

UDK 619 (05)

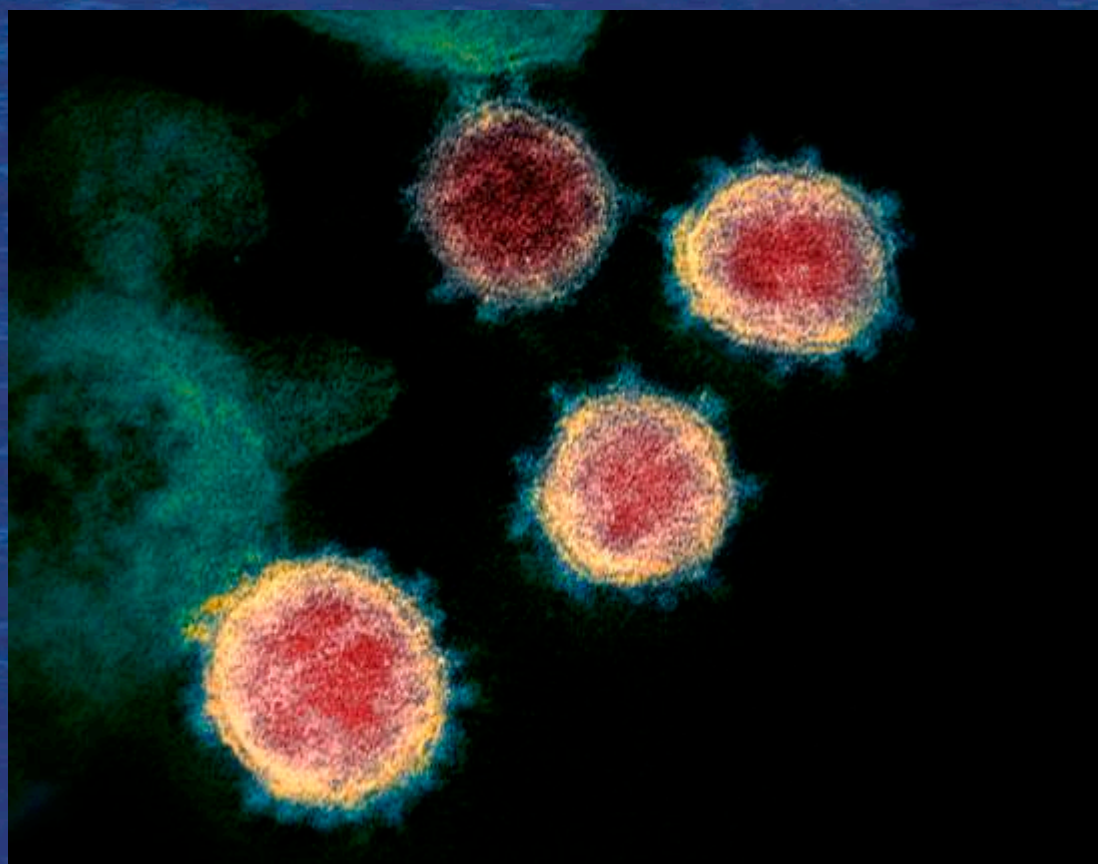
ISSN1840-2887Штампа-Print
ISSN 2303-4475 Online

ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ



Veterinary Journal of Republic of Srpska

Волумен/Volumen XIX, бр./No 2, стр./page 201-325, Бања Лука/Ванја Лука, 2019



Electron micrograph of SARS-CoV-2 virions

https://en.wikipedia.org/wiki/Severe_acute_respiratory_syndrome_coronavirus_2#/media/File:SARS-CoV-2_49534865371.jpg

UDK 619 (05)

ISSN 1840-2887 – Штампа – Print

ISSN 2303-4475 – Online

ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ VETERINARY JOURNAL OF REPUBLIC OF SRPSKA

Научно-стручни часопис – Scientific and professional journal

Ветеринарски журнал Републике Српске, Вол. 19, број 2, стр. 201–325, Бања Лука, 2019.
Veterinary Journal of Republic of Srpska, Vol. XIX, No 2, page 201–325, Banja Luka, 2019.

ИЗДАВАЧ – PUBLISHER:

ЈУ ВЕТЕРИНАРСКИ ИНСТИТУТ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ „Др Васо Бутозан“, БАЊА ЛУКА
PI VETERINARY INSTITUTE REPUBLIC OF SRPSKA „Dr. Vaso Butozan“, BANJA LUKA

ГЛАВНИ УРЕДНИК – EDITOR IN CHIEF:

Проф. др Драго Н. Недић, Prof. dr. Drago N. Nedic (БиХ-РС, В&Н-RS)

МЕЂУНАРОДНИ УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР – INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD:

Др Владо Теодоровић, Dr Vlado Teodorović, PhD, (Србија – Srbija)
Др Жељко Цветнић, Dr Željko Cvetnić, PhD, (Хрватска – Croatia)
Др Андреј Кирбиш, Dr Andrej Kirbiš, PhD (Словенија – Slovenia)
Др Нихад Фејзић, Dr Nihad Fejzić, PhD, (БиХ, В&Н)
Др Лазо Пендовски, Dr Lazo Pendovski, PhD, (Македонија, Makedonija)
Др Милан Балтић, Dr Milan Baltić, PhD, (Србија – Srbija)
Др Јанко Иванов, Dr Yanko Ivanov, PhD (Бугарска, Bulgaria)
Др Предраг Слијепчевић, Dr Predrag Slijepčević, PhD (Велика Британија – United Kingdom)
Др Нектариос Д. Гиадинис, Dr Nektarios D. Giadinis (Грчка, Greece)
Др Мајкл Гилсдорф, Dr Michael Gilsdorf, PhD (САД – United State of America)
Др Семир Лончаревић, Dr Semir Lončarević, PhD (Норвешка – Norvegian)
Др Миломир Ковач, Dr Milomir Kovač, PhD, (Руска Федерација, Российская Федерација)
Др Лидија Козачински, Dr Lidija Kozačinski, PhD, (Хрватска – Croatia)
Др Неђељко Карабасил, Dr Nedjeljko Karabasil, PhD, (Србија – Srbija)
Др Смиљана Параш, Dr Smiljana Paraš, PhD, (БиХ – РС, В&Н – RS)
Др Миленко Шарић, Dr Milenko Šarić, PhD, (БиХ – РС, В&Н – RS)
Др Родољуб Тркуља, Dr Rodoljub Trkulja, PhD, (БиХ – РС, В&Н – RS)
Др Жељко Сладојевић, Dr Željko Sladojević, PhD, (БиХ, В&Н)
Др Весна Калаба, Dr Vesna Kalaba, PhD, (БиХ – РС, В&Н – RS)
Др Драган Касагић, Dr Dragan Kasagić, PhD, (БиХ – РС, В&Н – RS)
Др Бојан Голић, Dr Bojan Golić, PhD, (БиХ, В&Н)
Др Виолета Сантрач, Dr Violeta Santrač, PhD, (БиХ – РС, В&Н – RS)

ЛЕКТОР – ЛЕКТОР: мр Александра Савић, mr Aleksandra Savić

Преводилац на енглески/Translator in English: Проф. Нивес Јаковљевић, Prof. Nives Jakovljević

РЕЦЕНЗИЈА:

Часопис се упућује на двоструку рецензију еминентним стручњацима овисно о тематици рада

The journal is referred to a dual review by eminent experts depending on the theme of work

ГОДИШЊЕ СЕ ОБЈАВЉУЈУ 2 БРОЈА ЧАСОПИСА (јун/децембар)

Часопис је бесплатан и објављује се у електронској верзији и штампа у 300 примјерака

На основу Мишљења Министарства науке и технологије Републике Српске, часопис је ослобођен пореза на промет.

Штампа: Comesgrafika, Бања Лука

Ветеринарски журнал Републике Српске, 78000 Бања Лука, Бранка Радичевића 18,

Тел: 051/229-210, Е-mail: drago.nedic@virs-vb.com,

<http://virs-vb.com/veterinarski-zurnal-rs/> <http://doirspska.nub.rs/index.php/VJRS>

Обим и политика часописа

Ветеринарски журнал Републике Српске је покренут 2001. године како би истраживачи и стручњаци код нас и у региону и широм свијета могли да објављују своја истраживања и радове. Часопис је посвећен унапређењу и ширењу научних сазнања о ветеринарским наукама и сродним академским дисциплинама. Ветеринарски журнал Републике Српске је отвореног приступа, рецензирани научни часопис ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан” Бања Лука, Република Српска/БиХ, посвећен објављивању оригиналних научних радова, прегледних радова, мини прегледних радова, кратких комуникација, стручно-техничких извјештаја, приказа случаја и писама уреднику. Ветеринарски журнал Републике Српске објављује се на српском и енглеском језику, у годишњим волуменима који се састоје од два броја, на моделу *Open Access* који омогућава високу видљивост радова. Ветеринарски журнал Републике Српске је индексан као национални часопис. Сваки рукопис биће обрађен од стране два рецензента који пружају квалитетну уредничку обраду. Упутства за пријављивање рукописа, припрему рада, процедуру рецензије и све остале детаље доступна су на страницама часописа. Ова страница ће ауторе упутити корак по корак кроз процес пријављивања (Упутство за ауторе).

Ветеринарски журнал Републике Српске је часопис отвореног приступа. Сви радови могу се бесплатно преузети и користити у складу са *Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)*.

Scope and Policy of the Journal

Veterinary Journal of Republic of Srpska was launched in 2001 to offer researchers and professionals in the region and worldwide a place to publish their research findings and work. The Journal is devoted to the advancement and dissemination of scientific knowledge concerning veterinary sciences and related academic disciplines. *Veterinary Journal of Republic of Srpska* is an open access, peer-reviewed scientific journal published by the PI VETERINARY INSTITUTE REPUBLIC OF SRPSKA „Dr. Vaso Butozan,, BANJA LUKA, Republic of Srpska/B&H, and dedicated to the publication of full research papers, reviews articles, mini review articles, short communications, technical reports, case reports and letters to the Editor. *Veterinary Journal of Republic of Srpska* is published in Serbian and English, in yearly volumes comprising two issues, on an Open Access model which allows high visibility of articles. *Veterinary Journal of Republic of Srpska* is indexed as a national journal. Each manuscript will be handled by two reviewers providing quality editorial processing. The instructions for manuscript submission, paper preparing, peer-review procedure and all other details are available on the Journal homepage. This site will guide Authors stepwise through the submission process (Author Guidelines).

Veterinary Journal of Republic of Srpska is an Open Access Journal. All articles can be downloaded free of charge and used in accordance with the Creative Commons Attribution 4.0 International License(CC BY 4.0).

САДРЖАЈ / CONTENTS

1. BOLESTI KOJE SU MIJENJALE SVIJET	206
<i>Željko Cvetnić, Darko Majnarić, Branko Bačanek, Jadranka Jurmanović, Jadranka Sokolović, Ivica Pavljak, Tomislav Sukalić, Vesna Jaki Tkalec, Ana Končurat, Maja Kiš, Sanja Furmeg</i>	
1. DISEASES THAT CHANGED THE WORLD	217
<i>Željko Cvetnić, Darko Majnarić, Branko Bačanek, Jadranka Jurmanović, Jadranka Sokolović, Ivica Pavljak, Tomislav Sukalić, Vesna Jaki Tkalec, Ana Končurat, Maja Kiš, Sanja Furmeg</i>	
2. ЗНАЧАЈ ДИФЕРЕНЦИЈАЛНЕ ДИЈАГНОСТИКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ И РЕЗИЛИЈЕНЦИЈЕ КОД ПРЕЖИВАРА	228
<i>Тамара Илић, Зоран Кулишић, Дарко Деспотовић, Бојан Гајић, Даница Богуновић, Санда Димитријевић</i>	
2. THE IMPORTANCE OF DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RESISTANCE AND RESILIENCE IN RUMINANTS	240
<i>Tamara Ilić, Zoran Kulišić, Darko Despotović, Bojan Gajić, Danica Bogunović, Sanda Dimitrijević</i>	
3. УТИЦАЈ ТЕЛЕСНЕ КОНДИЦИЈЕ ЈУНИЦА НА КОНЦЕНТРАЦИЈУ ГЛУКОЗЕ, БЕТА-ХИДРОКСИБУТИРАТА И АКТИВНОСТ ГЛУТАТИОН-ПЕРОКСИДАЗЕ	251
<i>Александар Никшић, Јована Јечменица, Оливера Валчић, Светлана Милановић</i>	
3. THE EFFECT OF BODY CONDITION SCORE OF HEIFERS ON GLUCOSE AND β-HYDROXYBUTYRATE CONCENTRATIONS AND GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY	258
<i>Aleksandar Nikšić, Jovana Ječmnica, Olivera Valčić, Svetlana Milanović</i>	
4. ANTIBAKTERIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKTA BIJELOG LJILJANA (<i>Lilium candidum</i>)	265
<i>Vesna Kalaba, Željko Sladojević, Željka Marjanović Balaban, Dragana Kalaba, Ivona Panić</i>	
4. ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF WHITE LILY (<i>Lilium candidum</i>) EXTRACT	274
<i>Vesna Kalaba, Željko Sladojević, Željka Marjanović Balaban, Dragana Kalaba, Ivona Panić</i>	
5. MIKROSKOPSKA ISTRAŽIVANJA VUNSKIH VLAČANA PRAMENKE U CILJU KVALITETNIJEG RAZVRSTAVANJA SIROVE VUNE	283
<i>Nadžida Mlaćo, Amela Katica, Velija Katica, Almira Softić, Vedad Šakić, Velida Ćutahija, Pamela Bejdić, Nedžad Hadžiomerović, Jasmin Katica</i>	
5. MICROSCOPIC EXAMINATION OF WOOL FIBERS IN PRAMENKA FOR THE QUALITY CLASSIFICATION OF RAW WOOL	290
<i>Nadžida Mlaćo, Amela Katica, Velija Katica, Almira Softić, Vedad Šakić, Velida Ćutahija, Pamela Bejdić, Nedžad Hadžiomerović, Jasmin Katica</i>	
6. ПОСТОПЕРАТИВНА ИНФЕКЦИЈА РАНЕ ТВРДОГ НЕПЦА СА <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> КОД ПСА: ПРИКАЗ СЛУЧАЈА	297
<i>Оливер Стевановић, Миљан Добријевић, Дејан Вујанић, Драго Недић</i>	

6. POSTOPERATIVE WOUND INFECTION OF HARD PALATE WITH KLEBSIELLA PNEUMONIAE IN A DOG: CASE REPORT	302
<i>Oliver Stevanović, Miljan Dobrijević, Dejan Vujanić, Drago Nedić</i>	
7. KORIŠTENJE OBROKA NA OSNOVI SIROVOG MESA (BARF) U HRANIDBI PASA I MAČAKA.....	306
<i>Diana Brozić, Željko Mikulec, Marko Samardžija, Dražen Đuričić, Hrvoje Valpotić</i>	
7. RAW MEAT-BASED DIET (BARF) IN DOGS AND CATS NUTRITION	314
<i>Diana Brozić, Željko Mikulec, Marko Samardžija, Dražen Đuričić, Hrvoje Valpotić</i>	
8. УПУТСТВО АУТОРИМА ЗА ПРИПРЕМАЊЕ РУКОПИСА	322
8. INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	324

DOI 10.7251/VETJSR1902206C

UDK 616.981.49[636.52]/.57.09:616.98

*Pregledni naučni rad***BOLESTI KOJE SU MIJENJALE SVIJET****Željko CVETNIĆ^{1*}, Darko MAJNARIĆ¹, Branko BAČANEK¹, Jadranka JURMANOVIĆ¹,
Jadranka SOKOLOVIĆ¹, Ivica PAVLJAK¹, Tomislav SUKALIĆ¹, Vesna JAKI TKALEC¹,
Ana KONČURAT¹, Maja KIŠ¹, Sanja FURMEG¹**¹ Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Križevci, Križevci, Hrvatska

* Korespondentni autor: Akademik, prof.dr Željko Cvetnić: cvetnic@veinst.hr

Kratak sadržaj: Različite zarazne bolesti tijekom povijesti imale su dubok utjecaj na čovječanstvo. Njihova pojava uništila je i devastirala cijela područja, uzrokovala broj žrtava koji je osjetno nadrastao i one u ratovima, a nakon pojave takvih bolesti mijenjao se i tijek povijesti. Najvažnije zarazne bolesti poznate su i zapisane u najranijim poznatim zapisima, od postanka svijeta bile su pratitelj ljudskoga roda, velik je njihov utjecaj na razvoj, patnju i smrt koju su tijekom stoljeća uzrokovale u ljudi. Boginje spadaju u najsmrtonosnije i najstrašnije virusne bolesti s kojima se suočilo čovječanstvo. Pandemija španjolske gripe iz 1918. godine je najveći globalni demografski potres koji je svijet ikada doživio. Jedna od najvažnijih transmisivnih (vektorskih) bolesti koje prenose komarci, a uzročnik su protozoe, jeste malarija. Uši prenose uzročnika pjegavog tifusa, rovovske groznice i rekurentne (povratne) groznice. Kugu u prirodnim žarištima prenosi štakorska buha i jedna je od najopasnijih bakterijskih bolesti. Stalni pratilac stradanja, nesreće i patnje ljudi tijekom ratovanja bio je pjegavi tifus. Mnoge ljudske sudbine bile su povezane s tuberkulozom, ona je oduvijek bila neizostavni dio života zajednice. Lepra je jedna od najstarijih i najstrašnijih bolesti. Bila je sinonim za stigmatizaciju i diskriminaciju zbog velikih deformacija na tijelu. Sifilis je stalni i neželjeni suputnik čovječanstva već više od 400 godina. Od prve pojave, sifilis je bila stigmatizirana, sramotna bolest. Suvremena povijest kolere započela je 1817. godine. Kolera uzrokuje tešku kliničku bolest uz ljudsku patnju i paniku, a narušava društvenu i gospodarsku strukturu te razvoj zajednice gdje god se pojavi. Vidljivo je da su kroz čitavu povijest zarazne bolesti imale znatan utjecaj na razvoj i prosperitet čovječanstva. Povijest ljudskog roda zabilježila je mnoge važne ratove i bitke, ali možda su se najveće bitke vodile, a mnoge se još vode, upravo protiv zaraznih bolesti.

Ključne riječi: bolesti, povijest, svijet**UVOD**

Zarazne bolesti su oduvijek pobuđivale najveću pažnju zbog masovnosti pojave, velike smrtnosti među oboljelima i dalekosežnih posljedica koje su prouzročile. Čovjek je bolest prepoznavao kao slabost i nemoć tijela. Opisivane su jednostavnim opisima i uopćenim simptomima te je tako vrlo često teško odrediti o kojoj se bolesti radi. Ugrožavale su zdravlje, a one opasne i život, osobito ako su se pojavljivale kao

epidemije. Velike epidemije su tijekom prošlosti odlučivale o sudbini pojedinih naroda, slabile su snagu moćnih i velikih vojski, prouzročile su glad i bijedu. O epidemijama zaraznih bolesti pišu liječnici, povjesničari i različiti kroničari, pa se iz njihovih zapažanja može saznati o patnjama čovječanstva kroz povijest. Već su stari kulturni narodi upoznali mnoge strahote zaraznih bolesti. Bolest, njihov nastanak i širenje u

skladu su sa medicinskim shvaćanjima toga vremena. Uglavnom postanak epidemija smatraju nadnaravnim uzrokom, a kasnije Božjom kaznom (Glesinger, 1978).

Još uvijek infektivne bolesti zauzimaju visoka mjesta prema uzrocima smrtnosti (u nekim krajevima svijeta čak su na prvom mjestu). Oko 15 milijuna ljudi svake godine umire upravo zbog infektivnih bolesti. Neke su tradicionalne infektivne bolesti suzbijene u razvijenih zemalja, ali su se javile nove s novim uzročnicima, novom kliničko-patološkom slikom i novim problemima za javno zdravstvo (Jeren, 2006).

U ovom preglednom radu biti će ukratko opisane zarazne bolesti koje su poznate i zapsane u najranijim poznatim zapisima. O bolestima koje su bile neprijatelj čovječanstva kroz povijest, njihov utjecaj na razvoj, patnju i smrt koju su tijekom stoljeća uzrokovale u ljudi. Opisane su najznačajnije bolesti koje su se pojavljivale do kraja XIX i na samom početku XX stoljeća (španjolska gripa), a neke su aktualne i danas. Odabir je bio vođen, značenjem i važnošću bolesti te njihovim utjecajem na događaje tijekom povijesti (Cvetnić, 2018).

POVIJEST

Prema raspravama koje su pripisivane Hipokratu (460-377. pr. Kr.), bolest predstavlja gubitak prirodnog sklada, odstupanje od pravila, narušavanje idealnog odnosa među dijelovima skladne cjeline. To je prema Hipokratu opći i lokalni poremećaj između četiri temeljna soka ljudskog tijela (krv, sluz, žuta žuč i crna žuč). Zdravlje je skladan raspored temeljnih sokova, a bolest je nedostatak sokova ili njihova neravnoteža. Broj bolesti je neograničen jer postoji beskraj mogućnosti i neravnoteža između sokova i tijela (Grmek, 2000). Hipokrat je odbacio natprirodne uzroke epidemijskih bolesti i sve bolesti svodi na prirodne uzroke. On vjeruje da u zraku, vodi i truleži ima štetnih tvari, otrovnih isparavanja koje naziva mijazme. Mijazme kvare zrak i čovjek ih udiše zrakom, a u organizmu uzrokuju kvarenje tjelesnih sokova. Masovna pojava bolesti uvjetovana je time što istodobno veliki broj ljudi udiše te otrovne tvari koje u svih izazivaju istu bolest. Tako Hipokrat tumači postanak epidemijskih bolesti. Međutim ni Hipokrat ni drugi liječnici ne poznaju nikakve zaštitne mjere pomoću kojih bi mogle spriječiti epidemije. Jedino što su ljudi poduzimali u vrijeme epidemija bio je bijeg od bolesti (Glesinger, 1978).

Povijest svijeta je isprepletana utjecajem različitih zaraznih bolesti na ljudsku populaciju. Dokazi o boginjama pronađeni su na egipatskoj mumiji. Ebers papirusi u Egiptu oslikani su slikama koje prikazuju infektivne bolesti te sadrže recepte i upute za liječenje mnogih bolesti. Hipokrat je pisao i o širenju bolesti putem zraka i vode, povezivao je klimu, prehranu i životne uvjete kao važne u pojavi zaraznih bolesti. Fracastoro je početkom XVI stoljeća upućivao da bolesti uzrokuju malena, nevidljiva tjelešca (klice), prepoznao je da se izravnim dodirom ili predmetima mogu širiti bolesti te moguće širenje zaraze iz udaljenosti (zrakom). Nikako ih ne šire okultne sile, kako je to tumačila stara medicina već se počinju prihvaćati novi napredniji nadzori. Razvoj mikroskopa u XVII stoljeću omogućio je vizualizaciju mikroorganizama. Krajem XIX stoljeću otkriveni su važni uzročnici najvažnijih bakterijskih bolesti, njihov uzgoj i identifikacija. Razvijena su i korištena različita cjepiva u kontroli i suzbijanju bolesti kao i različite mjera za kontrole i prevencije najvažnijih bolesti. XX stoljeće donijelo je kemoterapiju i antibiotike. Tada se moglo reći da su riješeni gotovo svi praktični problemi u suzbijanju i kontroli zaraznih bolesti koje su se do tada pojavljivale (Brachman, 2003).

BOGINJE

Boginje spadaju u najsmrtonosnije i najstrašnije virusne bolesti s kojima se suočilo čovječanstvo tijekom povijesti. Samo tijekom XX stoljeća epidemije boginja prouzročile su smrt od 300 do 500 milijuna ljudi. Smatra se da su tijekom posljednjih tisuću godina odgovorne za smrt 10% ljudi širom svijeta (Thevez i sur., 2014). U Kini je već u X stoljeću vršena prva zaštita od boginja upuhavanjem u nos praha sasušanih krasti skinutih s bolesnika oboljelih od boginja. Kasnije su se primjenjivali postupci variolizacije pa sve do cijepljenja virusom kravljih boginja koje je prvi primijenio Edward Jenner 1796. godine, a nakon toga je cijepljenje bio postupak koji se primjenjivao u cijelom svijetu (Behbehani, 1983). Taj postupak je zaštitio čovječanstvo i pridonio kasnije značajnom demografskom rastu (Thevez i sur., 2014). Polovicom XX stoljeća boginje su bile znatno proširene u svijetu i endemske u mnogim zemljama, a tada je još uvijek obolijevalo od 10 do 15 milijuna ljudi širom svijeta, a umiralo je oko dva milijuna. Svjetska zdravstvena organizacija je 1967.

donijela Program za suzbijanje velikih boginja. U sljedećih deset godina, uz primjenu cijepljenja, posljednji slučaj velikih boginja zabilježen je 1977. godine u Somaliji, a 1980. godine SZO je proglasila svijet slobodnim od boginja. Boginje su prva i za sada jedina bolest na svijetu koju su ljudi suzbili cijepljenjem i drugim javno zdravstvenim mjerama. Velike boginje su usmratile više ljudi na svijetu nego svi ratovi tijekom povijesti (Morse, 2009). U rod u koji spada variola virus, uzročnik velikih boginja, spadaju vakcinija virus, virus majmunskih i kravljih boginja, virus boginja deva, a sve navedene vrste su zoonoze. Najnovije studije pokazuju da je u budućnosti moguće očekivati evoluciju zoonotskih ortopoksvirusa i nastanak novog virusa sličnog variola virusu (Shchelkunov, 2013). Još uvijek postoje uzorci virusa u laboratorijima u SAD i Rusiji. Kada bi se koristio virus boginja kao biološko oružje, posljedice bi mogle biti vrlo pogubne jer već skoro 40 godina nitko nije cijepljen protiv boginja.

