. 1980. u Zemunu
Diplomirala 22. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Doboj
Đenerala Draže 34

Ostojić Ž. Saša

Rođen 14. 05. 1981. u Kranju,
R Slovenija
Diplomirao 23. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Badovinci
Drinske divizije 73, Crnob. Salaš

Cvetković M. Vladimir

Rođen 24. 06. 1979. u Kruševcu
Diplomirao 23. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Kruševac
Raška 30

Stevanović S. Dragoljub

Rođen 19. 01. 1982. u Ratkovićima,
Srebrenica, R. Srpska, BiH
Diplomirao 23. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Lazarevac
Cara Uroša 56A

Cvetković M. Lazar

Rođen 27. 10. 1980. u Kruševcu
Diplomirao 24. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Kruševac
Raška 30

Đorđević Z. Ljiljana

Rođena 29. 10. 1981. u Beogradu
Diplomirala 28. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka N. Beograd
Dušana Vukasovića 82

Đukić B. Ivana

Rođena 08. 10. 1984. u Dereventi,
R Srpska, BiH
Diplomirala 24. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Beograd
Šavnička 32

Mančić P. Bojan

Rođen 27. 02. 1981. u Zaječaru
Diplomirao 28. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Sumrakovac

Mandić N. Dušan

Rođen 04. 09. 1970. u Zrenjaninu
Diplomirao 29. 12. 2009. godine
Stalno mesto boravka Krajišnik
Rajka Bosnića 3

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 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 zare-zom. Obim rukopisa bez priloga, ne treba da bude veći od 8 stranica kucanog teksta, izbegavati veliki broj priloga.

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

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

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

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

POGLAVLJA RADA

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

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

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

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

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

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

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

Primeri:

1. Članak u časopisu:

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

2. Knjige i druge monografije:

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

3. Poglavlja u knjizi:

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

4. Rad ili apstrakt u Zborniku radova:

Ćupić V, Trailović D, Dobrić S, Velez R. Značaj racionalne primene lekova u veterinarskoj medicini. *Proceeding of Workshop Clinica Veterinaria Ohrid, Macedonia*, 3-7. September 2005: 207-9.
Ćupić V, Trailović D. Neracionalna primena lekova u veterinarskoj medicini – rizik po zdravlje ljudi. *Zbornik kratkih sadržaja radova 16. savetovanja veterinaru 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