ŠPANJOLSKA GRIPA

Dok danas razmišljamo o prijetnji virusa influence koji će evoluirati i kao rekombiniran i vrlo patogen opet nam se vratiti, ne možemo zaobići priču o svjetskoj pandemiji gripe iz 1918. godine. Pandemija gripe iz 1918. godine je jedna od paradigmi noćne more koja se pojavljuje kad se spominju smrtonosne zarazne bolesti. Španjolska gripa je po svemu sudeći bila najveća prirodna katastrofa početkom XX stoljeća. Službene procjene smrtnosti koje je gripa uzrokovala stalno rastu, jer istraživači i dalje pronalaze podatke u zemljama u razvoju i udaljenim mjestima (Morse, 2009). Početkom XX stoljeća studije su pokazale da je od posljedica španjolske gripe umrlo 21,5 milijuna ljudi, a novije studije procjenjuju da one iznose od 50 pa čak do 100 milijuna ljudi. Procjenjuje se da je jedna trećina tadašnje svjetske populacije ili oko 500 milijuna

ljudi bilo zaraženo i imalo klinički vidljive znakove bolesti. Zato španjolsku gripu i nazivaju "majkom svih pandemija" (*Taubenberger i Morens, 2006*). Ni jedna pošast, ni jedan rat, ni jedno razdoblje gladi u ljudskoj povijesti nije nikada prije usmrtilo toliko ljudi u tako kratkom razdoblju. Pandemija španjolske gripe iz 1918. godine je najveći globalni demografski potres koji je svijet ikada doživio. Španjolska gripa bila je u sjeni Prvog svjetskog rata, iako je odnio znatno manje ljudskih života (otprilike 8 do 10 milijuna), veliki rat je trajao dulje, posvećivala mu se veća medijska pozornost. Javnost je gripu prihvaćala kao produžetak ratnih stradanja, a jedan od razloga je i što je svaki val španjolske gripe trajao razmjerno kratko i ona bi opet nekoliko mjeseci nestala (Anušić, 2015). Pandemija španjolske gripe iz 1918. bila je toliko smrtonosna, i kada bi se španjolska gripa pojavila danas i

usmrtila isti postotak američkog stanovništva, umrlo bi više od 1,5 milijuna Amerikanaca. U bila bi više ljudi u jednoj godini nego što ih svake godine umre od srčanih bolesti, raka, moždanog udara, kroničnih plućnih bolesti, AIDS-a i Alzheimerove bolesti. Epidemija je utjecala na tijek povijesti, ubijajući više Amerikanaca u

jednoj godini nego što ih je umrlo u bitkama u Prvom i Drugom svjetskom, Korejskom i Vijetnamskom ratu (Kolata, 2001). Španjolska gripa može se smatrati "povijesnom" nezgodom i okrutnom posljedicom velikog rata (Erkoreka, 2009).

MALARIJA

Vektori (komarci, krpelji, muhe, buhe, uši i drugi) su prenositelji različitih uzročnika transmisivnih (vektorskih) zaraznih bolesti s jedne zaražene osobe na drugu ili sa zaražene životinje na čovjeka. Jedna od najvažnijih transmisivnih (vektorskih) bolesti koje prenose komarci, a uzročnik su protozoe je malarija. Malariju su nazivali kraljicom bolesti, poznata je od pamtivijeka. Zauzima jedinstveno mjesto u povijesnim analizama. Neki smatraju da je u mnogome zaslužna i za propast rimskoga carstva. Tijekom povijesti njene žrtve su bili prinčevi, kraljevi i veliki osvajači, a samo je tijekom XX stoljeća uzrokovala smrt između 150 i 300 milijuna ljudi. Drevni spisi i različiti artefakti svjedoče o dugoj vladavini malarije (Carter i Mendis, 2002). U svojoj knjizi o malariji Chloupek (1939) opisuje malariju poput najvećeg carstva na svijetu, a takvo malarično carstvo je za čovjeka carstvo tuge i nevolje. Spominje područja Makedonije gdje je službovao nakon Prvog svjetskog rata, gdje je malarija endemska. U tim selima ljudi su sivi kao i njihove kuće, žutosivi kao ispržena zemlja. Ako im pogledate u oči, ogledalo duše, onda je ta duša jedna teška patnja. Izgradnja Panamskog kanala bila je jedinstven primjer kako bolest može kočiti ljudski napredak. Panamski kanal je

bio jedan od najvećih, najambicioznijih i najznačajnijih inženjerskih projekata u modernoj povijesti. Isto tako bio je i jedan od najsmrtonosnijih poduhvata na svijetu. Radovi su nakon nekoliko godina zaustavljeni zbog visoke smrtnosti radnika na tome projektu. Smatra se da je više od 27 000 ljudi umrlo od bolesti i posljedica, a glavni uzrok je bila malarija (Walker, 2014). Raširenost malarije ovisi o raširenosti vektora, komarca iz roda *Anopheles*. Čak oko 70 vrsta komaraca toga roda ima sposobnost prenošenja uzročnika malarije (Sinka i sur., 2012). Kinin je imao važnu ulogu tijekom kolonijalnih osvajanja, gdje su se bijelci suočavali s tropskim bolestima, a isto tako utjecao je na ratne ishode tijekom povijesti (Curtin, 1990, Bruce-Chwatt, 1988, Brabin, 2014). Nakon više od stoljeća od identifikacije parazita uzročnika malarije i više od pola stoljeća nakon pronalaska učinkovitih lijekova i insekticida protiv komaraca, od malarije još uvijek obolijevaju stotine milijuna ljudi, a stotine tisuća ih umiru, osobito u najsiriromašnijim dijelovima svijeta. Malarija je peti uzrok smrti u svijetu. U mnogim krajevima svijeta malarija je i dalje "kraljica bolesti", a njezino "carstvo" i dalje traje.

KUGA

Kuga je jedna od najopasnijih bakterijskih bolesti. Smatra se da dugo prati ljudski rod, opisivana je još od antičkih vremena. U Svetom pismu za sve nevolje koje čovjek doživljavao, glad i kuga, sve je to bila kazna za grešnike. Kuga je bila sinonim za bolest, nesreću i patnju, od kuge se umiralo u strašnim mukama, bila je jedno od

prokletstava (Dodig, 2013). Epidemija kuge obilježila je čitavo razdoblje kasnog srednjeg i dio ranog srednjeg vijeka. Učinak kuge postaje značajan za povijest čovječanstva. Kroničar navodi da "kuga nije poštjedjela ni jedno mjesto, gdje boravi čovjek, ni otoka ni špilje, niti gorskog vrha..." (Meyer, 1961). Uzročnik se održava

među populacijom divljih glodavaca, vektor je štakorska buha, koja uzročnika širi među glodavcima. Kuga je odavno nestala iz Europe, ali i dalje tinja u žarištima diljem svijeta poput Azije, Afrike, Sjeverne i Južne Amerike. Ne može se

iskorijeniti jer je široko rasprostranjena u prirodnim rezervoarima. U mnogim se slučajevima pokazuje da je ona re-emergentna bolest, koja se nakon mnogo godina ponovno javlja te dalje predstavlja prijetnju javnom zdravlju mnogih zemalja.

PJEGAVI TIFUS

Pjegavi (epidemijski) tifus uzrokuje *Rickettsia prowazekii* koju prenosi prtena uš koja se inficira sišući krv bolesnika u stadiju riketcije-mije. Odigrao je ključnu ulogu tijekom ratova u Europi između XV i XX stoljeća. Najveća poznata epidemija pjegavog tifusa pratila je Napoleonovu vojsku tijekom vojne invazije na Rusiju. Smatra se da je više od 500.000 vojnika umrlo od hladnog vremena i zaraznih bolesti, a jedna od najznačajnijih je bila pjegavi tifus (Raoult i sur., 2004). Pjegavi tifus zabilježen je u Bosni i Hercegovini, a osobito se brzo počeo širiti poslije 1945. godine odmah nakon Drugog svjetskog rata. Te 1945. godine, pojavilo se sto epidemija tifusne groznice, s najvećom incidencijom u Europi koja je iznosila 215/1000 stanovnika u područjima s epidemijom. U suzbijanju bolesti korištene su smjernice jedinstvenog programa koje su korištene u svijetu za iskorjenjivanje bolesti. Od 1971. godine u Bosni i Hercegovini nije više bilo prijavljenih slučajeva tifusa i bolest je iskorijenjena (Puvačić i sur., 2006). U knjizi Augusta Hirsha iz 1883. godine je napisano: "Povijest tifusa je zapisana kao tamna stranica svjetske priče, koji je čovječanstvo posjećivao tijekom ratova, bijede, patnje i boli svake vrste..." (Snyder, 1947).

Između pedesetih i osamdesetih godina, velike epidemije pjegavog tifusa postale su rjeđe, a geografska se distribucija smanjila zbog poboljšanja životnog standarda. Tijekom tog razdoblja, u literaturi su zabilježeni sporadični slučajevi zoonotskog porijekla (u SAD-u) i Brill-Zinsserova bolest. Infekcije s *R. prowazekii* rijetko su opisane u SAD-u, a od 1976. do 2001. godine ukupno je zabilježeno 39 slučajeva oboljenja od pjegavog tifusa u osoba koje nisu imale uši i nisu

bile u dodiru s ušima. Gotovo svi ovi slučajevi bili su u istočnim dijelovima SAD-a. U većini slučajeva dokazan je izravan ili neizravan dodir s letećim vjevericama (*Glaucomys* spp) ili s gnijezdima letećih vjeverica prije pojave bolesti (Reynolds i sur., 2003.). Velike epidemije pjegavog tifusa uglavnom su se zbile u Africi, a prijavljeni su slučajevi u Burundiju, Etiopiji i Ruandi. U Etiopiji je godišnji broj slučajeva tifusa iznosio u rasponu od 7.000 do 17.000 (osim u 1979. godini, kada je ustanovljen veći broj oboljelih). U 1970-ima su se najveće epidemije dogodile u Burundiju i Ruandi. Godine 1975. u Burundi je bilo prijavljeno 9.000 slučajeva oboljelih od pjegavog tifusa (WHO, 1997). Tijekom osamdesetih i devedesetih godina pjegavi tifus je dokazan u siromašnim dijelovima svijeta, a uvijek je povezan s lošim sanitarnim uvjetima (poput zatvora ili izbjegličkih logora) te hladnijom klimom u planinskim područjima. Jedna od važnijih i većih epidemija zabilježena je u Etiopiji 1984. godine kada je registrirano blizu 4.000 oboljelih (*Ndihokubwayo i Raoult, 1999, Lettaief, 2006, Labruna, 2009*). U posljednjih desetljeća pojavile su se povremene epidemije u Africi (Etiopija, Nigerija, Burundi, Ruanda, Uganda), Meksiko, Srednja Amerika, Južna Amerika (osobito Peru), Istočna Europa, Afganistan, Indija i Kina. U sjevernoj Africi, Rusiji i Kazahstanu identificirani su sporadični slučajevi ili male sumnjive epidemije.

Osim pjegavog tifusa, uši prenose povratnu (rekurentnu) i rovošku groznicu. Bolesti su poznate stoljećima, a njihova je pojava najizraženija tijekom ratova. One i dalje predstavljaju glavnu brigu javnog zdravlja u populacijama ljudi koji žive u lošim higijenskim uvjetima zbog

rata, različitih društvenih poremećaja, gladi i siromaštva. U razvijenim zemljama bolesti se često dokazuju u beskućnika, a u zemljama u razvoju epidemije ovih bolesti zabilježene su u

zatvorima i izbjegličkim logorima (*Badiaga i Brougui*, 2012).

TUBERKULOZA I LEpra

Dvije važne i nezaobilazne bolesti uzrokovane mikobakterijama su tuberkuloza i lepra. Tuberkuloza i lepra uz ljudski rod su od prapovijesti pa sve do danas. Mnoge ljudske sudbine bile su povezane s tuberkulozom, ona je oduvijek bila neizostavni dio života zajednice. Nigdje u drevnim zapisima ne postoji zapis njezina početka, ali kroz povijest uvijek je bila prisutna. Tamo gdje su druge epidemije trajale tjednima ili mjesecima, epidemija tuberkuloze trajala bi stoljeće ili dulje. Tuberkuloza je polako i tiho, pužajući, ulazila u domove milijuna ljudi, jednom stigla i nikada ponovo otišla. Pogađala je veliki broj ljudi, a vrlo često su to bila djeca i mladi ljudi, na početku svog života, što je imalo široki društveni utjecaj. U XIX stoljeću se činilo kao da svi umiru od tuberkuloze. Tuberkuloza je postala popularna pojava, prvo kao romantično otkupljenje, a zatim kao odraz društvenih zala (Morens, 2002). Brojne životne sudbine bile su povezane s tuberkulozom, posvećena su joj djela kroz opise likova ili kroz bolest samog umjetnika. Mnogi pjesnici i slikari umrli su mladi od

tuberkuloze, a iza sebe su ostavili veliki opus (Dugac, 2005, Vrga, 2012). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije danas u svijetu još uvijek od tuberkuloze umire oko dva milijuna ljudi, a oboli ih oko osam milijuna (Jeren, 2006).

Lepra je jedna od najstarijih i najstrašnijih bolesti od koje obolijevaju ljudi. Bila je sinonim za stigmatizaciju i diskriminaciju zbog velikih deformacija na tijelu. Od davnina je poznata kao "*smrt prije smrti*". Usprkos terapiji, i dalje je endemska u nekim zemljama (Visschedijk i sur., 2000, Dogra i sur., 2013). Godišnje se dijagnosticira 200.000 novooboljelih od lepre. Prema podacima SZO u 2015. godini lepra je prijavljena u 136 zemalja svijeta, a na svijetu ima oko četiri milijuna ljudi s invaliditetom prouzročenim leprom. Dugo se smatralo da je lepra samo bolest čovjeka, ali dokazano je da su prirodni rezervoari lepre devetokolutni pasanci u SAD i Južnoj Americi (Truman i sur., 2011).

SIFILIS

Sifilis je stalni i neželjeni suputnik čovječanstva već više od 400 godina. Od prve pojave sifilisa je bila stigmatizirana, sramotna bolest. Utjecao je na živote milijuna ljudi u svim društvenim slojevima. Poznato je da su mnoge poznate osobe, različiti umjetnici, pisci, skladatelji i velike povijesne ličnosti bile zaražene sifilisom. Sifilis nije birao razinu socijalnog, društvenog i gospodarskog statusa, od njega su obolijevali

svi. Sifilis je bolest sa sto lica i veliki imitator. Ovaj stari neprijatelj čovječanstva za kojeg se nakon otkrića penicilina smatralo da je na rubu poraza, opet iznenađuje te se vraća i dalje pobuđuje pažnju čovječanstva. U posljednjih 30 godina, zbog homoseksualnih navika, zlouporabe droga i HIV infekcije, broj zaraženih je ponovno u porastu, što predstavlja problem javnog zdravstva (*Marinović i Lipozenčić*, 2002).

KOLERA

Suvremena povijest kolere započela je 1817. godine kada su se počele javljati eksplozivne epidemije kolere u regiji Bengal uz područje rijeke Ganges u Indijskom potkontinentu, gdje je bolest endemična. To je bila prva od sedam do danas zabilježenih pandemija kolere koje su pogodile skoro cijeli svijet i uzrokovale milijune smrtnih slučajeva (*Siddique i Cash, 2014*). Epidemije različitih bolesti su tijekom XIX stoljeća bile vrlo česte, a naročito teško je bilo za vrijeme kolere, koja je uzrokovala vrlo visoku smrtnost.

Broj umrlih je izazivao veliku paniku, a poseban strah i nevjerica potaknuti su simptomima koji su ljudsko tijelo pretvorili u olupinu, što je ovu bolest učinilo strašnom pošasti od koje su se ljudi užasavali (Ipšić, 2010). Izbijanje kolere uzrokuje ljudsku patnju, paniku, narušavanje društvene i gospodarske strukture te razvoj zajednice gdje god se pojave. Prirodne katastrofe poput tsunamija, potresa i ratova znatno povećavaju rizik epidemija s visokim stopama smrtnosti.

EMERGENTNE I RE-EMERGENTNE BOLESTI–NOVA PRIJETNJA SVIJETU?

Vidljivo je da su kroz čitavu povijest zarazne bolesti imale znatan utjecaj na razvoj i prosperitet čovječanstva. Neke bolesti su u razvijenim zemljama suzbijene ili su pod kontrolom, ali u nerazvijenim one i dalje opstaju i od njih oboljevaju milijuni ljudi. Krajem XX. stoljeća, gotovo svi su bili uvjereni da će liječenjem, cijepljenjem i na druge načine uskoro moći iskorijeniti većinu zaraznih bolesti. Međutim, uspjelo se iskorijeniti velike boginje, a rezultati su razočaravajući u borbi protiv malarije ili tuberkuloze koji i dalje predstavljaju problem. Tako da se često ne govori o iskorjenjivanju već samo o nadziranju endemskih bolesti.

Nakon što je primijećena pojava emergentnih i re-emergentnih bolesti Institut za medicinu Nacionalnog vijeća za istraživanje SAD, 1991. godine imenuje devetnaesteročlano multidisciplinarno povjerenstvo za proučavanja pojave novih uzročnika koju su prijetnja zdravlju nacije. Emergentne zarazne bolesti su bolesti koje se po prvi puta pojavljuju u nekoj populaciji, a re-emergentne su one koje se nakon određenog razdoblja ponovno pojavljuju na nekom prostoru gdje su ranije već bile eradikirane. Njihovo izvješće od godine 1992. imalo je naslov: "*Nove zaraze–mikrobna prijetnja zdravlju SAD*". U cijeloj raspravi došlo se do zaključka da postoji šest različitih čimbenika kojima se može objas-

niti pojava emergentnih ili re-emergentnih zaraznih bolesti. Ti čimbenici su: ljudska demografija i ponašanje, tehnologija i industrija, gospodarski razvoj i korištenje zemljišta, međunarodna putovanja i trgovina, adaptacija i promjena mikroorganizama te slom mjera javnog zdravstva (Brachman, 2003). Emergentne zarazne bolesti predstavljaju značajan teret globalnom gospodarstvu i javnom zdravstvu. Između 1940. i 2004. godine pojavile su se 334 emergentne zarazne bolesti u svijetu. Najviša incidenција je bila 1980-tih godina, istodobno s pojavom HIV pandemije. Dominiraju zoonoze (60,3%), a većina zoonoza (71,8%) potječe od divljih životinja. Navodi se da su u 54,3% slučajeva uzročnici bile bakterije i riketije, u 25,4% uzrok su bili virusi, u 10,7% protozoe, u 6,3% gljivice i u 3,3% helminti. Vektorskim bolestima pripada 22,8%, a u posljednjim desetljećima čak 28,8% bolesti (Jones i sur., 2008).

Prije točno 100 godina virus španjolske gripe harao je svijetom. Različiti vrlo slični i promijenjeni virusi ptičje gripe (H5N1), virus pandemijske (nove) gripe A (H1N1) ili neki drugi tipovi poput H7N9 i danas također unose strah, nemir i smrt u pojedine dijelove svijeta. Godine 1977. Svjetska zdravstvena organizacija objavila je da su pobijedene velike boginje, virusna bolest koja je tijekom povijesti prouzročila najveći broj smrtnih slučajeva. Međutim samo nekoliko godina

kasnije, tijekom 1980.-tih, pojavio se novi virus, virus AIDS-a (engl. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) koji je svojom pojavom i posljedicama opet prestrašio svijet. To je sindrom stečnog nedostatka imunosti, što dovodi do stanja oslabljene imunosti, a posljedica je pojava različitih bolesti što se u zdravih ljudi ne bi pojavile. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije u svijetu je 2016. godine živjelo s AIDS-om 36,7 milijuna ljudi, 1,8 milijuna je novootkriveno, a jedan milijun je umro od posljedica bolesti (HZJZ, 2017). U SAD-u u regiji Four Corners pojavila se 1993. godine bolest slična gripi. U oboljelih se razvila teška upala pluća i došlo je do smrti. Virus je u početku nazvan *Sin Nombre* (SNV) (španj. bezimeni), a kasnije je identificiran hantavirus, a prirodni rezervoar virusa je miš (*Peromyscus maniculatus*). Bolest je rijetka, ali vrlo ozbiljna i često smrtonosna (čak do 66,7%) (Torres-Perez i sur., 2010). Infekcija hendra virusom je rijetka zoonoza koja uzrokuje tešku i često smrtonosnu bolest kod inficiranih konja i ljudi. Razboljela se kobila s simptomima sličnim gripi, a od iste bolesti oboljela su dva čovjeka, a umro je vlasnik konja od zatajenja pluća i bubrega. Kasnije je u Australiji opisano više desetaka slučajeva u konja i ljudi. Rezervoari virusa su šišmiši. Virus je prvi puta opisan 1994. godine u Hendri predgrađu Brisbanea u Australiji (Field, 2016). Godine 1997. u Maleziji je identificiran encefalitis i respiratorne bolesti u svinja. Ubrzo nakon toga radnici koji su radili na farmi počeli su se razbolijevati od encefalitisa. Tijekom dvogodišnjeg razdoblja bilo je nekoliko stotina slučajeva bolesti u ljudi s više od 100 smrtnih slučajeva. Iz mozga pacijenta koji je umro izdvojen je nipah virus. Radilo se o paramyxovirusu sličnih karakteristika kao i hendra

virus, a rezervoar je pronađen u šišmišima iz roda *Pteropus* koji se hrane voćem (*Carter i Saunders*, 2007, Ang i sur., 2018). Virus Zapadnog Nila poznat je još 1937. godine kad je izdvojen iz krvi žene u području Zapadnog Nila u Ugandi. Godine 1996. godine zabilježene su infekcije u Europi, a 1999. i u SAD-u. Infekcija virusom Zapadnog Nila tipična je zoonoza koju prenose vektori. Većinom prolazi asimptomatski (u 80% slučajeva), u 20% zaraženih infekcija se očituje kao nespecifična febrilna bolest, a u manje od 1% bolesnika javlja se neuroinvazivna bolest koja se očituje meningitisom i encefalitisom. Različite vrste ptica primarni su domaćini i rezervoari virusa, a glavni vektori su komarci (*Carter i Saunders*, 2007). Prije 15 godina (2003.) u Kini se pojavio SARS (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*). To je teška virusna respiratorna bolest koja može uzrokovati smrtnost i do 15% oboljelih ljudi (*Krajinović i Baršić*, 2003). Godine 2012. u Saudijskoj Arabiji pojavila se nova globalna prijetnja, bolest nazvana MERS (engl. *Middle East respiratory syndrome*), koja uzrokuje tešku respiratornu bolest. Iako je većina pacijenata geografski povezana s arapskim poluotokom, MERS je otkriven i u drugim dijelovima svijeta. Domaćini virusa su deve, a dokazan je i interhumani prijenos. Na Srednjem istoku smrtnost je iznosila čak 25,9%, a 20,4 u Južnoj Koreji (Park i sur., 2018). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije od 2012. do danas bolest je dokazana u 27 zemalja svijeta. Tijekom 2013. godine svijet je uzbunila pojava strašne virusne bolesti ebola koja se pojavila u zapadnoj Africi. Ugroženi su bili milijuni ljudi, a oboljelo ih je više tisuća. Bolest je zoonoza, a virus je dokazan u gorila, čimpanzi, voćnih šišmiša i antilopa (*Jemeršić*, 2014).

ZAKLJUČAK

Povijesno gledano zarazne bolesti imale su duboki utjecaj na ljudsku populaciju, uključujući njezinu evoluciju i razvoj. Pojava bolesti nije jednostavna pojava, ona je dinamična, većina novih bolesti nije uzrokovano novim uzročnicima

oni su uglavnom poznati, ali pojavljuju se ponovno u drugačijim okolnostima, na drugi način, mnoge bolesti promijenile su svoju sliku i utjecaj. Javlja se sve veći broj potencijalno patogenih (oportunističkih) mikroorganizama. Poznato

je da 10–15% infektivnih uzročnika može uzrokovati i maligne bolesti. Lakše se prepoznaju i identificiraju zbog novih i vrlo osjetljivih tehnika kojima se dokazuju. Čovjekove aktivnosti pomažu pojavu bolesti, a različiti društveni, gospodarski, politički, klimatski, tehnološki i okolišni čimbenici mogu utjecati i oblikovati njezinu pojavu. Spoznaja da se zarazne bolesti u potpunosti mogu pobijediti, posljednjih je godina pokolebana pojavom emergentnih i re-

emergentnih bolesti. Unatoč napretku medicine, znanstvenici još uvijek ne nalaze trajna rješenja u nekim područjima svijeta za dugo nam poznate bolesti poput malarije, tuberkuloze ili kolere. Spektar zaraznih bolesti se širi, a problemi infekcija prisutni su u svim aspektima medicine, sve je složenije, a izazovi sve zahtjevniji. Jasno je da na početku novog tisućljeća zarazne bolesti predstavljaju veliku i stalnu prijetnju današnjem društvu i dalje su jedan od najvećih ubojica u svijetu.

LITERATURA

1. Ang B. S. P., Lim T. C. C., Wang L. (2018): *Nipah virus infection*. J Clin Microbiol 56: 6, e01875–17.
2. Anušić N. (2015): *U sjeni velikog rata. Pandemija španjolske gripe 1918. –1919. u sjevernoj Hrvatskoj*. Srednja Europa, Zagreb.
3. Behbehani A. M. (1983): *The smallpox story: life and death of an old disease*. Microbiol Rev 47: 455–509.
4. Bodiaga S., Brouqui P. (2012): *Human louse-transmitted infectious diseases*. Clin Microb Infect 18: 332–337.
5. Brabin B. J. (2014): *Malaria's contribution to World War One - the unexpected adversary*. Malaria Journal 13: 2–22.
6. Brachman P. S. (2003): *Infectious diseases - past, present and future*. Int J Epidemiol 32: 684–686.
7. Bruce-Chwatt L. J. (1988): *Cinchona and its alkaloids: 350 years later*. NY State. J Med 88: 318–322.
8. Carter J., Saunders W. A. (2007): *Hendra virus, Nipah virus*. In: Virology, John Wiley & sons, Ltd. Chuchester, West sussex, England. Str. 275.
9. Carter R., Mendis K. N. (2002): *Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria*. Clin Microbiol Rev 15:564–594.
10. Chloupek D. (1939): *Malaria*. Škola narodnog zdravlja, Zagreb.
11. Curtin P. D. (1990): *The end of the "white man's grave"? Nineteenth-century mortality in West Africa*. J Interdisciplin His 21: 663–688.
12. Cvetnić Ž. (2018): *Bolesti koje su mijenjale svijet*. Medicinska naklada/Hrvatski veterinarski institut, Zagreb.
13. Dodig S. (2016): *Biblijska medicina - O zdravlju, bolesti i smrti u Bibliji*. Medicinska naklada, Zagreb. Bolest, str. 49–123.
14. Dogra S., Narang T., Kumar B. (2013): *Leprosy - evolution of the part to eradication*. Indian J Med Res 137: 15–35.
15. Dugac Ž. (2005): *Zdravstveno prosvjeđivanje protiv tuberkuloze u međuratnoj Hrvatskoj*. Medicus, 14: 155–171.

16. Erkokreka A. (2009): *Origins of the Spanish influenza pandemic (1918-1920) and its relation to the First World War*. J Mol Gen Med 3: 190–194.
17. Field H. E. (2016): *Hendra virus ecology and transmission*. Curr Opin Virol 16: 120–125.
18. Glesinger L. (1978): *Povijest medicine*. Školska knjiga, Zagreb.
19. Grmek M. D. (2000): *Život, bolesti i povijest*. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb.
20. HZJZ (2017): *Svjetski dan AIDS-a 2017*. <https://www.hzjz.hr>.
21. Ipšić I. (2010): *Demografske i društveno-gospodarske posljedice epidemija kolere: primjer epidemije u Drenovcima 1873. godine*. Scrinia slavonica 10: 527–545.
22. Jemeršić L. (2014): *Ebola - zoonoza čija nam pojava stalno prijeti*. Vet Stn 45: 297–305.
23. Jeren T. (2003): *Infektivne bolesti na početku trećeg milenija*. Infektivni Glasnik 26: 99–101.
24. Jones K. E., Patel N. G., Levy M. A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J. L., Daszak P. (2008): *Global trends in emerging infectious diseases*. Nature 451: 990–993.
25. Kolata G. (2001): *Flu-the story of the great influenza pandemic of 1918 and the search for the virus that caused it*. Touchstone Edition, New York.
26. Krajinović V., Baršić B. (2003): *Teški akutni respiratorni sindrom (SARS)*. Medix 51: 35–37.
27. Labruna M. B. (2009): *Ecology of rickettsia in South America*. Ann NY Acad Sci 1166: 156–166.
28. Letaief A. (2006): *Epidemiology of rickettsioses in North Africa*. Ann NY Acad Sci 1078: 34–41.
29. Marinović B., Lipozenčić J. (2002): *Where does syphilis stand in Croatia?* Clin Dermatol 20: 141–146.
30. Meyer K. F. (1961): *Plague*. In: Hull T. G.: Diseases transmitted from animals to man. Springfield, Illinois (USA). Str. 467–508.
31. Morens D. (2002): *At the deathbed of consumptive art*. Emer Inf Dis 8: 1353–1358.
32. Morse S. S. (2009): *Emerging infections: Condemned to repeat?* In: Relman D. A., Hamburg M. A., Choffnes R. A., Mack A.: Microbial evolution and co-adaptation: A tribute to the life and scientific legacies of Joshua Lederberg. National Academies Press, Washington, DC.
33. Ndiokubwayo J. B., Raoult D. (1999): *Epidemic typhus in Africa*. Med Trop 59: 181–192.
34. Park J. E., Jung S., Kim A., Park J. E. (2018): *MERS transmission and risk factors: a systematic review*. BMC Public Health 18:574.doi.org/10.1186/s12889-018-5484-8.
35. Puvačić Z., Beslagić E., Zvizdić S., Puvacić S., Ravlija J., Hamzić S. (2006): *Eradication of typhus exanthematicus in Bosnia and Herzegovina*. Bosn J Basic Med Sci 6: 71–74.
36. Raoult, D., Woodward T., Dumler S. (2004): *The history of epidemic typhus*. Infect Dis Clin N Am 18: 127–140.
37. Reynolds M. G., Krebs J. W., Comer J. A., Sumner J. W., Rushton T. C., Lopez C. E., Nicholson W. L., Rooney J. A., Lance-Parker S. E., McQuiston J. H., Paddock C. D., Childs J. E. (2003): *Flying squirrel-associated typhus, United States*. Emer Infect Dis 9: 1341–1343.
38. Shchelkunov S. N. (2013): *An increasing danger of zoonosis Orthopoxvirus infection*. Plos Pathol. 9 (12). e1003756. DOI.10.1371/journal.ppat.1003756.
39. Siddique A. K., Cash R. (2014): *Cholera outbreaks in the classical botype era*. Curr. Top Microbiol Immunol 379: 1–16.
40. Sinka M. E., Bangs M. J., Manguin S., Rubio-Palis Y., Chareonviriyaphah T., Coetzee M., Mbogo C. M., Hemingway J., Patil A. P., Temperley W. H., Gething P. W., Kabaria C. W.,

- Burkot T. B., Harbach R. E., Hay S. I. (2012): *A global map of dominant malaria vectors*. Paras Vect 5: 69. doi.org/10.1186/1756-3305-5-69.
41. Snyder J. C. (1947): *Typhus fever in the Second World War*. Cal. Med. 66: 3–10.
42. Taubenberger J. K., Morens D. M. (2006): *1918 Influenza: the mother of all pandemics*. Emerg Infect Dis 12: 15–22.
43. Thevez C., Biagini P., Crubezy E. (2014): *The rediscovery of smallpox*. Clin Microbiol Infect 20: 210–218.
44. Torres-Peres F., Wilson L., Collinge S. K., Harmon H., Ray C., Medina R. A., Hjelle B. (2010): *Sin Nombre virus infection in field workers*. Colorado, USA. Emerg Infect Dis 16: 308–310.
45. Truman R. W., Singh P., Sharma R., Busso P., Rougemont J., Paniz-Modolfi A., Kapooulou A., Brisse S., Scollard D. M., Gillis T. P., Cole S. (2011): *Probable zoonotic leprosy in the Sothern United States*. N Engl J Med 364: 1626–1633.
46. Visschedijk J. J., van De Broek H., Eggens H., Lever P., Van Beers S., Klatser P. (2000): *Review: Mycobacterium leprae - millenium resistant! Leprosy control on the threshold of new era*. Trop Med Int Health 5: 388–399.
47. Vrga B. (2012): *Tuberkuloza i likovnost*. Vlastita naklada, Petrinja.
48. Walker A. (2014): *10 of History's deadliest construction projects - Panama Canal, 1888–1914*. <https://gizmodo.com/10-of-historys-deadliest-construction-projects-1588099877>.
49. WHO (1997): *A large outbreak of epidemic louse-borne typhus in Burundi*. Wkly Epidemiol Rec 72: 152–153.

Rad primljen: 08.10.2019.
Rad prihvaćen: 01.12.2019.

DOI 10.7251/VETJEN1902217C

UDK 616.981.49[636.52/.57.09:616.98

*Review scientific paper***DISEASES THAT CHANGED THE WORLD****Željko CVETNIĆ^{1*}, Darko MAJNARIĆ¹, Branko BAČANEK¹, Jadranka JURMANOVIĆ¹,
Jadranka SOKOLOVIĆ¹, Ivica PAVLJAK¹, Tomislav SUKALIĆ¹, Vesna JAKI TKALEC¹,
Ana KONČURAT¹, Maja KIŠ¹, Sanja FURMEG¹**¹Croatian Veterinary Institute, Veterinary Institute Križevci, Križevci, Croatia

*Corresponding author: Academic, prof.dr Željko Cvetnić: cvetnic@veinst.hr

Abstract: Different contagious diseases had huge impact on the society during the history. Their appearance destroyed and devastated whole territories, caused number of victims which drastically surpassed the ones in wars, and after the appearance of such disease the whole path of the history changed. The most important contagious diseases are known and written in the earliest known records, from the beginning of the world they were humans' companion, their impact on the development, suffer and death is huge during hundreds of years. Smallpox belong to the most deadly and the scariest viral diseases faced by humanity.

Pandemic of Spanish flu from 1918 is the biggest global demographic earthquake that the world has ever experienced. One of the most important transmissive (vector) mosquito-borne diseases, caused by protozoa, is malaria. Lice transmit the causer of typhus fever, trench fever and recurrent fever. Plague in natural habitats transmits rat flea and it is one of the most dangerous bacterial diseases. Typhus fever was a constant companion of the distress, accidents and suffering of the people during wars. Many faiths of people were connected with tuberculosis, it was always an unavoidable part of living community. Leprosy is one of the oldest and scariest diseases. It was a synonym for stigmatization and discrimination because of big deformations on the body. Syphilis is constant and unwanted companion of humanity for more than 400 years. Since its first occurrence, syphilis was stigmatized, disgraceful disease. Contemporary past of cholera began in 1817. Cholera causes difficult clinical diseases followed by humans pain and panic, and disrupts social and economic structure and development of the society wherever it occurs. It is visible that throughout the whole history, contagious diseases had huge impact on development and prosperity of the humanity. Throughout the history, humans had many important wars and battles, but perhaps the biggest ones were fought, and many of them are still fighting, against the contagious diseases.

Key words: diseases, history, world

INTRODUCTION

Contagious diseases were always attracting the most attention because of their mass occurrence, high mortality rates among patients and far-reaching consequences that they were causing. Human recognized the disease as a weakness and powerlessness of the body. They were described with simple descriptions and general symptoms so it was very difficult recognizing

the type of disease. They were endangering the health, and the dangerous ones even the life, especially if they were occurring as epidemics. During the past, huge epidemics were effecting the faith of particular nation, they were weakening the strength of powerful and big armies, causing the hunger and misery. Different doctors, histo-

rians and different chroniclers write about the epidemics of contagious diseases, so from their conclusion we can find out about the suffering of the humanity throughout the history. Old cultural peoples have met many horrors of contagious diseases. Diseases, their occurrence and spread are consistent with understanding of medicine of that particular time. Usually, epidemics are considered a supernatural cause, and later a God's punishment (Glesinger, 1978).

Contagious diseases are still highly ranked on cause-of-death scales (in some parts of the world they are number one). Around 15 million people every year die because of the contagious disease. Some of the traditional contagious diseases are suppressed in developed countries, but the new ones with new causers occurred, new

clinical pathology picture and with new problems for public health (Jeren, 2006).

In this review, contagious diseases that are dangerous and written in the earliest known records will be described shortly. About the diseases that were the enemies of the humanity throughout the history, their influence on the development, suffer and death that were caused in humans during thousands of years. Described are the most important diseases that occurred until the end of 19th century, and at the beginning of 20th (spanish flu), and some of them are active even today. The selection was driven based on the meaning and the importance of the disease as well as their influence on the happenings throughout the history (Cvetnić, 2018).

HISTORY

According to the discussions that were attributed to Hippocrates (460-377. B.C.), disease is the loss of natural harmony, deviation from the rule, breaking of the ideal relationship between the parts of harmonious continents. That is, according to Hippocrates, overall and local disorder withing four basic fluids of the human body (blood, mucus, yellow bile and black bile). Health is harmonious arrangement of basic fluids, and the diseases is a lack of fluids or their imbalance. The number of diseases is unlimited because there are infinite number of possibilities and imbalances between the fluids and the body (Grmek, 2000). Hippocrates dismissed supernatural causes of epidemical diseases, because all of them have natural causes. He believes that in air, water and rot harmful things are present, contagious evaporations that he calls miasmas. They spoil the air and human inhales them throughout the air, and in the organism they cause spoilage of body fluids. Mass occurrence of the disease is caused because at the same time many people inhale such toxic stuff, which cause the same diseases in all of them. That is how Hippocrates describes the beginning of epidemical diseases. However, neither Hippocrates nor other doctors

don't know any protective measures that would help preventing the occurrence of such epidemic. The only thing that humans were doing during epidemics is running from the diseases (Glesinger, 1978).

The history of the world is interweaved by the influence of many different contagious diseases on human population. The evidences of pox were found on Egiptian mummy. Ebers papyrus in Egypt are painted with the pictures of contagious diseases, and contain recipes and instructions how to treat many diseases. Hippocrates was writing about the spread of the disease through air and water, he connected the climate, nutrition and environmental conditions as important factors in the occurrence of contagious diseases. Fracastoro was, at the beginning of the 16th century, pointing out that the diseases were caused by small, invisible bodies (germs), he recognized that diseases can spread by direct touch or with the object, and that it is possible to spread the infection from the distance (through air). None of them are spread by an occult force, which was thought by the old medicine, and the new, evolved principles are being accepted. The evolution of microscope in 17th century enabled

the visualization of microorganisms. At the end of 19th century, important causers of the most important bacterial diseases were found, as well as their breeding and identification. Different vaccines were developed and used in order to control disease, as well as the the different measures for controlling and preventing the most im-

portant diseases. 20th century brought chemotherapy and antibiotics. Than it could be said that almost all practical problems in suppression and control of contagious diseases that have appeared until than, were solved (Bracham, 2003)

SMALLPOX

Smallpox belongs to deadliest and the most scariest viral disease faced by humanity during history. Only during XX century smallpox epidemic caused death of 300 to 500 million of people. It is considered that they are responsible for death of 10% of the people in the world, during last thousand years (Thevez et al., 2014). In China, as early as the tenth century, the first protection against smallpox was made by blowing powdered dried scabs into the nose, removed from smallpox patients. Later, variolation procedures were applied until vaccination with cowpox virus was first applied by Edward Jenner in 1796, followed by vaccination worldwide (Behbehani, 1983). This process has protected humanity and contributed to significant demographic growth later (Thevez et al., 2014). By the mid-twentieth century, smallpox was widespread in the world and endemic in many countries, and at the time it was still suffering from 10 to 15 million people worldwide, dying about two million. In 1967, the World Health Organization adopted the Smallpox Control Program.

For the next ten years, with the use of vaccination, the last smallpox case was reported in Somalia in 1977, and in 1980 the WHO declared the world free from smallpox. Smallpox is the first and so far the only disease in the world that human have suppressed by vaccination and other public health measures. Smallpox has killed more people in the world than all wars in history (Morse, 2009). The genus that includes variola virus, the causative agent of smallpox, includes the vaccine virus, monkeypox and cowpox virus, the camelpox virus, and all of these species are zoonoses. Recent studies indicate that in the future it is possible to expect the evolution of zoonotic orthopoxviruses and the emergence of a new variol-like virus (Shchelkunov, 2013). There are still virus samples in laboratories in the US and Russia. When using the smallpox virus as a biological weapon, the consequences could be very devastating, because for almost 40 years no one has been vaccinated against smallpox.

SPANISH FLU

As we think today about the threat of an influenza virus that will evolve and as recombinant and highly pathogenic will come back again, we can not bypass the story of the 1918 flu pandemic. The 1918 flu pandemic is one of the paradigms of a nightmare that comes up when deadly infectious diseases are mentioned. Spanish flu was, by all accounts, the greatest natural disaster of the early 20th century. Official estimates of the mortality caused by the flu are steadily rising as researchers continue to find data in developing countries and distant places (Morse, 2009).

At the beginning of the 20th century, studies showed that 21.5 million people died from the consequences of the Spanish flu. And more recent studies estimate that they range from 50 to even up 100 million people. It is estimated that one third of the world's population at that time, or about 500 million people, were infected and had clinically visible signs of the disease. That's why they call the Spanish flu "the mother of all pandemics" (Taubenberger and Morens, 2006). No monster, no war, no starving in human history has ever killed so many people in such a

short period. The 1918 Spanish flu pandemic is the largest global demographic earthquake the world has ever experienced. The Spanish flu was in the shadow of World War I, although it took significantly fewer human lives (approximately 8 to 10 million). The Great War lasted longer, with great media attention. The public accepted the flu as an extension of war casualties, and one of the reasons was that each wave of the Spanish flu lasted briefly and it would disappear again for several months (Anušić, 2015). The 1918 Spanish flu pandemic was so deadly, and if the Spanish flu appeared today and killed the same

percentage of the American population, more than 1.5 million Americans would die. It would kill more people in one year than die each year of heart disease, cancer, stroke, chronic lung disease, AIDS and Alzheimer's. The epidemic affected the course of history, killing more Americans in one year than that were killed in the battles of World War I, World War II, the Korean War, and the Vietnam War (Kolata, 2001). The Spanish flu can be considered a "historical" accident and a cruel consequence of the Great War (Erkoreka, 2009).

MALARIA

Vectors (mosquitoes, ticks, fleas, lice, and others) are carriers of various agents of transmissible (vector) infectious diseases from one infected person to another or from an infected animal to a human. Malaria is one of the most important mosquito-borne transmissible (vector) diseases, caused by protozoa. Malaria has been called the queen of the diseases, it has been known since time immemorial. It occupies a unique place in historical annals. Some believe that it is responsible for the collapse of the Roman Empire. Throughout history, its victims have been princes, kings, and great conquerors, and during the 20th century alone, it caused the deaths of between 150 and 300 million people. Ancient scriptures and various artifacts testify the long rule of malaria (Carter and Mendis, 2002). In his book of malaria, Chloupek (1939) describes malaria as the largest empire in the world, and such a malarial empire is, for man, an empire of sadness and distress. He mentions the areas of Macedonia, where he served after World War I, as malaria endemic. In these villages, people are as gray as their houses, yellow-gray as burned land. If you look into their eyes, the mirror of the soul, than that soul is one of the great sufferings. The construction of the Panama Canal was an unique example of how disease can hinder human progress. The Panama Canal was one of the largest,

most ambitious and significant engineering projects in modern history. It was also one of the deadliest ventures in the world. Work was stopped after several years because of the high mortality of workers on the project. More than 27 000 people are thought to have died from the disease and the consequences, with malaria being the main cause (Walker, 2014). Prevalence of malaria depends on the prevalence of the vector, a mosquito of the genus *Anopheles*. As many as 70 species of mosquitoes of this genus have the ability to transmit the cause of malaria (Sinka et al. 2012). Quinine played an important role during colonial conquests, where whites faced tropical diseases and also influenced war outcomes throughout the history (Curtin, 1990, Bruce-Chwatt, 1988, Brabin, 2014). More than a century after the identification of the parasite that caused malaria and more than half of century after the mosquito repellents and drugs were found to be effective, hundred of millions of people still suffer from malaria and hundreds of thousands die, especially in the poorest parts of the world. Malaria is the fifth cause of death in the world. In many parts of the world malaria is still the "disease queen" and its "empire" is still in existence.

PLAGUE

Plague is one of the most dangerous bacterial diseases. It is considered that it accompanies people for a long period of time, described since ancient time. In Scripture, all the troubles man experienced, including hunger and plague, were a punishment for sinners. Plague was synonymus for sickness, misery and suffering, dying from the plague in terrible torment was one of the anathema (Dodig, 2013). The plague epidemic marked the entire period of the late and part of the early Middle Ages. The effect of the plague becomes significant for the history of the mankind. The chronicler states that "*the plague has spared no place where man lives, no island or cave, no mountain peak...*" (Meyer,

1961). The causative agent is maintained among the wild rodent population, the vector is rat flea, which spreads the causative agent among rodents. Plague has disappeared from Europe for a long time, but is still smoldering in hotspots around the world, like Asia, Africa, North and South America. It cannot be eradicated because it is widespread in natural reservoirs. In many cases, it is shown to be a re-emergent disease, which recurs after many years and continues to pose a threat to public health in many countries.

TYPHUS FEVER

Typhus fever (epidemic) is caused by *Rickettsia prowazekii* transmitted by body lice which is infected by suckling the blood of patients at the rickettsial stage. It played a key role during the wars in Europe between the 15th and 20th centuries. The largest known epidemic of typhus fever affected Napoleon's army during the military invasion of Russia. More than 500,000 soldier are thought to have died from cold weather and infectious diseases, and one of the most significant was typhus fever (Raoult et al., 2004). Typhus fever has been reported in Bosnia and Herzegovina, and it began to spread especially rapidly after 1945 immediately after World War II. In 1945, one hundred outbreaks of typhus fever occurred, with the highest incidence in Europe of 215/1000 in epidemic areas. In the control of disease, the guidelines of a unique program have been used worldwide to eradicate disease. Since 1971, there have been no more reported cases of typhus in Bosnia and Herzegovina and the disease has been eradicated (Puvačić et al., 2006). The 1883 book of August Hirsh reads: "The history of typhus is written as the dark page of a world story, that affected humanity during wars, misery, suffering and pain of every kind..." (Snyder, 1947).

Between the 1950s and the 1980s, large outbreak of typhus fever became less frequent and geographical distribution declined due to improved living standards. During this period, sporadic cases of zoonotic origin (in the US) and Brill-Zinser's disease have been reported in the literature. Infection with *R. prowazekii* have been rarely reported in the US, and from 1976 to 2001, a total of 39 cases of typhus fever were reported in persons who had no lice and were not in contact with lice. Almost all of these cases were in the eastern United States. In most cases, direct or indirect contact with flying squirrels (*Glaucomys* spp) or with nests of flying squirrels before the onset of the disease has been demonstrated (Reynolds et al., 2003). Major outbreaks of typhus fever have mainly occurred in Africa, with cases reported in Burundi, Ethiopia and Rwanda. In Ethiopia, the annual number of cases of typhus ranged from 7.000 to 17.000 (except in 1979, when more patients were diagnosed). In the 1970s, the largest epidemic occurred in Burundi and Rwanda. In 1975, 9.000 cases of typhus fever were reported in Burundi (WHO, 1997). During the 1980s and 1990s, typhus fever was found in poor parts of the world, always associated with poor sanitation (such as prisons

of refugee camps) and the colder climate in mountains areas. One of the more important and major epidemic was recorded in Ethiopia in 1984 when close to 4.000 patients were registered (*Ndihokubwayo and Raoult, 1999, Letaief, 2006, Labruna, 2009*). In recent decades, there have been occasional outbreak in Africa (Ethiopia, Nigeria, Burundi, Rwanda, Uganda), Mexico, Central America, South Amerika (especially Peru), Eastern Europe, Afghanistan, India and China. In North Africa, Russia and Kazakhstan sporadic cases or small suspected outbreak have been identified.

TUBERCULOSIS AND LEPROSY

Two important and unavoidable diseases caused by mycobacteria are tuberculosis and leprosy. Tuberculosis and leprosy exist since pre-historic times. Many human destinies have been associated with tuberculosis, it has always been integral part of community life. Nowhere in the ancient record is there a record of its beginning, but throughout the history it has always been present. Where other outbreak lasted weeks or months, the tuberculosis epidemic would last for a century or longer. Tuberculosis slowly and quietly entered in homes by creeping into the homes of millions of people, once arrived and never left again. It affected large number of people, and very often it was children and young people at the beginning of their lives that had a wide social impact. In 19th century it seemed as everyone was dying from tuberculosis. Tuberculosis has become a popular phenomena, first as romantic redemption, and than as a reflection of social ills (Morens, 2002). Numerous life destinies were associated with tuberculosis, book work were dedicated to it through character des-

In addition to typhus fever, lice transmit recurrent and trench fever. Diseases have been known for centuries and their occurrence is most present during wars. They continue to be a major public health concern in a population of people living in poor hygiene conditions due to war, various social disorders, hunger and poverty. In developed countries, diseases are often proven in homeless, and in developing countries epidemic of these diseases have been reported in prisons and refugee camps (*Badiaga and Brougui, 2012*).

cription or through the illness of the artist himself. Many poets and painters died of tuberculosis leaving behind a large oeuvre (Dugac, 2005, Vrga, 2012). According to the World Health Organization around two million people in the world still die from tuberculosis today, and about eight million are affected (Jeren, 2006).

Leprosy is one of the oldest and most terrible diseases that people get sick with. It has been synonymous with stigmatization and discrimination due to major deformities on the body. It has long been known as "*death before death*". Despite therapy, it is still endemic in some countries (Visschedijk et al., 2000, Dogra et al., 2013). Annually, 200,000 new leprosy patients are diagnosed. According to the WHO data in 2015, leprosy was reported in 136 countries of the world, and there are approximately four million people with disabilities caused by leprosy in the world. Leprosy has long been thought to be just a disease of man, but natural reservoirs of leprosy have been proven to be nine-banded armadillo in the US and South America (Truman et al., 2011).

SYPHILIS

Syphilis has been a constant and unwanted companion of humanity for over 400 years. Syphilis have been a stigmatized, shameful disease from the first onset. It has affected the lives

of millions of people among all social layers. It is known that many celebrities, various artists, writers, composers and great historical figures have been infected with syphilis. Syphilis did

not choose the level of social and economic status, it affected everyone. Syphilis is a hundred-face disease and a great imitator. This old enemy of humanity, thought to be on the verge of defeat after the discovery of penicillin, once again sur-

prised and returned continuing to attract humanity's attention. In the last 30 years, due to homosexual habits, drug abuse and HIV infection, the number of infected persons has increased again, which is a public health problem (Marinović and Lipozenčić, 2002).

CHOLERA

The modern history of cholera began in 1817 when explosive cholera outbreaks began to occur in the Bengal region along the Ganges River in the Indian subcontinent, where the disease is endemic. It was the first of seven cholera pandemics to date that have hit almost the entire world and caused millions of deaths (Siddique and Cash, 2014). Outbreaks of various diseases were very common during the 19th century, and especially difficult during cholera, which caused very high mortality. The number of deaths caused great panic, and particular fear and disbelief

were triggered by the symptoms that turned the human body into a wreck, which made this disease a terrible monster that people were terrified off (Ipšić, 2010). Cholera outbreaks cause human suffering, panic, disruptive social and economic structure as well as community development wherever they occurred. Natural disasters such as tsunamis, earthquakes and war significantly increase the risk of epidemics with high mortality rates.

EMERGENT AND RE-EMERGENT DISEASES A NEW THREAT TO THE WORLD?

It is evident that, throughout the history, infectious diseases have had a significant impact on the development and prosperity of humanity. Some diseases are suppressed or under control in developed countries, but in the undeveloped ones, they survive and affect millions of people. By the end of the twentieth century, almost everyone was convinced that treatment, vaccination and other interventions would soon be able to eradicate most infectious diseases. However, smallpox have been eradicated, but the results are disappointing in the fight against malaria or tuberculosis, which are still a problem. So it's not often about eradication, it's just about controlling endemic diseases.

After the appearance of emergent and re-emergent diseases was noted, the Institute for Medicine of the US National Research Council in 1991 appointed a nineteen-member multidisciplinary committee to study the occurrence of the new pathogens that threaten the health of the

nation. Emergency infectious diseases are those that appear for the first time in a population, and re-emergent ones are those that reappear in a certain period of time in a place where they have been previously eradicated. Their report from 1992 was entitled: "*New infections – a microbial threat to US health*". Thought the discussion, it was concluded that there are six different factors that can explain the occurrence of emergent and re-emergent infectious diseases. These factors are: human demographics and behavior, technology and industry, economic development and land usage, international travel and the market, microbial adaptation and change, and the collapse of public health measures (Brachman, 2003). Emergency infectious diseases represent a significant burden on global economy and public health. Between 1940 and 2004, 334 emergent infectious diseases appeared worldwide. The highest incidence was in 1980s, at the same time as the onset of the HIV pandemic. Zoonoses (60.3%) are dominant, and most zoonoses

(71.8%) originate from wild animals. It was stated that in 54.3% of the cases the bacteria and rickettsiae were the causative agent, in 25.4% the viruses were the cause, in 10.7% of the protozoa, in 6.3% of the fungus and in 33.3% of the helminths (Jones et al., 2008).

Exactly 100 years ago, the Spanish flu virus was present all over the world. Various very similar and altered avian influenza (H5N1) virus, the pandemic (new) influenza A (H1N1) virus, or some other types such as H7N9, still brings fear, disturbance and death to certain parts of the world today. In 1977, the World Health Organization announced that smallpox has been defeated, a viral disease that has caused the highest number of deaths in history. However, just a few years later, in the 1980s, a new virus, the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) emerged, which again terrified the world with its appearance and consequences. It is a syndrome of acquired immunity deficiency, which leads to a state of impaired immunity, which results in the appearance of various diseases that would not occur in healthy people. According to the World Health Organisation, 36.7 million people were living with AIDS in 2016, 1.8 million were newly diagnosed, and one million died from the disease (HZJZ, 2017). In the United States, a flu-like disease appeared in the Four Corners region in 1993. The patients developed severe pneumonia and died. The virus was initially named *Sin Nombre* (SNV) (Spanish-no name), later identified as hantavirus, and the virus's natural reservoir is the mouse (*Peromyscus maniculatus*). The disease is rare but very serious and often fatal (up to 66.7%) (Torres-Perez et al., 2010). Hendra virus infection is a rare zoonosis that causes severe and often fatal disease in infected horses and humans. A mare with flu-like symptoms get sick, and a two people get sick with the same disease, and a horse owner died of lung and kidney failure. Later in Australia, dozens of cases were described in horses and humans. Virus reservoirs are bats. The virus was first described in 1994 in Hendra, a suburb of

Brisbane, Australia (Field, 2016). In 1997 encephalitis and respiratory diseases in pigs were identified in Malaysia. Shortly after, farm workers began to become sick with encephalitis. Over the two-year period, there were several hundred cases of disease in people with more than 100 deaths. A nipah virus was isolated from the brain of a patient who died. It was paramyxovirus with similar characteristics to the hendra virus, and the reservoirs were found in bats from the genus *Pteropus* that are fed by fruit (Carter and Saunders, 2007, Ang et al., 2018). The West Nile virus was known as early as 1937 when it was isolated from a woman's blood in the West Nile area of Uganda. In 1996, infections were reported in Europe and in 1999 in the US. West Nile virus infection is a typical vector-borne zoonosis. It is mostly asymptomatic (in 80% of cases), in 20% of infected it is manifested as a non-specific febrile disease, and in less than 1% of patient there is a neuroinvasive disease manifested by meningitis and encephalitis. Different species of birds are the primary hosts and reservoirs of the virus, and the main vectors are mosquitoes (Carter and Saunders, 2007). 15 years ago (2003) SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) appeared in China. It is a severe viral respiratory disease that can cause mortality in up to 15% of diseased people (Krajinović and Baršić, 2003). In 2012, a new global threat, a disease called MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*) which causes a serious respiratory illness, appeared in Saudi Arabia. Although most patients are geographically related to the Arabian Peninsula, MERS has also been detected in other parts of the world. The hosts of the virus are camels and interhuman transmission has been demonstrated. In the Middle East, mortality was as high as 25.9% and 20.4% in South Korea (Park et al., 2018). According to the World Health Organization, from 2012 to date, the disease have been proven in 27 countries. During 2013, the world was altered by the emergence of a terrible viral Ebola disease that has occurred in West Africa. Millions of people were affected and thousands more became ill. The disease is

zoonosis, and the virus have been proven in gorillas, chimpanzees, fruit bats and antelopes (Jemeršić, 2014).

CONCLUSION

Historically, infectious diseases have had a profound impact on the human population, including its evolution and development. The onset of the disease is not a simple occurrence, it is dynamic, most new diseases are not caused by new agents, they are mostly known, but they reappear in different circumstances, in a different way, many disease have changed their image and impact. An increasing number of potentially pathogenic (opportunistic) microorganisms are emerging. It is known that 10-15% of infectious agents can also cause malignancies. They can be identified and recognized because of the new and highly sensitive techniques of proof. Human activities contribute to the emergence of disease, and various social, economic, political, climatic,

technological and environmental factors can influence and shape its occurrence. The realization that infectious diseases can be completely defeated has been doubted in recent years by the appearance of emergent and re-emergent diseases. Despite the advances in medicine, scientists have not yet found a permanent solution in some areas of the world for long-known diseases such as malaria, tuberculosis or cholera. The spectrum of infectious diseases is expanding, and the problems of infections are present in all aspects of medicine, it is increasingly complex, and the challenges are increasingly demanding. It is clear that, at the beginning of the new millennium, infectious diseases are a major and ongoing threat to today's society and continue to be one of the greatest killers in the world.

REFERENCES

1. Ang B. S. P., Lim T. C. C., Wang L. (2018): *Nipah virus infection*. J Clin Microbiol 56: 6, e01875–17.
2. Anušić N. (2015): *U sjeni velikog rata. Pandemija španjolske gripe 1918. –1919. u sjevernoj Hrvatskoj*. Srednja Europa, Zagreb.
3. Behbehani A. M. (1983): *The smallpox story: life and death of an old disease*. Microbiol Rev 47: 455–509.
4. Bodiaga S., Brouqui P. (2012): *Human louse-transmitted infectiuous diseases*. Clin Microb Infect 18: 332–337.
5. Brabin B. J. (2014): *Malaria's contribution to World War One - the unexpected adversary*. Malaria Journal 13: 2–22.
6. Brachman P. S. (2003): *Infectious diseases - past, present and future*. Int J Epidemiol 32: 684–686.
7. Bruce-Chwatt L. J. (1988): *Cinchona and its alkaloids: 350 years later*. NY State. J Med 88: 318–322.
8. Carter J., Saunders W. A. (2007): *Hendra virus, Nipah virus*. In: Virology, John Wiley & sons, Ltd. Chuchester, West sussex, England. Str. 275.
9. Carter R., Mendis K. N. (2002): *Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria*. Clin Microbiol Rev 15:564–594.
10. Chloupek D. (1939): *Malaria*. Škola narodnog zdravlja, Zagreb.

11. Curtin P. D. (1990): *The end of the "white man's grave"? Nineteenth-century mortality in West Africa*. J Interdisciplin His 21: 663-688.
12. Cvetnić Ž. (2018): *Bolesti koje su mijenjale svijet*. Medicinska naklada/Hrvatski veterinarski institut, Zagreb.
13. Dodig S. (2016): *Biblijska medicina – O zdravlju, bolesti i smrti u Bibliji*. Medicinska naklada, Zagreb. Bolest, str. 49–123.
14. Dogra S., Narang T., Kumar B. (2013): *Leprosy - evolution of the part to eradication*. Indian J Med Res 137: 15–35.
15. Dugac Ž. (2005): *Zdravstveno prosvjeđivanje protiv tuberkuloze u međuratnoj Hrvatskoj*. Medicus, 14: 155–171.
16. Erkoreka A. (2009): *Origins of the Spanish influenza pandemic (1918-1920) and its relation to the First World War*. J Mol Gen Med 3: 190–194.
17. Field H. E. (2016): *Hendra virus ecology and transmission*. Curr Opin Virol 16: 120–125.
18. Glesinger L. (1978): *Povijest medicine*. Školska knjiga, Zagreb.
19. Grmek M. D. (2000): *Život, bolesti i povijest*. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb.
20. HZJZ (2017): *Svjetski dan AIDS-a 2017*. <https://www.hzjz.hr>.
21. Ipšić I. (2010): *Demografske i društveno-gospodarske posljedice epidemija kolere: primjer epidemije u Drenovcima 1873. godine*. Scrinia slavonica 10: 527–545.
22. Jemeršić L. (2014): *Ebola - zoonoza čija nam pojava stalno prijeti*. Vet Stn 45: 297–305.
23. Jeren T. (2003): *Infektivne bolesti na početku trećeg milenija*. Infektivni Glasnik 26: 99-101.
24. Jones K. E., Patel N. G., Levy M. A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J. L., Daszak P. (2008): *Global trends in emerging infectious diseases*. Nature 451: 990–993.
25. Kolata G. (2001): *Flu-the story of the great influenza pandemic of 1918 and the search for the virus that caused it*. Touchstone Edition, New York.
26. Krajinović V., Baršić B. (2003): *Teški akutni respiratorni sindrom (SARS)*. Medix 51: 35–37.
27. Labruna M. B. (2009): *Ecology of rickettsia in South America*. Ann NY Acad Sci 1166: 156-166.
28. Letaief A. (2006): *Epidemiology of rickettsioses in North Africa*. Ann NY Acad Sci 1078: 34–41.
29. Marinović B., Lipozenčić J. (2002): *Where does syphilis stand in Croatia?* Clin Dermatol 20: 141–146.
30. Meyer K. F. (1961): *Plague*. In: Hull T. G.: Diseases transmitted from animals to man. Springfield, Illinois (USA). Str. 467–508.
31. Morens D. (2002): *At the deathbed of consumptive art*. Emer Inf Dis 8: 1353–1358.
32. Morse S. S. (2009): *Emerging infections: Condemned to repeat?* In: Relman D. A., Hamburg M. A., Choffnes R. A., Mack A.: Microbial evolution and co-adaption: A tribute to the life and scientific legacies of Joshua Lederberg. National Academies Press, Washington, DC.
33. Ndiokubwayo J. B., Raoult D. (1999): *Epidemic typhus in Africa*. Med Trop 59: 181–192.
34. Park J. E., Jung S., Kim A., Park J. E. (2018): *MERS transmission and risk factors: a systematic review*. BMC Public Health 18:574.doi.org/10.1186/s12889-018-5484-8.
35. Puvačić Z., Beslagić E., Zvizdić S., Puvacić S., Ravlija J., Hamzić S. (2006): *Eradication of typhus exanthematicus in Bosnia and Herzegovina*. Bosn J Basic Med Sci 6: 71-74.

36. Raoult, D., Woodward T., Dumler S. (2004): *The history of epidemic typhus*. Infect Dis Clin N Am 18: 127–140.
37. Reynolds M. G., Krebs J. W., Comer J. A., Sumner J. W., Rushton T. C., Lopez C. E., Nicholson W. L., Rooney J. A., Lance-Parker S. E., McQuiston J. H., Paddock C. D., Childs J. E. (2003): *Flying squirrel-associated typhus*, United States. Emer Infect Dis 9: 1341–1343.
38. Shchelkunov S. N. (2013): *An increasing danger of zoonosis Orthopoxvirus infection*. Plos Patholog. 9 (12). e1003756. DOI.10.1371/journal.ppat.1003756.
39. Siddique A. K., Cash R. (2014): *Cholera outbreaks in the classical botype era*. Curr. Top Microbiol Immunol 379: 1–16.
40. Sinka M. E., Bangs M. J., Manguin S., Rubio-Palis Y., Chareonviriyaphah T., Coetzee M., Mbogo C. M., Hemingway J., Patil A. P., Temperley W. H., Gething P. W., Kabaria C. W., Burkot T. B., Harbach R. E., Hay S. I. (2012): *A global map of dominant malaria vectors*. Paras Vect 5: 69. doi.org/10.1186/1756-3305-5-69.
41. Snyder J. C. (1947): *Typhus fever in the Second World War*. Cal. Med. 66: 3–10.
42. Taubenberger J. K., Morens D. M. (2006): *1918 Influenza: the mother of all pandemics*. Emerg Infect Dis 12: 15–22.
43. Thevez C., Biagini P., Crubezy E. (2014): *The rediscovery of smallpox*. Clin Microbiol Infect 20: 210–218.
44. Torres-Peres F., Wilson L., Collinge S. K., Harmon H., Ray C., Medina R. A., Hjelle B. (2010): *Sin Nombre virus infection in field workers*. Colorado, USA. Emerg Infect Dis 16: 308–310.
45. Truman R. W., Singh P., Sharma R., Busso P., Rougemont J., Paniz-Modolfi A., Kapoolou A., Brisse S., Scollard D. M., Gillis T. P., Cole S. (2011): *Probable zoonotic leprosy in the Southern United States*. N Engl J Med 364: 1626–1633.
46. Visschedijk J. J., van De Broek H., Eggens H., Lever P., Van Beers S., Klatser P. (2000): *Review: Mycobacterium leprae - millenium resistant! Leprosy control on the threshold of new era*. Trop Med Int Health 5: 388–399.
47. Vrga B. (2012): *Tuberkuloza i likovnost*. Vlastita naklada, Petrinja.
48. Walker A. (2014): *10 of History's deadliest construction projects - Panama Canal, 1888–1914*. <https://gizmodo.com/10-of-historys-deadliest-construction-projects-1588099877>.
49. WHO (1997): *A large outbreak of epidemic louse-borne typhus in Burundi*. Wkly Epidemiol Rec 72: 152–153.

Article received: 08.10.2019.

Article accepted: 01.12.2019.

DOI 10.7251/VETJSR19022281

UDK 636.2/3.084:[636.09:615.33]

*Прегледни научни рад***ЗНАЧАЈ ДИФЕРЕНЦИЈАЛНЕ ДИЈАГНОСТИКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ И РЕЗИЛИЈЕНЦИЈЕ КОД ПРЕЖИВАРА ******Тамара ИЛИЋ^{1*}, Зоран КУЛИШИЋ¹, Дарко ДЕСПОТОВИЋ², Бојан ГАЈИЋ¹,
Даница БОГУНОВИЋ¹, Санда ДИМИТРИЈЕВИЋ¹**

¹ Катедра за паразитологију, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Србија
² ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бања Лука, Република Српска

* Кореспондентни аутор: Проф. др Тамара Илић: tamaradilic@gmail.com

Кратак садржај: Контрола гастроинтестиналних паразита у различитим системима узгоја преживара заснивана је на вакцинацији, хемотерапији, побољшању квалитета менаџмента стада и коришћењу генетских потенцијала домаћина. Широм света доминира стратегија контроле хелмината заснована на честој употреби антихелминтика, која се сматра неодрживом, с обзиром на појаву све већег броја и врста паразита који су отпорни на лекове. Развој резистенције на све три групе антихелминтика широког спектра (никотински антихелминтици, бензимидазоли и макролидни лактони) и повећана брига за здравље потрошача условљене појавом резидуа примичењених лијекова у храни, додатно компликују контролу ових нематода. У циљу смањења брзине појаве резистенције на антихелминтике код гастроинтестиналних нематода малих преживара и организације процеса одрживог интегрисаног управљања паразитима, глобално је прихваћен принцип циљаног селективног третмана. Спровођење ове стратегије је тек недавно постало изводљиво, са развојем и практичном применом система који служи за клиничку процјену анемије код малих преживара оболелих од хемонхозе. Поред тога, краткотрајне промене телесне тежине и одређивање телесне кондиције могу бити показатељи ендопаразитоза, што омогућава брзу идентификацију животиња које ће вероватно имати користи од третмана. Добијени резултати квантитативне копролошке дијагностике и резултати процене анемије су критеријуми који омогућавају диференцијалну дијагностику између здравих и резилијентних животиња и лакшу дијагностику резистенције паразита. С обзиром на то да резилијентне животиње играју важну улогу у контаминацији пашњака, разумљив је клиничко-паразитолошки значај њиховог правовременог откривања.

Кључне речи: преживари, резистенција, антихелминтици, резилијенција, дијагностички параметри

** Рад је реализован у оквиру Пројеката број ТР31084, број 173001, број Ш 46002 и Број ТР31088, које финансира Министарство просвете и науке Републике Србије.

Илић и сар:

Значај диференцијалне дијагностике резистенције и резилијенције код преживара

УВОД

Паразитски гастроентеритис је економски најзначајније обољење пашних животиња, чија се контрола у последњих пет деценија заснивала углавном на организацији напасања и употреби антихелминтика. Системи управљања напасањем су углавном непрактични и скупи, док је учестала употреба антихелминтика довела до проблема повећане резистенције паразита на антипаразитике, нарочито код малих преживара (Várady и сар., 2011). Појава резистенције уочена је широм света у све три групе антихелминтика широког спектра - никотинских антихелминтика (имидазотиазоли и тетрахидропиримидини), бензимидазола и макролидних лактона, који се користе у овчарству за сузбијање инфекција проузрокованих стронгилидима (Coles и сар., 2006, Vidyashankar и сар., 2012, Salgado и Santos, 2016). Смањена ефикасност антихелминтика у комбинацији са жељом да се редукује употреба хемикалија у производним системима стимулисала је потрагу за алтернативним и одрживим могућностима контроле паразита, што је резултирало појавом нових класа антихелминтика на тржишту (деривати аминокетонитрила и спироиндоли) (McManus и сар., 2014).

Развој резистентних линија хелмината је еволуцијска карактеристика и базира се на унутарпопулацијској селекцији паразита, који носе алеле одговорне за резистенцију на хемијске компоненте из лека. Дужа употреба истог антипаразитета, или средстава који имају сличан механизам деловања, има за последицу стварање резистенције на лек код паразита. Једном успостављена резистенција може да потраје више година (Jackson и Coop, 2000), или нестаје под утицајем селекције и генетичког дрефта, који делују тако што враћају осетљивост у популацију (Петричевић и сар., 2007).

Пошто је проблем резистенције веома актуелан, постоје покушаји да се њен развој стави под контролу и да се процес успори на различите начине. Испитивања током периода од 20 година указују да је најбољи начин одлагања процеса селекције резистентних гена код паразита употреба комбинованих препарата – микстура са две и више различитих хемијских активних супстанци, док се као друга опција препоручује ротација лекова из различитих хемијских група, која се до сада користила за избегавање толеранција (Лалошевић и сар., 2009).

Једна од могућности за повећање ефикасности лекова је ускраћивање хране пре пероралне апликације антихелминтика. На овај начин се смањује количина хране у дигестивном тракту животиње и пружа више времена за апсорпцију и дистрибуцију лековите супстанце (Jackson и Coop, 2000). Важно је формирати групе оваца приближно исте телесне масе где свакој овци треба дати дозу која одговара највећој јединки у групи. Овакав приступ осигурава да свака животиња у групи добије пуну дозу лека, јер је најштетније субдозирати третиране јединке (Лалошевић и сар., 2009).

Појам резилијенције се спомиње у великом броју истраживачких студија, али се његова дефиниција разликује. Према Doeschl-Wilson и сар. (2012), резилијенција је способност животиње да одржава добру кондицију и уобичајен степен активности док је инфицирана паразитима, без обзира на ниво оптерећења присутним патогенима. Према појединим ауторима, резилијенција се односи на способност домаћина/животиње да преживи и остане продуктивна упркос паразитском изазову којем је изложена (Bishop, 2012). У литератури постоји још једна дефиниција овог термина, према којој резилијенција представља способност домаћина да толерише присутне паразите без

испољавања икаквих клиничких симптома обољења (Gupia и сар., 2013). *Bishop и Morris* (2007) дефинишу резилијенцију као способност адаптације животиња на инфекцију различитим узрочницима паразитске етиологије из окружења. Према *Storey* (2015), резилијенција представља прилагодљивост променама и поседовање капацитета за успешну адаптацију при суочавању са паразитском инфекцијом, као стицање све веће и шире компетенције за реаговање на стрес. Сматра се да је ова дефиниција најкомплетнија.

Пошто су резистенција и резилијенција наследне особине, важна је тачна и прав-

овремена дефиниција сваког параметра који помаже у процесу узгојне селекције животиња, које показују ове особине. За доказивање животиња које испољавају резилијенцију при суочавању са хелминтским изазовом, или код којих паразити испољавају резистенцију на антихелминтике, неопходни су резултати бројања присутних јаја хелмината у фецесу испитиваних животиња (FEC – Fecal Egg Count), процена клиничке анемије на основу вредности запремине еритроцита (packed cell volume – PCV) применом FAMACHA (FAffa MAlan CHArt) теста (*Malan и Van Wyk*, 1992) и параметри везани за телесну кондицију (*Storey*, 2015).

ДИЈАГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ БРОЈАЊА ЈАЈА У ФЕЦЕСУ (FEC – FECAL EGG COUNT)

За процену ефикасности антихелминтика у преживара, детекцију резистенције на антихелминтике и доказивање резилијенције, Светска асоцијација за унапређење ветеринарске паразитологије (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology - WAAVP) препоручује *McMaster* методу (*Coles и сар.*, 1992, *Storey*, 2015). То је стандардна и најчешће коришћена конвенционална метода квантитативне копролошке дијагностике у ветеринарској паразитологији. Служи за одређивање степена ендопаразитских инфекција, а заснована је на бројању паразитских елемената у јединици масе фецеса (EPG – Eggs Per Gram, OPG – Oocysts Per Gram, CPG - Cysts Per Gram и LPG – Larvae Per Gram). Осетљивост методе је од 10 до 100 паразитских елемената у 1 g фецеса (*Pereckiene и сар.*, 2010).

Примена ове процедуре до сада је описана код великих и малих преживара, коња, свиња, месоједа, птица, кунића, мишева, корњача, лемура и људи (*Bondarenko и сар.*, 2009). *Vadlejch и сар.* (2011) су упоређивали осетљивост и поузданост три модификоване

технике по *Мек Мастеру* са циљем да утврде која је модификација методе најпогоднија за рутинске паразитолошке прегледе и дијагностичке процјене у ветеринарској клиничкој пракси (Табела 1).

Показало се да је концентрисана *McMaster* метода (*Roepstorff и Nansen*, 1998) најосетљивија и најпоузданија за откривање јаја хелмината. Ова метода је брза, користи највећу количину фецеса (4g), има ниску вредност границе детекције (20 EPG), а захваљујући центрифугирању фекална суспензија је довољно чиста за микроскопирање.

Модификација према *Зајичеку* (1978) треба да обезбеди боље резултате због ниског корекционог фактора, два поступка центрифугирања и најнижег односа разређења. Међутим, низак однос разређења има за последицу присуство велике количине нечистоћа у испитиваној суспензији, што значајно отежава поступак прегледа препарата у коме паразитски елементи могу бити маскирати или замењени псеудопаразитским честицама из фецеса, чиме се повећава непоузданост ове процедуре. Ова

Илић и сар:

Значај диференцијалне дијагностике резистенције и резилијенције код преживара

метода има средњу вредност границе детекције и примјењива је са прецизношћу резултата од 100 EPG (Vadlejch и сар., 2011).

Трећи упоредни метод према Wetzel-у (1951) је најједноставнији, али даје најлошији резултат. Ниска осетљивост и поузда-

ност ове методе највероватније је узрокована високим корекционим фактором и одсуством корака центрифугирања. Ова метода има високу вредност границе детекције и пружа прецизне резултате од 200 EPG (Vadlejch и сар., 2011).

Табела 1. Упоредне вредности параметара модификованих McMaster техника (Vadlejch и сар., 2011)

Параметри	Модификације технике по McMaster-у		
	Wetzel (1951)	Zajiček (1978)	Roepstorff и Nansen (1998)
Количина фецеса (g)	2	1	4
Врста флотационог раствора	NaCl	MgSO ₄ +Na ₂ S ₂ O ₃	NaCl + глюкоза
Специфична тежина раствора	1,200	1,280	1,300
Центрифугирање (RPM ¹)	-	2000	1200
Центрифугирање (RCF ²)	-	479	172
Време центрифугирања (min)	-	2	5
Време флотације у коморици (min)	2-3	5	3-5
Број коморица у предметници по McMaster-у	3	2	2
Мултипликациони (корекциони) фактор	67	33	20

¹RPM (Revolutions Per Minute) – број обртаја у минути

²RCF (Relative Centrifugal Force) – релативна центрифугална сила

Код различитих врста преживара, постоје извесна ограничења FEC поступка која битно утичу на тумачење, интерпретацију и поузданост добијених резултата. Код одраслих говеда, то су: 1) ограничена дијагностичка вриједност, везана за степен инфек-

ције који обично није у корелацији са оптерећењем хелминтима; 2) ниске FEC вредности, што код говеда захтева флотационе технике већег степена осетљивости него за овце; 3) ограничена клиничка вредност за *Nematodirus* spp., пошто највећу

штету проузрокују незрели стадијуми ових нематода пре почетка полагања јаја и 4) клиничка форма парамфистомозе, која је обично узрокована великим бројем незрелих паразита у миграцији, услед чега број јаја у измету може бити низак или нула (Rollinson, 2013).

Код хемонхозе и трихостронгилодозе малих преживара, FEC је у изразитој корелацији са оптерећењем животиња хелминтима. У случајевима полипаразит-

изма, када релативно висока производња јаја *H. contortus* може маскирати нижу производњу јаја неких других врста (*T. colubriformis* и *T. circumcincta*), FEC има ограничену дијагностичку вредност (Roeber и сар., 2013). Зато се на основу броја јаја које су положили различите врсте гастроинтестиналних нематода (ГИН), могу дати само оријентационе процене интензитета инфекције и одлучивати о томе да ли ће и када животиње бити третиране (Табела 2).

Табела 2. Одређивање степена инфекције са ГИН за младе животиње (Kahn, 2005)

Паразит	Степен инфекције (EPGF – Eggs Per Gram Faeces)		
	Низак	Умерен	Висок
ГОВЕДА			
Мешана инфекција	50–200	200–800	800+
<i>Haemonchus</i> spp.	200	200–600	600+
<i>Trichostrongylus</i> spp.	50–100	100–400	400+
<i>Cooperia</i> spp.	200–300	300–2500	2500+
ОВЦЕ			
Мешана инфекција	50–800	800–1200	1200+
<i>Haemonchus</i> spp.	100–2000	2000–7000	7000+
<i>Trichostrongylus</i> spp.	100–500	500–2000	2000+
<i>Nematodirus</i> spp.	50–100	100–600	600+
<i>Oesophagostomum</i> spp.	100–800	800–1600	1600+

Познато је да се од антипаразитета очекује висока ефикасност у теренским условима. Антиектопаразитици треба да имају апсолутну ефикасност, док се од антихелминтика очекује око 95% ефикасности, с обзиром на то да је пожељно да се мали број паразита одржава у телу као стимуланс за развој имунолошког одговора

домаћина (Димитријевић, 1999). Код пашних животиња увек постоји мешана инфекција већим бројем различитих врста гастроинтестиналних нематода. Неке од њих омогућавају развој природног имунитета, тако да се на основу резултата FEC-а одлучује да ли је третман животиње неопходан.

Илић и сар:

Значај диференцијалне дијагностике резистенције и резилијенције код преживара

Табела 3. Тумачење појаве клиничке форме обољења код говеда на основу EPG (Love и Hutchinson, 2007)

Врста паразита	Број јаја/1g фецеса (EPG)
<i>Haemonchus</i>	200
<i>Trichostrongylus</i>	50
<i>Ostertagia</i>	150
<i>Oesophagostomum</i>	100
<i>Cooperia</i>	500
<i>Fasciola</i>	50

Ово је веома важно јер је неопходно одржавати равнотежу између створеног имунитета (његов развој стимулише присуство малог броја хелмината у животињи) и очувања производних способности (на њихово смањење утиче исти тај број

хелмината, који проузрокује субклиничку форму обољења). Добијени резултати EPG-а могу бити изузетно корисни и за тумачење клиничке форме извесних хелминтоза код великих и малих преживара (Табела 3).

ДИЈАГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ТЕСТА РЕДУКЦИЈЕ БРОЈА ФЕКАЛНИХ ЈАЈА (FECRT–FECAL EGG COUNT REDUCTION TEST)

Тест редукције броја јаја у фецесу (Fecal Egg Count Reduction Test – FECRT) је установљен почетком деведесетих година двадесетог века (Coles и сар., 1992) и представља метод избора за праћење ефикасности антихелминтика код преживара (Dobson и сар., 2011). Тренутно је једини тест који може да детектује отпорност свих врста нематода, код свих врста домаћина (McKenna, 2013) и служи за израчунавање смањења броја јаја у фецесу, упоређивањем средњих вредности FEC-а пре третмана и после обављеног третмана (Wang и сар., 2017).

Према Светској асоцијацији за унапређење ветеринарске паразитологије (WAAVP), постоје смернице за извођење и

израчунавање стандардног FECRT-а (Coles и сар., 1992, 2006), које су побољшане препорукама од стране Leveske и сар. (2017). У складу са тим смерницама, препоручују се: величина узорка (≥ 10 или ≥ 15 животиња по групи за третман, а свако излучивање најмање 150 EPG), метода FEC (McMaster), статистичка анализа (FECRT заснован на аритметичкој средини групног FEC-а након примене лека) и критеријуми који дефинишу смањену ефикасност лека (FECRT <90% или FECRT <95%, резистенција се проглашава ако је смањење броја јаја у фецесу мање од 95%, а доња граница ефикасности лека је мања од 90%) (Dobson и сар., 2011; Vidyashankar и сар., 2012).

За извођење FECRT, узорак фецеса се сакупља пре дехелминтизације, одређује се вредност EPG у њему, а након тога се спроводи третман. Узорковање фецеса се понавља 14. дана након обављеног третмана и поново се одређује вредност EPG. Коришћењем специјалне једначине, израчунава се процентуално смањење броја јаја у фецесу за сваку животињу индивидуално. Након тога се израчунава средње смањење за све тестиране јединке, како би се одредило укупно смањење за фарму или стадо. Ова вредност се затим користи за доношење закључака о постојању или одсуству резистенције на лекове (*Kaplan u Nielsen, 2010*). Ако је лек делотворан, ниједан паразит не би требало да преживи лечење дуже од времена потребног за

пражњење црева (обично до 48 часова). Овај временски период се може продужити за онолико дана колико траје привремена супресија полагања јаја (3 дана за имидазо-отиазоле, 8 дана - за бензимидазоле, 14 до 17 дана за макролидне лактоне), тако да се ефикасност појединих група лекова процењује тек по истеку овог периода (*Coles и сар., 2006*).

Ако испитиване животиње имају велики број јаја у фецесу, након чега се обави дехелминтизација, а 10 дана касније FEC показује нулту или изузетно ниску вредност (мање од 5% вредности пре третмана), за ту групу са сигурношћу можемо тврдити да је дехелминтизација успешно обављена (*Coles и сар., 1992*).

ДИЈАГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ „FIVE POINT CHECK“ КЛИНИЧКОГ ПРИСТУПА

Добијене дијагностичке резултате засноване на FEC, потребно је допунити проценом о присуству или одсуству клиничких симптома обољења („Five Point Check“). Овај клинички приступ подразумева праћење пет најчешћих неспецифичних симптома код животиња инфицираних паразитима – анемија слузнице ока, губитак телесне тежине или заостајање у расту и развоју, запрљаност репа и задње регије тела фецесом, субмандибуларни едем и исцедак из носа (*Bath и сар., 2010*). На основу тежине клиничких симптома, врши се одабир животиња које је потребно дехелминтисати. Здравствено стање стада се класификује као: „добро“ (није потребна дехелминтизација), „лоше“ (неопходна је дехелминтизација, уз контролу наредних неколико месеци) и мешовити резултати („неке животиње су добро, неке лоше“ – на основу процене тежине симптома одлучује се које ће животиње бити дехелминтисане) (*Storey, 2015*).

У циљу смањења брзине појаве резистенције на антихелминтике и организације процеса интегрисаног управљања паразитима (*Integrated Parasite Management – IPM*), глобално је прихваћен принцип циљаног селективног третмана (*Targeted Selective Treatment – TST*). Спровођење ове стратегије је постало изводљиво на фармама, тек са развојем и практичном применом *FAMACHA*© система за клиничку процену анемије, проузроковане хематофагом нематодом *Haemonchus contortus* код малих преживара. Принцип *TST*-а се може проширити на друге важне ендопаразите, под условом да је развијени систем практичан, економичан и реално способан да идентификује животиње којима прети опасност од преоптерећености очекиваним ендопаразитима (*Bath u Van Wyk, 2009*).

Кандидати за проширени *TST* систем испољавају неки од пет наведених клиничких симптома, који су послужили као основа за осмишљавање практичног водича

Илић и сар:

Значај диференцијалне дијагностике резистенције и резилијенције код преживара

за сточаре. За међународну, вишејезичну употребу, овај систем је назван Five Point Check© (Пет тачака за проверу), представља даље, практично проширење TST-а и може бити ефикасан допринос у мониторингу присуства ендопаразита код малих преживара. Корисницима омогућава да: (а) брзо процене мале преживаре на присуство знакова паразитоза, (б) направе ефикасне процене здравственог стања својих животиња, (в) идентификују очекиване паразите, (д) одаберу групе антихелминтика за третман (г) користе практичне системе за привремену идентификацију третираних животиња и (д) упознају се са ограничењима тих система (Bath и Van Wyk, 2009).

FAMACHA© систем представља графикон процене тежине паразитске инфекције код преживара и доношење одлуке о лечењу, на основу степена анемије слузнице ока. Клиничка анемија изражена кроз вредност запремине еритроцита, степенује се на скали FAMACHA картице 1–5 и указује на могућност постојања инфекције хематофагом нематодом *H. contortus*, трематодама и цестодама (Ferreira и сар., 2019).

Осим повећаних FAMACHA резултата, разлог за дехелминтизацију могу бити и друге клиничке манифестације код инфицираних животиња. На основу индекса телесне кондиције, који се одређује BCS (Body Condition Score) картицом на скали од 1–5, постоји могућност инфекције *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp. и нодуларним хелминтима (Mahieu и сар., 2007, Agese-García и сар., 2016). Запрљаност репа и задњег дела тела фецесом одређује се DS (Dag Score) картицом на скали 1–5 и показатељ је могућег присуства инфекције нематодама *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Strongyloides* spp. и кокцидијама (*Eimeria* spp). Постојање назалног исцедка указује на присуство носне мијазе, плућних паразита и

пнеумоније, а степенује се према ND (Nasal Discharge) картици на скали 1–5. Хладни подвлични едеми се према тежини категоришу на скали 1–5, указују на низак ниво протеина у крви испитиваних животиња и на могућност постојања паразитских инфекција проузрокованих врстом *H. contortus*, трематодама, цестодама и кокцидијама (*Eimeria* spp) (Walker и сар., 2015).

Поред ових пет стандардних клиничких симптома, понекад се изводи и опсервација стања крзна (лош квалитет длаке или абнормално руно), чије се промене класификују на скали 1–5, а могу указивати на присуство инфекције нематодама ((*H. contortus*, *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp.), кокцидијама (*Eimeria* spp) и ектопаразитима (Vanimiseti и сар., 2004, Mahieu и сар., 2007)

Са аспекта диференцијалне дијагностике јединки код којих се испољавају знаци резистенције, односно резилијенције, један од најзначајнијих параметара јесу добијене FAMACHA вредности (Burke и Miller, 2008). Употреба FAMACHA© система омогућава произвођачима малих преживара да донесу одлуке о дехелминтизацији на основу процене нивоа анемије проузроковане нематодом *H. contortus* код оваца и коза (Agese-García и сар., 2016). Овај узрочник је економски најзначајнија ГИН оваца и коза, најчешћи је узрок анемије током сезоне испаше у САД, а у случајевима инфекција високог интензитета проузрокује угинућа.

Картица FAMACHA© је развијена у Јужној Африци, а у САД је уведена од стране америчког конзорцијума за контролу паразита малих преживара (American Consortium for Small Ruminant Parasite Control – ACSRPC). То је један од најуспешнијих дијагностичких индикатора, према коме се боја слузнице очију малих преживара упоређује са 5 категорија боја на контролној

картици боја, које одговарају различитим нивоима анемије. Категорија 1 представља „не анемично“ стање, док категорија 5 представља стање „тешке анемије“ (Martinez-Valladares и сар., 2013). На основу резултата утврђених картицом, идентификују се и селективно дехелминтишу овце и козе са анемијом.

Селективна дехелминтизација смањује употребу лекова и успорава развој резистенције на антихелминтике код ГИН. Такође може помоћи у доношењу селективних одлука о узгоју, тако што ће идентифи-

иковати оне животиње које су најосетљивије на инфекцију црвеним паразитима, односно резилијентне јединке (Rizzon Cintra и сар., 2018). FAMACHA© се примењује само у случајевима где је главни узрочник клиничке болести *H. contortus*. Пре извођења теста, треба имати у виду да извесна стања (обољења ока, стимулуси из околине и системска обољења) проузрокују црвенило слузнице ока и на тај начин могу прикрити анемију. Спорни могу да буду и други узроци анемије, али су они ретки у поређењу са инфекцијом ГИН током сезоне испаше (Ferreira и сар., 2019)

ЗАКЉУЧАК

Пошто су адаптиране на присутне паразите, резилијентне животиње представљају неидентификоване изворе паразитске инфекције, који се могу дуго одржати вршећи континуирану реконтаминацију пашњака. Бивају идентификовани тек спровођењем квантитативне копролошке дијагностике и одређивањем вредности FEC-а за сваку јединку индивидуално. Резилијентне животиње имају доследно ниске вредности FEC -а и ниске FAMACHA резултате, углавном су добре телесне кондиције и не показују варијације у телесној тежини. Добијене вредности FEC-а обично указују да су сумњиве (резилијентне) животиње носиоци много већег броја паразита него што би се очекивало анализом и проценом добијеном на основу других клиничких

параметара. Ове јединке није потребно дехелминтисати или ретко захтевају дехелминтизацију, у поређењу са другим животињама из стада које показују клиничке знаке обољења и након дехелминтизације, услед резистенције паразита. Животиње инфициране великим бројем резистентних ендопаразита показују високе FEC вредности, високе FAMACHA резултате и лошије су телесне кондиције уз приметне варијације у телесној тежини и након третмана. Краткотрајне промене телесне тежине, могу бити показатељи паразитоза, што омогућава брзу идентификацију животиња које ће вероватно имати користи од третмана. Без информација о FEC-у, не може се са сигурношћу знати да ли је уочена особина резистенција или резилијенција.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arece-García J., López-Leyva Y., González-Garduño R., Torres-Hernández G., Rojo-Rubio R., Marie-Magdeleine C. (2016): *Effect of selective anthelmintic treatments on health and production parameters in Pelibuey ewes during lactation*. Trop Anim Health Prod 48 (2): 283–287.
2. Bath F.G., Van Wyk A.J. (2009): *The Five Point Check© for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants*. Small Ruminant Res 86 (1): 6–13.
3. Bath G.F., Wyk J.A., Malan F.S. (2010): *Targeted selective treatment of sheep using the Five Point Check©*. J Common Vet Assoc 26: 29–32.
4. Bishop S.C. (2012): *A consideration of resistance and tolerance for ruminant nematode infections*. Front Genet 3: 168.
5. Bishop S.C., Morris C.A. (2007): *Genetics of disease resistance in sheep and goats*. Small Rumin Res 70 (1): 48–59.
6. Bondarenko I.G., Kinčeková J., Várady M., Königová A., Kuchta M., Koňáková G. (2009): *Use of modified McMaster method for the diagnosis of intestinal helminth infections and estimating parasitic egg load in human faecal samples in non-endemic areas*. Helminthologia, 46: 62–64.
7. Burke J.M., Miller E.J. (2008): *Use of FAMACHA system to evaluate gastrointestinal nematode resistance/ resilience in offspring of stud rams*. Vet Parasitol 153: 85–92.
8. Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. (1992): *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. Vet Parasitol 44 (1-2): 35–44.
9. Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A., Vercruyse J. (2006): *The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. Vet Parasitol 136 (3-4): 167–185.
10. Dimitrijević S. (1999): *Diagnostika parazitskih bolesti*. Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu, „Jovan“, Beograd, str. 132.
11. Dobson R., Jackson F., Levecke B., Besier B., Kaplan R., Sangster N., Vercruyse J. (2011): *WAAVP guidelines for faecal egg count reduction tests (FECRT)*. *Proceedings: 23rd International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology: Towards good management practices in parasitic control*. Buenos Aires, Argentina.
12. Doeschl-Wilson A.B., Villanueva B., Kyriazakis I. (2012): *The first step toward genetic selection for host tolerance to infectious pathogens: obtaining the tolerance phenotype through group estimates*. Front Genet 3: 265.
13. Gunia M., Phocas F., Gourdine J.L., Bijma P., Mandonnet N. (2013): *Simulated selection responses for breeding programs including resistance and resilience to parasites in Creole goats*. J Anim Sci 91 (2): 572–581.
14. Ferreira B.J., Santos Sotomaior C., Diógenes C.A., Bezerra S., da Silva E.W., Morais Leite H.J.G., Rufino de Sousa E.J., de Fátima França Biz J., Evangelista Façanha A.D. (2019): *Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in tropical hair sheep*. Trop Anim Health Prod Published online 05 March 2019. doi.org/10.1007/s11250-019-01861-x

15. Jackson F., Coop R.L. (2000): *The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes*. Parasitol 120 Suppl (7): S95–107.
16. Kahn M.C. (2005): *Merck Veterinary manual*. (9th Ed.) Whitehouse Station, N.J., Great Britain: Merck & Co., pp. 262–265.
17. Kaplan R.M., Nielsen M.K. (2010): *An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore*. Equine Vet Educ 22: 306–316.
18. Lalošević V., Jarak M., Đurić S., Simin S. (2009): *Biološka kontrola helminata*. Letopis naučnih radova 33 (1): 118–125.
19. Levecke B., Kaplan M.R., Thamsborg M.S., Torgerson R.P., Verrecruysse J., Dobson J.R. (2018): *How to improve the standardization and the diagnostic performance of the fecal egg count reduction test?* Vet Parasitol 253: 71–78.
20. Love S., Hutchinson G. (2007): *Worm Test for livestock and guide to egg counts*. Profitable and sustainable primary industries, Primefact 480 (Replace agnote dai - 308), pp. 1–5.
21. Malan F.S., Van Wyk J.A. (1992): *The packed cell volume and color of the conjunctivae as aids for monitoring Haemonchus contortus infestations in sheep*. In: Biennial National Veterinary Congress, Grahamstown, South African Veterinary Association, 1, p. 139.
22. Martínez-Valladares M., Martínez-Pérez J.M., Robles-Pérez D., CorderoPérez C., McMahon C., Bartley D.J., Edgar H.W.J., Ellison S.E., Barley J.P., Malone F.E., Hanna R.E.B., Brennan G.P., Fairweather I. (2013): *Anthelmintic resistance in Northern Ireland (I): Prevalence of resistance in ovine gastrointestinal nematodes, as determined through faecal egg count reduction testing*. Vet Parasitol 195 (1-2): 122–130.
23. Mahieu M., Arquet R., Kandassamy T., Mandonnet N., Hoste H. (2007): *Evaluation of targeted drenching using famacha method in Creole goat: Reduction of anthelmintic use, and effects on kid production and pasture contamination*. Vet Parasitol 146: 135–147.
24. McKenna P.B. (2013): *Are multiple pre-treatment groups necessary or unwarranted in faecal egg count reduction tests in sheep?* Vet Parasitol 196 (3-4): 433–437.
25. McManus C., do Prado Paim T., de Melo C.B., Brasil B.S., Paiva S.R. (2014): *Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock*. Parasite 21: 56.
26. Pereckiene A., Petkevicius S., Vysniauskas A. (2010): *Comparative evaluation of efficiency of traditional McMaster chamber and newly designed chamber for the enumeration of nematode eggs*. Acta Vet Scand 52 (Suppl 1): S20.
27. Petričević M.S., Ilić T., Dimitrijević S. (2007): *Savremeni modeli i perspektiva kontrole parazitskih bolesti*. Vet Glasnik 61 (5-6): 337–350.
28. Rizzon Cintra C.M., Ollhoff D., Sotomaior S.C. (2018): *Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in growing lambs*. Vet Parasitol 251: 106–111.
29. Rollinson D. (2013): *Advances in parasitology*. First Edition, Elsevier Ltd, London, UK, pp. 292–294.
30. Roeber F., Jex A.J., Gasser R.B. (2013): *Chapter Four - Next Generation Molecular Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants: A Turning Point?* Adv Parasitol 83: 267–333.
31. Roepstorff A., Nansen P. (1998): *Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine*. FAO Animal Health Manual, Rome; No 3, 47–55.

32. Salgado J.A., Santos C.P. (2016): *Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil*. Rev Bras Parasitol Vet 25 (1): 3–17.
33. Storey B. (2015): *Fecal Egg Counts: Uses and Limitations*. W4, What Works With Worms Congress, May, Pretoria, South Africa, pp. 1–9.
34. Vadlejch J., Petrtyl M., Zaichenko I., Čadková Z. (2011): *Which McMaster egg counting technique is the most reliable?* Parasitol Res 109: 1387–1394.
35. Vanimisetti H.B., Greiner S.P., Zajac A.M., Notter D.R. (2004): *Performance of hair sheep composite breeds: resistance of lambs to Haemonchus contortus*. J Anim Sci 82 (2): 595–604.
36. Várady M., Papadopoulos E., Dolinská M., Konigová A. (2011): *Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: Sheep versus goats*. Helminthologia 48 (3):137–144.
37. Vidyashankar A.N., Hanlon B.M., Kaplan R.M. (2012): *Statistical and biological considerations in evaluating drug efficacy in equine strongyle parasites using fecal egg count data*. Vet Parasitol 185: 45–56.
38. Walker J.G., Ofithile M., Tavolaro F.M., Van Wyk J.A., Evans K., Morgan E.R. (2015): *Mixed methods evaluation of targeted selective anthelmintic treatment by resource-poor smallholder goat farmers in Botswana*. Vet Parasitol 214 (1-2): 80–88.
39. Wang C., Torgerson R.P., Höglund J., Furrer R. (2017): *Zero-inflated hierarchical models for faecal egg counts to assess anthelmintic efficacy*. Vet Parasitol 235: 20–28.
40. Wetzell E. (1951): *Verbesserte McMaster-Kammer zum Auszählen von Wurmeiern*. Tierärztl Umsch 6: 209–210.
41. Zajíček D. (1978): *Comparision of the efficiency of two quantitative ovoskopic methods*. Vet Med 23: 275–280.

Рад примљен: 13.10.2019.
Рад прихваћен: 01.12.2019.

DOI 10.7251/VETJEN1902240I

UDK 636.2/3.084:[636.09:615.33]

*Review scientific paper***THE IMPORTANCE OF DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RESISTANCE AND RESILIENCE IN RUMINANTS******Tamara ILIĆ^{1*}, Zoran KULIŠIĆ¹, Darko DESPOTOVIĆ², Bojan GAJIĆ¹,
Danica BOGUNOVIĆ¹, Sanda DIMITRIJEVIĆ¹**¹Department for Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Serbia²Public Veterinary Institute of Republic of Srpska "Dr. Vaso Butozan", Banja Luka, Republic of Srpska

*Corresponding author: Prof. dr Tamara Ilić: tamaradilic@gmail.com

Abstract: Control of the gastrointestinal parasites in different systems of ruminant breeding is based on vaccination, chemotherapy, improved herd management and use of genetic potentials of host animals. Strategy of the helminths control based on frequent anthelmintics usage is dominant among the world, although it is considered unsustainable due to the appearance of increased number and species of parasites that are resistance to drugs. Development of resistance on all three groups of broad-spectrum anthelmintics (nicotinic anthelmintics, benzimidazoles and macrolides lactones) as well as increased care for consumers health caused by appearance of used drugs residues in food, additionally complicate overall nematode control. With the aim to decrease appearance of anthelmintics resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants and in order to organize process of sustainable integrated parasite management, principle of targeted selective treatment is globally accepted. Implementing of this strategy has only recently become feasible, with development and practical use of systems that serve for clinical assessment of anemia in small ruminants which suffer from hemochrosis. Besides that, short term changes in body weight and body condition scoring may be indicators of diseases caused by endoparasites, as it can provide rapid identification of animals that will probably have benefits from therapy. Obtained results of quantitative coprological diagnostic tests and results for anemia assessment are criteria that provide differential diagnosis between healthy and resilient animals and easier diseases diagnostic. Since resilient animals play important role in pasture contamination, the significance of their detection is understandable.

Key words: ruminants, resistance, anthelmintics, resilience, diagnostic parameters

** This study is part of the projects TR 31084, 173001, III 46002 and TR 31088, funded by Ministry of Education, Science and Technical Development of the Republic of Serbia.

INTRODUCTION

Parasitic gastroenteritis is economically the most important disease of grazing animals, which is mainly controlled, during last five decades, by adequate organization of grazing and anthelmintics usage. Grazing management systems are mainly impractical and expensive, whilst the frequent use of anthelmintics has led to problems related to increased resistance of parasites to antiparasitic drugs, especially in young ruminants (Várady et al., 2011). Appearance of resistance was observed among the world in all three broad-spectrum anthelmintics – nicotinic anthelmintics (imidazothiazole and tetrahydropyrimidine), benzimidazoles and macrolides lactones, that are used in sheep breeding for suppression of infections cause by strongyloidiasis (Coles et al., 2006, Vidyashankar et al., 2012, *Salgado and Santos*, 2016). Decreased efficiency of anthelmintics combined with attempt to reduce chemical usage in production systems have stimulated search for alternative and sustainable options for parasite control and have resulted in appearance of new classes of anthelmintics on market (amino-acetonitrile derivate and spiroindoles) (McManus et al., 2014).

Development of resistant helminth strains is an evolutionary characteristic based on intra-population selection of those parasites that carry alleles responsible for resistance on chemical components from drug. Long-lasting usage of the same antiparasitic drug, or agents that have similar mechanism of drug action, lead to the appearance of parasite resistance on drug. Once established, resistance may last several years (*Jackson and Coop*, 2000), or disappear as a result of selection and genetic drift, which act in a way to bring back sensibility in population (Petričević et al., 2007).

Since the problem of resistance is very actual, much effort have been made to control its development and to slow down the process by using different approaches. Research during last

20 years indicates that the best way to prolong the process of selection of resistant genes in parasites is the usage of combined different preparations – mixtures with two or more different chemical active substances. The other recommendation is to rotate drugs from different chemical groups that have been used for avoiding a tolerance (Lalošević et al., 2009).

One of the possibilities to increase drug efficiency is food deprivation before peroral application of anthelmintics. Thus, the amount of food is reduced in digestive tract allowing more time for absorption and distribution of medicinal substances (*Jackson and Coop*, 2000). It is important to form sheep groups with similar body weight and to give each sheep dosage that is sufficient for largest sheep in the group. This approach ensures that each animal in the group receive sufficient drug dosage, since subdosing of animals is the most harmful (Lalošević et al., 2009).

The term resilience appears in many different research studies, although its definition differs. According to Doeschl-Wilson et al. (2012), resilience is capability of an animal to maintain a good condition and usual level of activity, while being infected by parasites, no matter the level of load created by the present pathogens. According to some authors, resilience is connected to capability of host/animal to survive and stay productive no matter the parasite challenge it's exposed to (Bishop, 2012). There is one more definition in the literature for this term, according to which resilience represents ability of the host to tolerate existing parasites without showing any clinical signs of diseases (Gunia et al., 2013). *Bishop and Morris* (2007) define resilience as ability of the animals to adapt to infection with different causes of parasitological ethiology from environment. According to Storey (2015), resilience represents adaptability to changes and owning capacity for successful adaptation, when facing parasitic

infection, as gaining more and wider competences for stress reaction.

Since resistance and resilience are hereditary characteristics, accurate and timely definition of each parameter that helps process of animal breeding selection is important, shown by these traits. For confirmation of animals that show resilience when facing with helminth challenge, or in

which parasites are anthelmintics resistant, counting of helminth eggs number present in feces of examined animals is necessary (FEC - Fecal Egg Count), as well as estimation of clinical anemia based on erythrocyte volumen value (packed cell volume - PCV) using FAMACHA (FAffa MAlan CHArt) test (*Malan and Van Wyk*, 1992) and parameters related to body condition (Storey, 2015).

DIAGNOSTIC VALUE OF FECAL EGG COUNTING (FEC - FECAL EGG COUNT)

For assessment of anthelmintics efficiency in ruminants, detection of anthelmintics resistance and resilience proving, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) recommends McMaster method (Coles et al., 1992, Storey, 2015). That is standard and most often used conventional method of quantitative coprological diagnostic in veterinary parasitology. It serves for determination of the endoparasitic infection degree and is based on counting of number of parasitic elements in fecal weigh unit (EPG - Eggs Per Gram, OPG - Oocysts Per Gram, CPG - Cysts Per Gram and LPG - Larvae Per Gram). Sensitivity of method is from 10 to 100 parasitic elements in 1 g of feces (Pereckiene et al., 2010).

Application of this procedure, until now, have been described in large and small ruminants, horses, pigs, canines, birds, rabbits, mice, turtles, lemurs and human (Bondarenko et al., 2009). Vadlejch et al. (2011) compared sensitivity and reliability of three modified McMaster techniques with the aim to estimate which modification is most suitable for routine parasitological examinations and diagnostic assessments in veterinary clinical practice (Table 1).

It was shown that the concentration McMaster method (*Roepstorff and Nansen*,

1998) is most sensitive and most reliable for helminth egg detection. This method is fast, use largest quantity of feces (4g), have low limit of detection (20 EPG), and, thanks to centrifugation, fecal suspension is clear enough for microscopy.

Modification made by Zajček (1978) should provide better results due to lower correction factor, two procedures of centrifugation and lowest dilution ratio. Nevertheless, low dilution ratio consequently lead to presence of large amount of impurity in examined substance. This makes the process of preparation examination significantly difficult, in which parasitic elements may be camouflaged or wrongly detect as fecal pseudoparasitical particles, thus increasing a unreliableness of this procedure. This method has middle limit detection value and is applicable with result accuracy of 100 EPG (Vadlejch et al., 2011).

Third comparable method, according to Wetzel (1951), is the simplest but with worst result. Low sensitivity and reliability of this method is most probably caused by high correction factor and absence of centrifugation. This method has high limit of detection value and gives precise results at 200 EPG (Vadlejch et al., 2011).

Table 1. Comparative parameter values of modified McMaster techniques (Vadlejch et al., 2011)

Parameters	Modified McMaster techniques		
	Wetzel (1951)	Zajiček (1978)	Roepstorff and Nansen (1998)
The amount of feces (g)	2	1	4
Type of flotation solution	NaCl	MgSO ₄ +Na ₂ S ₂ O ₃	NaCl + glucose
Specific weight of solution	1.200	1.280	1.300
Centrifugation (RPM ¹)	-	2000	1200
Centrifugation (RCF ²)	-	479	172
Time of centrifugation (min)	-	2	5
Time of flotation in chamber (min)	2-3	5	3-5
Number of chambers in McMaster object	3	2	2
Multiplicative (corrective) factor	67	33	20

¹RPM - Revolutions Per Minute

²RCF - Relative Centrifugal Force

In different ruminant species there are certain limits of FEC procedure that may significantly impact the explication, interpretation and reliability of obtained results. In adult cattle those are: 1) limited diagnostic value, linked to infection degree that is usually not correlated with helminthes load; 2) low FEC values, that requires more sensitive flotation techniques in cattle than in sheep; 3) limited clinical value for *Nematodirus* spp., since the most damage is caused by immature stadiums of this nematode before starting laying eggs and 4) clinical form of paramphimatisis, that is usually caused by numerous immature parasites in migration, leading to absence or low number of eggs in feces (Rollinson, 2013).

In hemonchosis and trichostrongilidosis of small ruminants, FEC is in high correlation with helminth load of animals. In the case of polyparasitisms, when relatively high production of *H. Contortus* eggs may camouflage lower production of eggs by some other species (*T. colubriformis* and *T. circumcineta*), FEC has limited diagnostic values (Roerber et al., 2013). Because of that, only approximate assessment of infection intensity and decision when animals should be treated can be obtained based on numbers of eggs laid by different gastrointestinal nematode (GIN) species (Table 2).

Table 2. Determination of rate of infection with GIN for young animals (Kahn, 2005)

Parasite	Infection rate (EPGF - Eggs Per Gram Feces)		
	Low	Moderate	High
CATTLE			
Mixed infection	50-200	200-800	800+
<i>Haemonchus</i> spp.	200	200-600	600+
<i>Trichostrongylus</i> spp.	50-100	100-400	400+
<i>Cooperia</i> spp.	200-300	300-2500	2500+
SHEEP			
Mixed infection	50-800	800-1200	1200+
<i>Haemonchus</i> spp.	100-2000	2000-7000	7000+
<i>Trichostrongylus</i> spp.	100-500	500-2000	2000+
<i>Nematodirus</i> spp.	50-100	100-600	600+
<i>Oesophagostomum</i> spp.	100-800	800-1600	1600+

It is known that high efficiency is expected from antiparasitics on field. Antiectoparasitics should have absolute efficiency, while it is expected to be around 95% in anthelmintics, since it is favorable to maintain small number of parasites in the body as a stimulus of immunological

response of the host (Dimitrijević, 1999). In grazing animals there is always mixed infection with higher number of different gastrointestinal nematoda species. Some of them provide development of natural immunity, so that it can be decided if treatment of animal is necessary on the basis of FEC results.

Table 3. Interpretation of clinical form appearance in cattle based on EPG

(Love and Hutchinson, 2007)

Parasite species	Egg number/1g feces (EPG)
<i>Haemonchus</i>	200
<i>Trichostrongylus</i>	50
<i>Ostertagia</i>	150
<i>Oesophagostomum</i>	100
<i>Cooperia</i>	500
<i>Fasciola</i>	50

Ilić et al:

The importance of differential diagnosis of resistance and resilience in ruminants

This is very important, since it is necessary to maintain balance between induced immunity (its development is stimulated by small number of helminth in animal) and productive capability (its decrease is affected by the same number

of helminths, that cause subclinical form of disease). Obtained EPG results might be very useful for interpretation of clinical form of some helminthosis in large and small ruminants (Table 3).

DIAGNOSTIC VALUE OF FECAL EGG COUNT REDUCTION TEST (FECRT)

Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT) is established in early 90's (Coles et al., 1992) and represents a method of choice for monitoring anthelmintics efficiency in ruminants (Dobson et al., 2011). Currently, it is the unique test that may detect resistance of all types of nematoda species in all host species (McKenna, 2013) and serve for calculation of egg count reduction in feces, by comparing mean values of FEC before treatment and after obtained treatment (Wang et al., 2017).

According to World Association for the Advancement in Veterinary Parasitology (WAAVP), there are guidelines for performing and calculating standard FECRT (Coles et al., 1992, 2006), which are improved by recommendations made by Levecke et al. (2017). In accordance with those guidelines, recommendations are: size of sample (≥ 10 or ≥ 15 animals per group for treatment, and each excretion at least 150 EPG), FEC method (McMaster), statistical analysis (FECRT based n arithmetical mean of grouped FEC after drug application) and criteria which define decreased drug efficiency (FECRT $< 90\%$ or FECRT $< 95\%$, resistance is declared if the fecal egg count reduction is lower than 95%, and the lowest limit of drug efficiency is lower than 90%) (Dobson et al., 2011; Vidyashankar et al., 2012).

For performing FECRT, sample of feces is collected before dehelmintisation and EPG value is determined in it, followed by treatment. Sampling of feces is repeated 14 days after obtaining treatment and value of EPG is determined again. By using special equation, percentage decrease of eggs count in feces is calculated individually. Thereafter, average decrease for all test animals is calculated, in order to calculate overall decrease for farm or herd. This value is subsequently used for obtaining calculation related to existence or absence of drug resistance (Kaplan and Nielsen, 2010). If the drug is effective, no parasite should survive treatment longer than the time needed for gut emptying (usually up to 48 hours). This period of time may be prolonged for as many days as temporary suppression of eggs laying lasts (3 days – for imidazole, 8 days – for benzimidazoles, 14 to 17 days – for macrolides lactones), so that efficiency of certain drug groups is estimated only after expiration of this period (Coles et al., 2006).

If examined animals have large egg number in feces, after which dehelmintization is obtained, and 10 days after FEC shows zero or very low value (lower than 5% of value before treatment), for that group can be claimed certainly that dehelmintisation is successfully obtained (Coles et al., 1992).

DIAGNOSTIC VALUE „FIVE POINT CHECK“ CLINICAL APPROACH

Obtained diagnostic FEC based results have to be complement with assessment related to presence or absence of clinical signs of diseases („Five Point Check“). This clinical approach

means monitoring of five most common nonspecific symptoms in animals infected by parasites – anemia of mucus membrane of eye, body

weight lost or growth and development retardation, fecal dirtiness of tail and posterior body region, submandibular edema and runny nose (Bath et al., 2010). Based on clinical symptoms severity, selection of animals that should undergo process of dehelminthisation is done. Herd health status is classified as: „good“ (no need for dehelminthisation), „bad“ (necessarily of dehelminthisation, with control during several fallowing months) and mixed results („some animals are good, some are bad“ - according to estimated symptoms severity, it is decided which animals will undergo dehelminthisation process) (Storey, 2015).

With the aim to slow down the onset of the anthelmintics resistance and organization of Integrated Parasite Management (IPM), the principle of Targeted Selective Treatment (TST) is globally accepted. Implementation of this strategy has become workable on farms only with development and practical application of FAMACHA© system for clinical estimation of anemia caused by hematophagous nematode *Haemonchus contortus* in small ruminants. Principle of TST can be expanded on other important ectoparasites, under condition that developed system is practical, economical and realistically capable to identify animals that are under risk of overloading by expected endoparasites (Bath and Van Wyk, 2009).

Candidates for expanded TST system manifest one of five listed clinical symptoms that served as bases for designing of practical guide for breeders. For international, multilingual usage, this system is called Five Point Check©, and represent practical expansion of TST and may be effective contribution in monitoring of endoparasite presence in small ruminants. It let users to: (a) make rapid estimation of parasitosis signs in small ruminants, (b) make effective estimation of health status of own animals, (c) identify expected parasites, (d) select anthelmintic groups for treatment (e) use practical systems for temporary identification of treated animals

and (f) familiarize with limits of the system (Bath and Van Wyk, 2009).

FAMACHA© system presents figure of the estimation of severity of parasite infection in ruminants and making decisions about healing, based on anemia degree of mucous membrane. Clinical anemia is represented through erythrocyte volume, and is ranged from 1 to 5 on the scale of FAMACHA card and it indicates the infection by haematophage nematode *H. contortus*, trematodes and cestodes (Ferreira et al., 2019).

Besides increased FAMACHA results, the cause for delemintisation might also be other clinical manifestations in infected animas. Based on body condition index, which is determined by BCS (Body Condition Score) by card on scale from 1 to 5, there is possibility of infection by *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp. and nodular helminths (Mahieu et al., 2007, Arece-Garcia et al., 2016). Dirtiness of tail and posterior body region with feces is determined by DS (Dag Score) card with 1 to 5 scale and is indicator of possible presence of infection by nematodes *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Strongyloides* spp. and coccidia (*Eimeria* spp). Existance of nasal discharge indicates the presence of nasal miasa, pulmonal parasites and pneumonia, and is scaled by ND (Nasal Discharge) card on scale 1-5. Cold submandibular edema is, according to severity, catogorised on 1 to 5 scale, and indicates the low blood protein level in examined animals and on possibility of parasite infection caused by *H. Contortus* species, trematodes, cestodes and coccidia (*Eimeria* spp) (Walker et al., 2015).

Besides these five standard clinical symptoms, sometimes observation of condition of the fur is performed (low hair quality or abnormal fleece), which changes are classified on scale from 1 to 5, and may indicate the presence of nematode infection (*H. contortus*, *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp.), coccidia (*Eimeria* spp) and ectoparasites (Vanimisetti et al., 2004; Mahieu et al., 2007)

Ilić et al:

The importance of differential diagnosis of resistance and resilience in ruminants

From the aspect of differential diagnosis of animals that show signs of resistance, i.e. resilience, some of the most important parameters are obtained FAMACHA values (Burke and Miller, 2008). Usage of FAMACHA© system provides small ruminants breeders to make decisions related to dehelminthisation based on assessment of anemia rate caused by *H. contortus* in sheep and goats (Arece-Garcia et al., 2016). This causative agent is economically most important GIN in sheep and goats, is most common cause of anemia during pasture season in USA, and in the cases of infections of high intensity causes death.

FAMACHA© card is developed in South Africa, and is imported in USA by American Consortium for Small Ruminant Parasite Control (ACSRPC). That is one of the most successful diagnostic indicators, according to which the color of eye mucous membrane is compared with 5 categories of color on control panel with colors that match the different anemia rates. Category 1 is "non anemic" state, while category 5 represent the state of "severe anemia"

(Martinez-Valladares et al., 2013). Based on results determined by card, sheep and goats with anemia are identified and exposed to selective dehelminthisation.

Selective dehelminthisation reduces the drug usage and slows down the development of anthelminths resistance in GIN. It can also help in making selective decisions related to breeding, in a way that it will identify those animals that are most sensitive to gut parasite infection, i.e. resilient animals (Rizzon Cintra et al., 2018). FAMACHA© is applied only in a cases where main causative agent of clinical disease is *H. contortus*. Before performing the test, it should be taken in consideration that some stages (eye diseases environmental stimulus and systemic diseases) cause reddish of eye mucous membrane and thus may camouflage anemia. Questionable may also be the other causes of anemia, but they are rare comparing to GIN infection during pasture season (Ferreira et al., 2019).

CONCLUSION

Since they are adapted to present parasites, resilient animals present non-identified sources of parasite infections, which can be maintained for a long period and obtained continual recontamination of pasture. They can be identified only just with implementation of quantitative coprological diagnostic and performing FEC values for each individual respectively. Resilient animal has consistently low FEC levels and low FAMACHA results, mainly are in good body condition and do not show variations in body weight. Obtained FEC values usually indicate that suspicious (resilient) animals are carriers of much higher number of parasites than it can be expected by analysis and estimation obtained on other clinical parameters. These animals should

not be dehelminthed, or should be rarely dehelminthed, compared to the other herd animals which show clinical signs of diseases also after dehelminthisation, due to parasite resistance. Animals infected by large number of resistant endoparasites show high FEC values, high FAMACHA results and have poorer body condition with significant body weight variations also after treatment. Short term changes in body weights, may be indicators of parasitosis, and this may provide rapid identification of animals that will probably have benefits from treatment. Without FEC information, it cannot be certainly defined if observed noted characteristic is resistance or resilience.

REFERENCES

1. Arece-García J., López-Leyva Y., González-Garduño R., Torres-Hernández G., Rojo-Rubio R., Marie-Magdeleine C. (2016): *Effect of selective anthelmintic treatments on health and production parameters in Pelibuey ewes during lactation*. Trop Anim Health Prod 48 (2): 283-287.
2. Bath F.G., Van Wyk A.J. (2009): *The Five Point Check© for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants*. Small Ruminant Res 86 (1): 6–13.
3. Bath G.F., Wyk J.A., Malan F.S. (2010): *Targeted selective treatment of sheep using the Five Point Check©*. J Common Vet Assoc 26: 29–32.
4. Bishop S.C. (2012): *A consideration of resistance and tolerance for ruminant nematode infections*. Front Genet 3: 168.
5. Bishop S.C., Morris C.A. (2007): *Genetics of disease resistance in sheep and goats*. Small Rumin Res 70 (1): 48–59.
6. Bondarenko I.G., Kinčeková J., Várady M., Königová A., Kuchta M., Koňáková G. (2009): *Use of modified McMaster method for the diagnosis of intestinal helminth infections and estimating parasitic egg load in human faecal samples in non-endemic areas*. Helminthologia, 46: 62–64.
7. Burke J.M., Miller E.J. (2008): *Use of FAMACHA system to evaluate gastrointestinal nematode resistance/resilience in offspring of stud rams*. Vet Parasitol 153: 85–92.
8. Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. (1992): *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. Vet Parasitol 44 (1–2): 35–44.
9. Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A., Vercruyse J. (2006): *The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. Vet Parasitol 136 (3–4): 167–185.
10. Dimitrijević S. (1999): *Dijagnostika parazitskih bolesti*. Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu, „Jovan“, Beograd, str. 132.
11. Dobson R., Jackson F., Levecke B., Besier B., Kaplan R., Sangster N., Vercruyse J. (2011): *WAAVP guidelines for faecal egg count reduction tests (FECRT)*. *Proceedings: 23rd International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology: Towards good management practices in parasitic control*. Buenos Aires, Argentina.
12. Doeschl-Wilson A.B., Villanueva B., Kyriazakis I. (2012): *The first step toward genetic selection for host tolerance to infectious pathogens: obtaining the tolerance phenotype through group estimates*. Front Genet 3: 265.
13. Gunia M., Phocas F., Gourdine J.L., Bijma P., Mandonnet N. (2013): *Simulated selection responses for breeding programs including resistance and resilience to parasites in Creole goats*. J Anim Sci 91 (2): 572–581.
14. Ferreira B.J., Santos Sotomaior C., Diógenes C.A., Bezerra S., da Silva E.W., Morais Leite H.J.G., Rufino de Sousa E.J., de Fátima França Biz J., Evangelista Façanha A.D. (2019): *Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in tropical hair sheep*. Trop Anim Health Prod Published online 05 March 2019. doi.org/10.1007/s11250-019-01861-x

15. Jackson F., Coop R.L. (2000): *The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes*. Parasitol 120 Suppl (7): S95–107.
16. Kahn M.C. (2005): *Merck Veterinary manual*. (9th Ed.) Whitehouse Station, N.J., Great Britain: Merck & Co., pp. 262–265.
17. Kaplan R.M., Nielsen M.K. (2010): *An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore*. Equine Vet Educ 22: 306–316.
18. Lalošević V., Jarak M., Đurić S., Simin S. (2009): *Biološka kontrola helminata*. Letopis naučnih radova 33 (1): 118–125.
19. Levecke B., Kaplan M.R., Thamsborg M.S., Torgerson R.P., Vercruyse J., Dobson J.R. (2018): *How to improve the standardization and the diagnostic performance of the fecal egg count reduction test?* Vet Parasitol 253: 71–78.
20. Love S., Hutchinson G. (2007): *Worm Test for livestock and guide to egg counts*. Profitable and sustainable primary industries, Primefact 480 (Replace agnote dai - 308), pp. 1–5.
21. Malan F.S., Van Wyk J.A. (1992): *The packed cell volume and color of the conjunctivae as aids for monitoring Haemonchus contortus infestations in sheep*. In: Biennial National Veterinary Congress, Grahamstown, South African Veterinary Association, 1, p. 139.
22. Martínez-Valladares M., Martínez-Pérez J.M., Robles-Pérez D., CorderoPérez C., McMahon C., Bartley D.J., Edgar H.W.J., Ellison S.E., Barley J.P., Malone F.E., Hanna R.E.B., Brennan G.P., Fairweather I. (2013): *Anthelmintic resistance in Northern Ireland (I): Prevalence of resistance in ovine gastrointestinal nematodes, as determined through faecal egg count reduction testing*. Vet Parasitol 195 (1–2): 122–130.
23. Mahieu M., Arquet R., Kandassamy T., Mandonnet N., Hoste H. (2007): *Evaluation of targeted drenching using famacha method in Creole goat: Reduction of anthelmintic use, and effects on kid production and pasture contamination*. Vet Parasitol 146: 135–147.
24. McKenna P.B. (2013): *Are multiple pre-treatment groups necessary or unwarranted in faecal egg count reduction tests in sheep?* Vet Parasitol 196 (3–4): 433–437.
25. McManus C., do Prado Paim T., de Melo C.B., Brasil B.S., Paiva S.R. (2014): *Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock*. Parasite 21: 56.
26. Pereckiene A., Petkevicius S., Vysniauskas A. (2010): *Comparative evaluation of efficiency of traditional McMaster chamber and newly designed chamber for the enumeration of nematode eggs*. Acta Vet Scand 52 (Suppl 1): S20.
27. Petričević M.S., Ilić T., Dimitrijević S. (2007): *Savremeni modeli i perspektiva kontrole parazitskih bolesti*. Vet Glasnik 61 (5–6): 337–350.
28. Rizzon Cintra C.M., Ollhoff D., Sotomaior S.C. (2018): *Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in growing lambs*. Vet Parasitol 251: 106–111.
29. Rollinson D. (2013): *Advances in parasitology*. First Edition, Elsevier Ltd, London, UK, pp. 292–294.
30. Roeber F., Jex A.J., Gasser R.B. (2013): *Chapter Four - Next Generation Molecular Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants: A Turning Point?* Adv Parasitol 83: 267–333.
31. Roepstorff A., Nansen P. (1998): *Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine*. FAO Animal Health Manual, Rome; No 3, 47–55.

32. Salgado J.A., Santos C.P. (2016): *Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil*. Rev Bras Parasitol Vet 25 (1): 3–17.
33. Storey B. (2015): *Fecal Egg Counts: Uses and Limitations*. W4, What Works With Worms Congress, May, Pretoria, South Africa, pp. 1–9.
34. Vadlejch J., Petrtyl M., Zaichenko I., Čadková Z. (2011): *Which McMaster egg counting technique is the most reliable?* Parasitol Res 109: 1387–1394.
35. Vanimisetti H.B., Greiner S.P., Zajac A.M., Notter D.R. (2004): *Performance of hair sheep composite breeds: resistance of lambs to Haemonchus contortus*. J Anim Sci 82 (2): 595–604.
36. Várady M., Papadopoulos E., Dolinská M., Konigová A. (2011): *Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: Sheep versus goats*. Helminthologia 48 (3):137–144.
37. Vidyashankar A.N., Hanlon B.M., Kaplan R.M. (2012): *Statistical and biological considerations in evaluating drug efficacy in equine strongyle parasites using fecal egg count data*. Vet Parasitol 185: 45–56.
38. Walker J.G., Ofithile M., Tavolaro F.M., Van Wyk J.A., Evans K., Morgan E.R. (2015): *Mixed methods evaluation of targeted selective anthelmintic treatment by resource-poor smallholder goat farmers in Botswana*. Vet Parasitol 214 (1-2): 80–88.
39. Wang C., Torgerson R.P., Höglund J., Furrer R. (2017): *Zero-inflated hierarchical models for faecal egg counts to assess anthelmintic efficacy*. Vet Parasitol 235: 20–28.
40. Wetzell E. (1951): *Verbesserte McMaster-Kammer zum Auszählen von Wurmeiern*. Tierärztl Umsch 6: 209–210.
41. Zajíček D. (1978): *Comparision of the efficiency of two quantitative ovoskopic methods*. Vet Med 23: 275–280.

Article received: 13.10.2019.

Article accepted: 01.12.2019.

DOI 10.7251/VETJSR1902251N

UDK 636.2.084.52:636.2.053.083.31

*Оригинални научни рад***УТИЦАЈ ТЕЛЕСНЕ КОНДИЦИЈЕ ЈУНИЦА НА КОНЦЕНТРАЦИЈУ ГЛУКОЗЕ, БЕТА-ХИДРОКСИБУТИРАТА И АКТИВНОСТ ГЛУТАТИОН-ПЕРОКСИДАЗЕ****Александар НИКШИЋ^{1*}, Јована ЈЕЧМЕНИЦА¹, Оливера ВАЛЧИЋ¹,
Светлана МИЛАНОВИЋ¹**¹ Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Србија

* Кореспондентни аутор: Светлана Милановић: cecam@vet.bg.ac.rs

Кратак садржај: Циљ овог рада је био да се утврди да ли постоје промене у концентрацији глукозе, бета-хидроксибутирата (ВНВ) и активности глутатион-пероксидазе (GPx) у зависности од телесне кондиције код јуница. Јунице су на основу телесне кондиције (ТК) сврстане у две групе: 1. ТК=3,75 и 2. ТК ≥4,0. У огледу је коришћена пуна крв 23 јунице узета 1–10 дан након партуса. Концентрације глукозе и ВНВ одређиване су одмах по узорковању крви, а активност GPX одређивана је након 24 сата. Јунице са већом телесном кондицијом имале су статистички значајно већу просечну концентрацију ВНВ и активност GPX. Просечна концентрација глукозе у обе групе се није разликовала.

Кључне речи: глукоза, глутатион-пероксидаза (GPx), кетонска тела, телесна кондиција

УВОД

Интензивна сточарска производња намеће употребу квалитетних хранива која ће у потпуности задовољити основне и производне потребе животиња у узгоју, максимално искориштавајући генетске капацитете јединки. Међутим, овај тип производње прате и многи метаболички поремећаји код животиња. Код млечних крава су ови поремећаји нарочито изражени јер се материје и енергија унети храном користе за задовољење потреба млечне жлезде, а потом за остале процесе организма.

Као последица неадекватне исхране крава, јављају се поремећаји метаболизма од којих је најчешћи кетоза.

Кетоза је поремећај метаболизма који се јавља код високомлечних крава, најчешће у раној лактацији односно перипарталном пе-

риоду. Због поремећаја у метаболизму угљених хидрата и масти, животиња улази у негативан енергетски биланс, што се одликује падом концентрације глукозе у крви и искоришћавањем резерви гликогена из јетре. Сва глукоза која се обезбеди као извор енергије преусмерава се у млечну жлезду за синтезу лактозе млека. Организам покушава да надокнади утрошену глукозу повећаним обимом глуконеогенезе у јетри, пре свега из оксалацетата као главне глуконеогене материје. Преусмеравање оксалацетата из циклуса лимунске киселине у глуконеогенезу узрокује накупљање ацетил-КоА настало у циклусу β-оксидације масних киселина, као последице негативног енергетског биланса. Због овога се метаболизам у великој мери преусмерава ка синтези кетонских тела (Јовановић и Михаиловић, 2008). Ово је на-

рочито изражено код крава са високом телесном кондицијом јер је због већих масних депозита код њих интензивнија β -оксидација са повећаним обимом кетогенезе (Цинцаревић, 2013).

У новијим истраживањима, све више се обраћа пажња на улогу оксидативног стреса у патогенези различитих метаболичких поремећаја карактеристичних за перипартални период (*El Deeb u El Bahr*, 2017). Сматра се да повећан обим β -оксидације масних киселина утиче на повећано стварање слободних

радикала. Важну улогу у антиоксидативној заштити организма има ензим глутатион-пероксидаза (GPx) који у свом каталитичком центру садржи селен у виду селеноцистеина (Forstrom и сар., 1978). Глутатион-пероксидаза је ензим који редукује водоник пероксид и пероксиде слободних масних киселина штитећи ћелије од оксидативних оштећења.

Због свега наведеног, циљ овог рада био је да утврдимо утицај телесне кондиције на ниво глукозе и β -хидроксибутирата у крви јуница, као и активност GPx.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

У циљу утврђивања утицаја телесне кондиције (ТК) јуница на ниво глукозе и β -хидроксибутирата, као и активности глутатион-пероксидазе, вршена је процена телесне кондиције коришћењем Вирцинија система модификованим по Едменсону, по скали од 1 до 5 (Edmenson, 1989), на основу које је 23 јунице сврстано у две групе. У прву групу (n=5) су сврстане јунице оптималне телесне кондиције (ТК=3,75), а у другу групу (n=18) гојазне јунице са оценом ТК $\geq 4,0$. Оцена телесне кондиције вршена је 3 недеље пре предвиђеног партуса. Да би се избегла варирања у смислу процене телесне кондиције, оцењивање су вршиле истовремено четири особе. Просек старости отелених јуница је био 25,5 месеци.

Прикупљање и испитивање узорака крви јуница спроведено је од 1. до 10. дана након партуса. Крв је добијена пункцијом из *v. coccigea media*. Анализе крви су рађене по систему тест-трака на које је наносена кап узорковане крви. Вредност концентрације глукозе и β -хидроксибутирата очитавана је на апарату „FREESTYLE PRECISION NEO Blood Glucose and Ketone Monitoring system“.

Активност глутатион-пероксидазе (GPx) из пуне крви крава одређивана је методом по

Günzler и сар. (1974) на спектрофотометру Cecil 2000. Принцип овог мерења је заснован на спектрофотометријском регистровању потрошње NADPH у куплованој ензимској реакцији. Метода је изведена тако што је у епрувету редом додато 500 μ l калијум-фосфатног пуфера, 200 μ l глутатиона (GSH), 50 μ l глутатион-редуктазе (GR), 10 μ l пуне крви хемолизоване Драпкиновим реагенсом (разблажење 21 пут) и 490 μ l редестиловане воде. Затим је извршена преинкубација у термостату на 37°C у трајању од 10 минута, након чега је у епрувету додато 200 μ l никотинамид аденин динуклеотид-фосфата (NADPH) и 550 μ l терцијалног бутилхидропероксида (TBH). Након додавања NADPH и TBH, садржај епрувете је изливен у кивету. Стављањем кивете у спектрофотометар започиње и регистровање потрошње NADPH, а у интервалима од 30 секунди на таласној дужини од 366 nm, бележи се апсорбанца.

Раствори GR, GSH и NADPH су увек свеже припремани, уз употребу редестиловане воде као растварача за GR и GSH. Као растварач за NADPH коришћен је 0,1 % NaHCO₃. Састав, као и коначне концентрације реагенаса, приказане су у табели 1.

Никшић и сар:

Утицај телесне кондиције јуница на концентрацију глукозе, бета-хидроксибутирата и активност глутатион-пероксидазе

Табела 1. Састав и количина реагенаса коришћених за спектрофотометријско одређивање активности GPx

Реагенси	Запремина (μl)	Коначна концентрација
Калијум-фосфатни пуфер (400 mmol/L, pH 7)	500	100 mmol/l
GSH (604 mmol/L)	200	4 mmol/L
Глутатион-редуктаза (GR)	50	6 mmol/L
Пуна крв (разбл. 21x)	10	0,375 IU/mL
NADPH	200	0,3 mmol/L
TBN	550	1,575 mmol/L
Редестилована вода	490	

Резултати добијени у овом огледу су груписани у одговарајуће статистичке серије и обрађени уз примену одређених статистичких метода у програму MS Excel 2007. Од статистичких метода, коришћене су израчунате средње вредности (аритметичка средина – $\bar{X}_{\text{ср}}$), релативне мере варијабилитета

(коэффициент варијације – K_v) и апсолутне мере варијабилитета (стандардна девијација – S_D). Анализе статистичке сигнификантности извршене су студентовим т-тестом. Добијени резултати су приказани у виду графика.

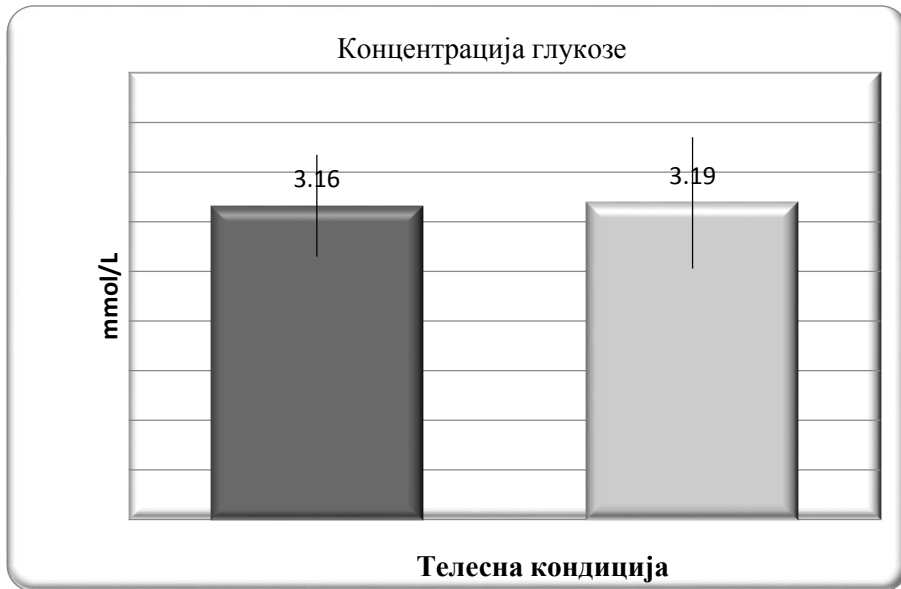
РЕЗУЛТАТИ

Испитиване су концентрације глукозе, ВНВ и одређивана активност GPx, са циљем да се упореде резултати између јуница оптималне телесне кондиције и гојазних јуница.

Приликом испитивања гликемије, није пронађена значајна разлика ($p=0,71$) између средњих вредности концентрација глукозе добијених код јуница оптималне телесне кондиције и гојазних јуница (Графикон 1).

Код јединки оптималне телесне кондиције, средња вредност концентрације глукозе била је $3,16 \pm 0,51$ mmol/L са интервалом вредности 2,8 – 3,9 mmol/L и коэффициентом варијације 16%.

Код гојазних јединки, средња вредност концентрације глукозе је била $3,19 \pm 0,66$ mmol/L, са интервалом вредности 1,5 – 4,6 mmol/L и коэффициентом варијације 20%.



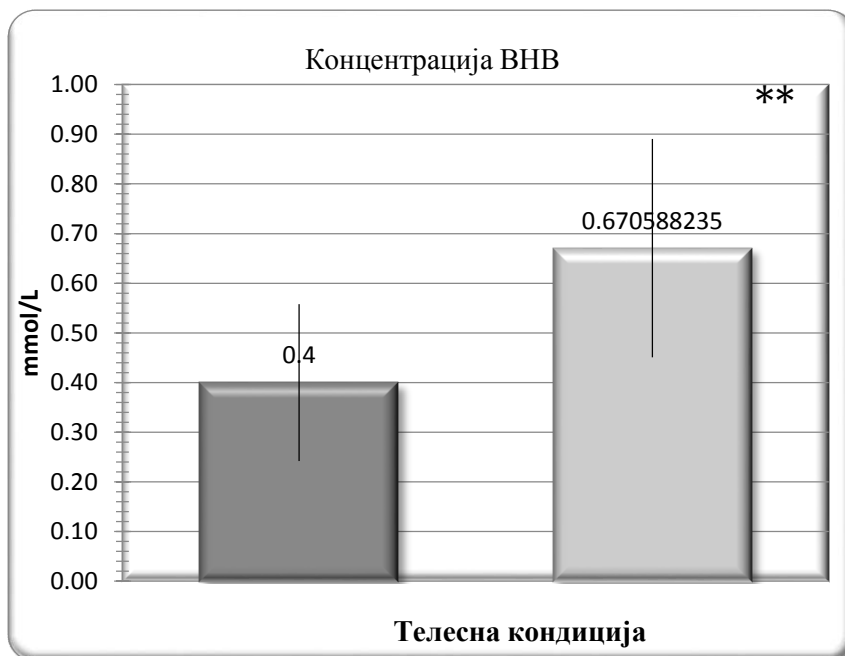
Графикон 1. Вредност концентрације глукозе у крви јуница оптималне и повећане телесне кондиције

Код јединки оптималне телесне кондиције, средња вредност концентрације ВНВ је била $0,4 \pm 0,16$ mmol/L, са интервалом вредности 0,2 – 0,6 mmol/L. Код гојазних јуница, средња вредност концентрације ВНВ је била $0,67 \pm 0,22$ mmol/L, са интервалом вредности 0,4 – 1,1 mmol/L. Испитивањем статистичке

значајности, пронађена је значајна разлика ($p=0,01$) између средњих вредности концентрација ВНВ јуница оптималне телесне кондиције и гојазних. Гојазне јунице су имале значајно вишу средњу вредност концентрације ВНВ (Графикон 2).

Никшић и сар:

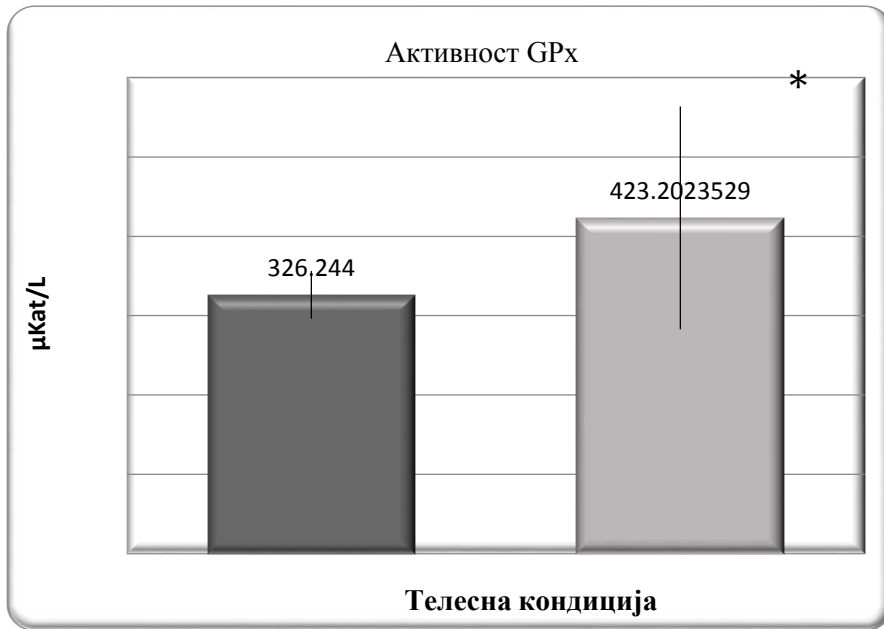
Утицај телесне кондиције јуница на концентрацију глукозе, бета-хидроксибутирата и активност глутатион-пероксидазе



Графикон 2. Вредност концентрације β -хидроксибутирата (BHB) у крви јуница оптималне и повећане телесне кондиције (** $p=0,01$)

Код јединки оптималне телесне кондиције, просечна активност GPx је била 326 ± 30 $\mu\text{Kat/L}$, са интервалом вредности 292–361 $\mu\text{Kat/L}$. Код гојазних јединки средња вредност за активност GPx је била 423 ± 140 $\mu\text{Kat/L}$, са интервалом вредности 225–687 $\mu\text{Kat/L}$.

Испитивањем статистичке значајности, утврђена је значајна разлика ($p=0,02$) између средњих вредности активности GPx јуница оптималне телесне кондиције и гојазних јуница. Код гојазних јуница је постојала значајно већа активност GPx (Графикон 3).



Графикон 3. Активност GPx у пуној крви јуница оптималне и повећане телесне кондиције (* $p=0,02$)

ДИСКУСИЈА

Кетоза представља чест метаболички поремећај код високомлечних крава. Узроци који доприносе настанку кетозе могу бити неадекватна исхрана у односу на период лактације, хормонски дисбаланс, лоша телесна кондиција, висока млечност и многи други.

Оцена телесне кондиције крава врши се у свим периодима производног и репродуктивног циклуса, а пожељна оцена телесне кондиције у периоду тељења је 3,25 – 3,75. Прегојене краве у периоду тељења и на почетку лактације, за који је карактеристичан негативни енергетски биланс, имају повећан ризик од настанка кетозе због ослобађања слободних масних киселина и нагомилавања ацетил-КоА. Како би се ови ризици избегли, неопходно је одржавати телесну кондицију крава у одређеном опсегу и то 3,25 – 3,75 на

порођају, 2,5 – 3,25 у току ране лактације, 2,5 – 3,5 током средине лактације, 3 – 3,5 у касној лактацији и 3,25 – 3,75 при засушењу (Edmenson, 1989). Како наводе Gillund и сар. (2001), настанак кетозног стања код гојазних крава након партуса је честа појава. На основу резултата које смо добили, код јуница је ово ређа појава, што се може објаснити мањом производњом млека првотелки. Због мање производње млека, негативан биланс енергије је мањи него код крава које су достигле своју максималну млечност.

Опасност од настанка кетозног стања расте са старашћу приликом првог тељења. Сматра се да првотелке млађе од 20 месеци спадају у најмање ризичну групу. С обзиром на то да је просек испитиваних јуница био

Никшић и сар:

Утицај телесне кондиције јуница на концентрацију глукозе, бета-хидроксибутирата и активност глутатион-пероксидазе

25,5 месеци, сврстане су у средње ризичну групу (Van Der Drift, 2013).

Код јединки оптималне телесне кондиције, средња вредност концентрације глукозе била је 3,16 mmol/L, а код гојазних јединки 3,19 mmol/L, што је у оквиру референтних вредности које износе 2,3–3,5 mmol/L (Стојић, 2010).

Вредност ВНВ преко 0,7 mmol/L две недеље након телења, заједно са вишом концентрацијом слободних масних киселина у крви, указују на негативан енергетски биланс (Celeska и сар., 2010). Вредности концентрације ВНВ испитиваних јуница са оптималном телесном кондицијом су биле у оквиру референтних вредности, док је код гојазних, шест

јединки (33,3%) имало повишене вредности. У овом периоду почиње да се развија негативан енергетски биланс, што за последицу има повећан обим синтезе кетонских тела. Код ових 6 јединки, забележена је нешто нижа просечна концентрација глукозе.

У доступној литератури нисмо нашли повезаност нивоа кетонских тела са активношћу ензима глутатион-пероксидазе, као ни објашњење зашто би била повећана њена активност код јуница са вишим нивоом ВНВ. Овај резултат указује на то да са већом пажњом треба приступити проучавању оксидативног стреса и антиоксидативног капацитета јединки са негативним енергетским билансом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цинцовић М. (2013): *Патофизиолошка процена перипарталног метаболичког стреса код високопродуктивних крава употребом ендокриних и метаболичких критеријума*. Докторска теза, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду.
2. Celeska I., Ulčar I., Stojkovski V., Dovenski T., Mitrov D., Džadžovski I. (2010): *Effect of lactation on energy metabolism in dairy cows from different categories*. Mac Vet Rev 33(2):15–21.
3. Edmenson A.J., Lean I.J., Weaver L.D., Farver T., Webster G. (1989): *A body condition scoring chart for Holstein dairy cows*. Journal of Dairy Science 72:68–78.
4. El Deeb W.M., El Bahr S.M. (2017): *Biochemical Markers of Ketosis in Dairy Cows at Postparturient Period: Oxidative Stress Biomarkers and Lipid Profile*. Am J of Biochem Mol Biol 7(2): 86–90.
5. Forstrom J.W., Zakowski J.J., Tappel A.L. (1978): *Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine*. Biochemistry 17:2639–2644.
6. Gillund P., Reksen O., Grohn Y.T., Karlberg K.J. (2001): *Body Condition Related to Ketosis and Reproductive Performance in Norwegian Dairy Cows*. Dairy Sci 84:1390–1396.
7. Günzler W.A., Steffens G.J., Grossman A., Kim S.M.A., Otting F., Wendel A., Flohe L., (1974): *The aminoacid sequence of a bovine glutathione peroxidase*. Physiol Chem 365:195.
8. Михаиловић М. и Јовановић И.Б. (2007): *Биохемија*. Научна КМД, Београд.
9. Стојић В. (2010): *Ветеринарска физиологија*. Научна КМД, Београд.
10. Van Der Drift S.G.A. (2013): *Ketosis In Dairy Cows: Etiologic Factors, Monitoring, Treatment. Dissertation*. Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, the Netherlands.

Рад примљен: 13.11.2019.

Рад прихваћен: 21.12.2019.

DOI 10.7251/VETJEN1902258N

UDK 636.2.084.52:636.2.053.083.31

*Original scientific paper***THE EFFECT OF BODY CONDITION SCORE OF HEIFERS ON GLUCOSE AND β -HYDROXYBUTYRATE CONCENTRATIONS AND GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY****Aleksandar NIKŠIĆ^{1*}, Jovana JEČMENICA¹, Olivera VALČIĆ¹, Svetlana MILANOVIĆ¹**¹Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Serbia

*Corresponding author: Svetlana Milanović: cecam@vet.bg.ac.rs

Abstract: The aim of this study was to establish if there are differences in glucose and β -hydroxybutyrate (BHB) concentrations as well as glutathione peroxidase (GPx) activity related to the body condition in heifers. Based on the body condition (BC), heifers were divided into two groups: 1. BC =3.75 and 2. BC \geq 4.0. Whole blood samples from 23 heifers, taken between day 1 and day 10 after parturition, were used in the study. Glucose and BHB concentrations were determined immediately after sampling, while GPx activity was determined 24 hours after that. Heifers with higher body condition had significantly higher average BHB concentration and GPx activity. Average glucose concentrations did not differ between groups.

Key words: glucose, glutathione peroxidase (GPx), ketone bodies, body condition

INTRODUCTION

Intensive livestock production requires use of nutrients of high quality that will completely satisfy basic and productive needs of breeding animals, maximizing the genetic capacity of individuals. Nevertheless, this type of production is associated with many metabolic disturbances in animals. In dairy cows, these disturbances are especially pronounced, since dietary nutrient and energy are primarily used for mammary gland needs and then for the rest of the processes in organisms.

As a consequence of inadequate nutrition in cows, metabolic disturbances occur with ketosis being the most frequent one.

Ketosis is the metabolic disturbance that appears in high yielding dairy cows, most frequently in early lactation i.e. peripartum period. Due to inadequate carbohydrate and fat metabolism, animal experiences negative energy balance that is characterized by decline of blood

glucose concentration and liver glycogen reserve depletion. All glucose obtained as energy source is redirected to mammary gland for lactose synthesis. Organism tries to compensate the loss of glucose by increasing the degree of liver gluconeogenesis, primarily from oxaloacetate that is the main gluconeogenic precursor. Redirecting of oxalacetate from citric acid cycle into gluconeogenesis provoke acetyl-CoA accumulation, that originates from β fatty acid oxidation as a consequence of negative energy balance. Because of that, metabolism is mainly redirecting to ketone bodies synthesis (*Mihailović and Jovanović, 2008*). This is especially pronounced in cows with high body condition since in this cows, due to higher fatty depots, β oxidation is more intensive and consequently degree of ketogenesis is increased (*Cincović, 2013*).

In recent studies, more attention is given to the role of oxidative stress in pathogenesis of

Nikšić et al:

The effect of body condition score of heifers in glucose and β -hydroxybutyrate concentrations and glutathione-peroxidase activity

different metabolic disturbances typical for peripartum period (*El Deeb and El Bahr*, 2017). It is considered that higher degree of β oxidation of fatty acids affect the increase production of free radicals. The glutathione peroxidase enzyme (GPx) has important role in antioxidative protection and it contains selenium in the form of selenocysteine in its own catalytic center (Forstrom et al., 1978). Glutathione peroxidase

is enzyme that reduces hydrogen peroxide and peroxides of free fatty acids protecting cells from oxidative damages.

Due to all previously mentioned, the aim of this study was to establish the effect of body condition on glucose and β -hydroxybutyrate levels in blood of heifers as well as GPx activity.

MATERIAL AND METHODS

With the aim to establish effect of body condition (BC) of heifers on glucose and β -hydroxybutyrate levels, as well as glutathione peroxidase activity, estimation of body condition was performed by Virginia system modified by Edmenson, using 1 to 5 scale (Edmenson, 1989). According to that, 23 heifers were classified in one of the two groups. First group (n=5) includes heifers with optimal body condition (BC=3.75), while the second group (n=18) includes obese heifers with the BC score ≥ 4.0 . Body condition scoring was performed 3 weeks before expected calving. In order to avoid variations related to the body condition estimation, scoring was performed by 4 persons simultaneously. Average age of calved heifers was 25.5 months.

Collecting and examination of blood samples of heifers was done from day 1 to day 10 after parturition. Blood was obtained by *v. coc-cigea media* puncture. Blood analyses were done using test strips on which blood drop was applied. Glucose and β -hydroxybutyrate concentrations were recorded on apparatus "FREESTYLE PRECISION NEO Blood Glucose and Ketone Monitoring system".

Glutathione peroxidase activity (GPx) from whole blood of cows was determined using

method described by Günzler et al. (1974) on spectrophotometer Cecil 2000. The principle of this measurement is based on spectrophotometric registration of NADPH utilization in coupled enzyme reaction. Method was obtained in a way that 500 μ l of potassium phosphate buffer, 200 μ l of glutathione (GSH), 50 μ l of glutathione reductase (GR), 10 μ l of whole blood hemolyzed with Drapckin reagent (21 time of dilution) and 490 μ l of redistilled water was added in mentioned order in each tube. Then a 10-minute pre-incubation in thermostat on 37°C was obtained, followed by addition of 200 μ l of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) and 550 μ l of tertial butylhydroperoxide (TBH). After addition of NADPH and TBH, tube content is poured into the cuvette. By placing of cuvette in spectrophotometer, utilization of NADP begins, and the absorbance is recorded in 30 seconds intervals at wavelength of 366 nm.

Solutions of GR, GSH and NADPH are always freshly prepared, with the usage of redistilled water as a solvent for GR and GSH. As a solvent for NADPH, 0.1 % NaHCO₃ was used. Composition and final concentrations of reagents are presented in Table 1.

Table 1. Composition and volume of reagents used for spectrophotometric determination of GPx activity

Reagents	Volumen (μ l)	Final concentration
Potassium phosphate buffer (400 mmol/L, pH 7)	500	100 mmol/l
GSH (604 mmol/L)	200	4 mmol/L
Gluthatione reductase (GR)	50	6 mmol/L
Whole blood (dilution. 21x)	10	0.375 U/mL
NADPH	200	0.3 mmol/L
TBH	550	1.575 mmol/L
Redestilated water	490	

Results obtained in this study are grouped in certain statistical series and processed using certain statistical methods in MS Excel 2007 program. Calculated mean (arithmetic mean – Xmean, relative measures of variability (coefficient of variation – Cv) and absolute measures of

variability (standard deviation – SD) were statistical methods that were used. Analyses of statistical significance were obtained by Student t-test. Obtained results are presented by figures.

RESULTS

Glucose, BHB concentrations and GPx activity were determined with the aim to compare results between heifers of optimal body condition and obese heifers.

By determination of glycemia, no significant difference was observed ($p=0.71$) between glucose concentration means obtained in heifers with optimal body condition and obese heifers (Figure 1).

In heifers with optimal body condition, mean value of glucose concentration was 3.16 ± 0.51 mmol/L with interval of values from 2.8-3.9 mmol/L and coefficient of variation 16%.

In obese heifers, mean value for glucose concentrations was 3.19 ± 0.66 mmol/L, with interval of values from 1.5-4.6 mmol/L and coefficient of variation 20%.

Nikšić et al:

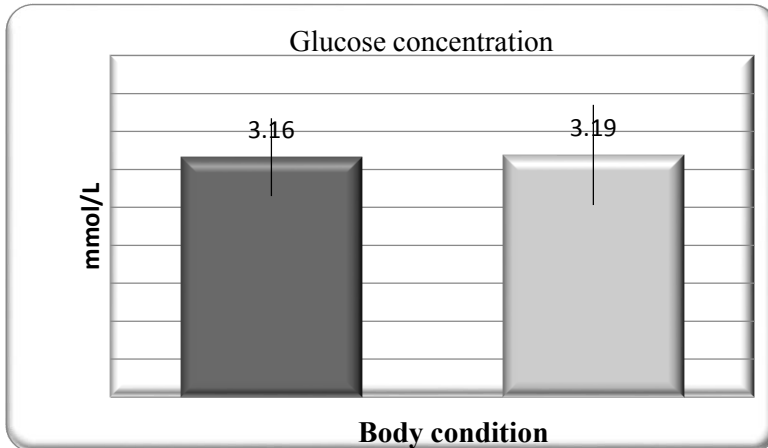
The effect of body condition score of heifers in glucose and β -hydroxybutirate concentrations and glutathione-peroxidase activity

Figure 1. Values of glucose concentrations in blood of heifers of optimal and increased body condition

In heifers with optimal body condition, mean value of BHB concentration was 0.4 ± 0.16 mmol/L, with interval of values from 0.2-0.6 mmol/L. In obese heifers, mean value for BHB concentrations was 0.67 ± 0.22 mmol/L, with interval of values from 0.4-1.1 mmol/L. By determining the statistically significant difference,

significant difference was established ($p=0.01$) between mean values of BHB concentrations in heifers with optimal body condition and obese ones. Obese heifers had significantly higher mean BHB values (Figure 2).

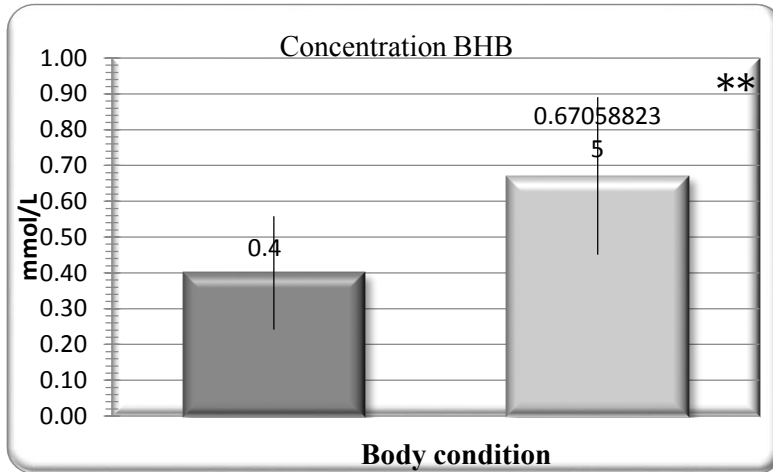


Figure 2. Values of β hydroxybutirate (BHB) concentrations in the blood of heifers of optimal body condition and increased body condition (** $p=0.01$)

In heifers with optimal body condition, average GPx activity was 326 ± 30 μ Kat/L, with intervals of values from 292-361 μ Kat/L. In obese heifers, average GPx activity was 423 ± 140 μ Kat/L, with intervals of values from 225-687 μ Kat/L.

By determining the statistically significant difference, significant difference was established ($p=0.02$) between average values of GPx activity of heifers with optimal body condition and obese heifers. In obese heifers, there was significantly higher GPx activity (Figure 3).

Nikšić et al:

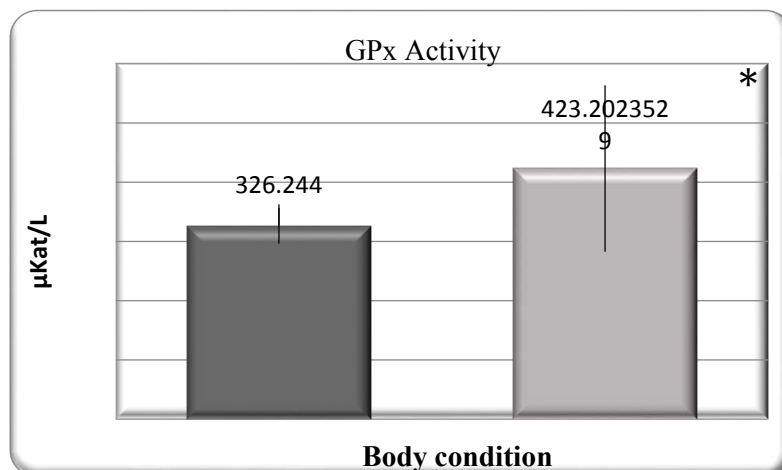
The effect of body condition score of heifers in glucose and β -hydroxybutyrate concentrations and glutathione-peroxidase activity

Figure 3. GPx activity in whole blood in heifers with optimal body condition and increased body condition (* $p=0.02$)

DISCUSSION

Ketosis is a common metabolic disturbance in high yielding dairy cows. Causes that contribute to the appearance of ketosis might include inadequate nutrition related to lactation phase, hormone disbalance, poor body condition, high milking and many others.

Body condition scoring is obtained in all phases of productive and reproductive cycles, and favorable score in calving period is 3.25-3.75. Over-conditioned cows in calving and early lactating period, characterized by negative energy balance, are more exposed to the risk of ketosis appearance, due to the release of free fatty acids and acetyl CoA deposition. In order to avoid these risks, it is necessary to maintain body condition of cows in certain range, meaning 3.25-3.75 at calving, 2.5-3.25 in early lactation, 2.5-3.5 in mid lactation, 3-3.5 in late lactation and 3.25-3.75 in dry period (Edmenson, 1989). As reported by Gillund et al. (2001), appearance of ketosis stage in obese cows after parturition is common. Based on our results, it is

rare and can be explained by lower milk production in first calving cows. Due to less milk production, negative energy balance is less pronounced than in cows who achieved maximum milking.

Danger of ketosis stage appearance increases with increased age of first calving cows. It is speculated that first calving cows younger than 20 months of age belong to group with the lowest risk. Since average age of examined heifers was 25.5 months, they can be classified in moderate risk group (Van Der Drift, 2013).

In animals with an optimal body condition, average glucose concentration value was 3.16 mmol/L, while in obese heifers was 3.19 mmol/L. Both values are within reference range that is 2.3-3.5 mmol/L (Stojić, 2010).

BHB value over 0.7 mmol/L two weeks after calving, combined with higher concentration of free fatty acids in blood, indicates on negative energy balance (Celeska et al., 2010). Values of BHB concentrations in examined heifers with

optimal body condition were within reference range, while in obese heifers, six animals (33.3%) had increased values. In this period, negative energy balance starts to develop, with consequently increased ketone body synthesis. In these 6 animals lower glucose concentration was also observed.

There is no data within available literature that related to relationship between ketone bodies level and glutathione peroxidase enzyme activity, as well as explanation for its increased activity in heifers with higher BHB levels. This result can indicate that studying oxidative stress and antioxidative capacity in animals with negative energy balance need more attention.

REFERENCES

1. Cincović M. (2013): *Patofiziološka procena peripartalnog metaboličkog stresa kod visokoproduktivnih krava upotrebom endokrinih i metaboličkih kriterijuma*. Doktorska teza, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
2. Celeska I., Ulčar I., Stojkovski V., Dovenski T., Mitrov D., Džadžovski I. (2010): *Effect of lactation on energy metabolism in dairy cows from different categories*. Mac Vet Rev 33(2):15–21.
3. Edmenson A.J., Lean I.J., Weaver L.D., Farver T., Webster G. (1989): *A body condition scoring chart for Holstein dairy cows*. Journal of Dairy Science 72:68–78.
4. El Deeb W.M., El Bahr S.M. (2017): *Biochemical Markers of Ketosis in Dairy Cows at Postparturient Period: Oxidative Stress Biomarkers and Lipid Profile*. Am J of Biochem Mol Biol 7(2): 86–90.
5. Forstrom J.W., Zakowski J.J., Tappel A.L. (1978): *Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine*. Biochemistry 17:2639–2644.
6. Gillund P., Reksen O., Grohn Y.T., Karlberg K.J. (2001): *Body Condition Related to Ketosis and Reproductive Performance in Norwegian Dairy Cows*. Dairy Sci 84:1390–1396.
7. Günzler W.A., Steffens G.J., Grossman A., Kim S.M.A., Otting F., Wendel A., Flohe L., (1974): *The aminoacid sequence of a bovine glutathione peroxidase*. Physiol Chem 365:195.
8. Mihailović M. i Jovanović I.B. (2007): *Biohemija*. Naučna KMD, Beograd.
9. Stojić V. (2010): *Veterinarska fiziologija*. Naučna KMD, Beograd.
10. Van Der Drift S.G.A. (2013): *Ketosis In Dairy Cows: Etiologic Factors, Monitoring, Treatment*. Dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, the Netherlands.

Article received: 13.11.2019.

Article accepted: 21.12.2019.

DOI 10.7251/VETJSR1902265K

UDK 582.572.2:633.88

*Originalni naučni rad*ANTIBAKTERIJSKA SVOJSTVA EKSTRAKTA BIJELOG LJILJANA (*Lilium candidum*)Vesna KALABA,¹ Željko SLADOJEVIĆ¹, Željka MARJANOVIĆ BALABAN,² Dragana KALABA³, Ivona PANIĆ¹

1 JU Veterinarski institut RS „Dr Vaso Butozan“ Banja Luka, Republika Srpska

2 Šumarski fakultet, Univerzitet Banja Luka, Republika Srpska

3 Medicinski fakultet – odsjek farmacija, Univerzitet Banja Luka, Republika Srpska

* Korespondentni autor: Doc.dr Vesna Kalaba: vesna.kalaba@virs-vb.com

Kratak sadržaj: Prirodni ekstrakti pravljeni od svježeg biljnog materijala i biološki aktivna jedinjenja izolovana iz različitih biljnih vrsta koje se već vijekovima koriste u narodnoj medicini mogu predstavljati dragocjene izvore za proizvodnju novih prirodnih konzervanasa i ljekovitih pripravaka. Bijeli ljiljan – *Lilium candidum* se takođe dugo koristi u tradicionalnoj medicini za liječenje opekotina i promrzlina, upale uha i nosa, kao melem za ispiranje rana i posjekotina. Korijen, listovi i cvjetovi imaju ljekovita svojstva, ali je malo podataka u literaturi o antibakterijskom dejstvu ekstrakta bijelog ljiljana na određene patogene i da se utvrdi opravdanost njegovog korištenja u tradicionalnoj medicini.

U radu je ispitana antibakterijska aktivnost ekstrakta bijelog ljiljana na pet referentnih kultura (*Escherichia coli* WDCM 00090, *Listeria monocytogenes* WDCM 00020, *Salmonella enterica* WDCM 00030, *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00024) i sedam bakterijskih kultura (*Escherichia coli*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas* spp. B-hemolitična *Escherichia coli*, koagulaza pozitivan stafilokok, *Staphylococcus aureus*, *Sreptococcus* grupe D) iz kolekcije Laboratorije za mikrobiologiju Veterinarskog instituta „Dr Vaso Butozan“ Banja Luka.

Rezultati rada su potvrdili da ekstrakt bijelog ljiljana pokazuje određenu antibakterijsku aktivnost prema ispitanim patogenima korištenim u ovom istraživanju. Antibakterijska aktivnost ekstrakta bijelog ljiljana se kretala u opsegu od 5,33 mm do 18,88 mm, zavisno od bakterijskog soja i koncentracije ekstrakta bijelog ljiljana.

Ključne riječi: *Lilium candidum*, antimikrobna aktivnost, ekstrakt bijelog ljiljana

UVOD

Upotreba biljaka u medicinske svrhe je široko rasprostranjena i danas, 30–40% svih medicinskih preparata sadrži jednu ili više bioaktivnih komponenti izolovanih iz biljaka. Sve se više pažnje posvećuje upotrebi prirodnih fitohemijskih komponenti koje posjeduju antimikrobna, antioksidativna, antifugalna, antivirusna, antikancerogena, antiinflamatorna i druga svojstva koja potpomažu u sprečavanju

nastanka i liječenja mnogih bolesti današnjice (Fahimi, 2015., Rai, 2013., Brochardt i sar., 2008).

Ljekovitost ljiljana je poznata od davnina i jako je cijenjena u narodnoj medicini. O korištenju ljiljanovog ulja u medicinske svrhe svjedoče brojni recepti iz elizabetanskog doba jer se smatralo da ljiljan ima magičnu moć i korišten je u liječenju groznice, kao sredstvo za

чишћење рана, те као облога у liječenju опекотина и чирева, али и за olakšavanje simptoma артритиса и реуме.

Крин–бијели љиљан (*Lilium candidum*) је вишегодишња биљка која може да нарасте у висину до 100 cm. Има карактеристичан мирис и прилично крупан бијели цвијет лјевкастог изгледа, широким и дугим латика. Због своје љепоте и карактеристичног мириса седи се као украсно биље у вртovima и парковима (Lesinger, 2016).

Lilium candidum садржи различите болошки активне компоненте које дјелују антиинфламаторно, антимутaгено, антиоксидативно, антиvirusно (Fahimi и сар., 2015., Lesinger, 2016; Eisenreichová и сар., 2004, Муцаји, 2007). Употреба љиљановог улја у традиционалној медицине је вјековна, али савремена медицина је дуго osporavala његова љековита својства. Експерименталне студије су ипак потврдиле нека љековита својства (Wang и сар., 2019., Fahimi и сар., 2015, Gao и сар., 2015, Zhang и сар., 2017).

Последњих двадесетак година, урађено је више студија које су испитивале садржај и својства *Lilium candidum*, као и његово позитивно/негативно дјеловање на организам (Wang и сар., 2019, Fahimi и сар., 2015, Zhao и сар., 2015, Bates, 2015, Kopaskova и сар., 2012, Huang, 2015).

Љиљан, односно његови цвијетови, листови и луквица су богати флавоноидима, гликозидима, оргaнским киселинама, азотним и стероидним спојевима, сапонинима, витамином C, танином, етарским улјим, док луквица садржи још горке материје, холин и фитостерол (Lesinger, 2016, Wang и сар., 2019, Eisenreichová и сар., 2004). Како ткива и екстракти биљака садрже јединjenja танина, за које се зна да реагују са протеинима коже, nanošenjem екстракта бијелог љиљана на

рану, опекотину, односно повријeдени или оболjели dio, танин реагује са протеинима, односно колaгеним влакнима и ствара се слој који штити ткиво од даљег развоја некрозе. (Fahimi и сар. 2019, Kovačević, 2004).

Екстракт бијелог љиљана у додиру са ћелијама, ткивима и микроорганизмима врло често испољава ефекат, односно побољшава/појачава способност организма да одговори на одређене физичке или хемијске учинаје тако што „ушисава” мање дозе истог или сличног агенса (Lesinger, 2016, Achary и сар., 2012).

Екстракт бијелог љиљана добија се maceracijom свјежих цвијетова у нерафинисаном маслиновом улју и познато је по свом антиинфламаторном дјеловању. Добро се раствара у алкохолу и ацетону, а слабије у оргaнским растварачима (Kopaskova и сар., 2012, Eisenreichová и сар., 2004). Екстракт бијелог љиљана се доста користи у фармацеутско-козметичкој индустрији због благотворног дјелства на кожу (поспјешује епителизацију). Такође се употребљава за liječenje различитих осипа, fleка, лишајева, psorijaze и екцема. Користи се за свакодневну његу зреле и суве коже, коже којој треба вратити тонус и одлична је заштита кожи у зимским данима (Lesinger, 2016, Huang и сар., 2015).

У доступној литератури је мало података о антибактеријском својству екстракта улја љиљана и због тога је циљ овога рада да се испитају антибактеријска својства екстракта љиљановог улја на одређене патогене и да се утврди његова оправданост коришћења у традиционалној (народној) медицине и да се утврди да ли дјелује бактерицидно или бактериостатски на испитане бактеријске културе.

Калаба и сар:

Антибактеријска својства екстракта бијелог љиљана (*Lilium candidum*)

MATERIJAL I METODE RADA

Kao sirovina za dobijanje ekstrakta ulja, korišteni su svježi cvjetovi sa prašnicima bijelog ljiljana *Lilium candidum*, uzorkovanog sa plantažnog uzgoja „Klindić”, Banja Luka, Republika Srpska.

Svježi cvjetovi sa prašnicima su potopljeni u staklenku napunjenu sa hladno cijede

maslinovim uljem u količini 1:3. Dobro zatvorena staklenka je držana 40 dana na suncu uz povremeno protresanje. Tako pripremljeno i odstajalo ulje je procijeđeno i čuvano je u tamnoj boci, zaštićeno od direktnog uticaja svjetlosti.

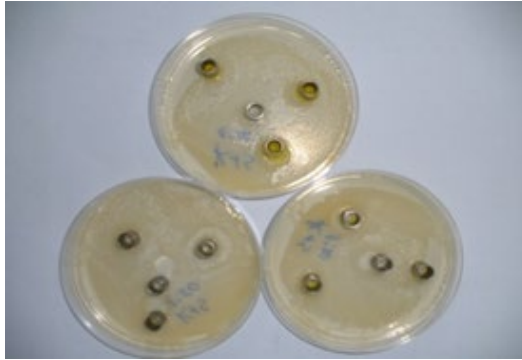
Ekstarakt bijelog ljiljana je pomiješan sa 96% alkoholom u koncentraciji: 1:2, 1:5 i 1:10.



Slika 1. Disk-difuzioni test

Za ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakta bijelog ljiljana, korišćene su referentne kulture *Escherichia coli* WDCM 00090, *Listeria monocytogenes* WDCM 00020, *Salmonella typhi* WDCM 00030, *Salmonella enterica* WDCM 00030, *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00024 (BCCM™/LMG BACTERIA COLLECTION, Belgium) i izolati iz kolekcije kultura Laboratorije za mikrobiologiju Veterinarskog instituta “Dr Vaso Butozan” Banja Luka: *Escherichia coli*, *Providencia*

stuartii, *Pseudomonas spp.*, β -hemolitična *Escherichia coli*, koagulaza pozitivan stafilocok, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus grupe D* (urin, bris grla, bris nosa, ljudi i životinja). Kulture su zasijane u hranjivom bujonu i inkubirane na 37°C/18h. Petri-ploče sa odgovarajućom podlogom (Müller–Hinton agar) su zasijane sa 0,1 ml bakterijske suspenzije čija je koncentracija 10⁵cfu/ml.



Slika 2. Očitavanje rezultata

Za ispitivanje dejstva ekstrakta bijelog ljiljana na inhibiciju rasta odabranih bakterijskih vrsta, korišćena je agar-difuziona metoda (Kirby-Bauer, 1996) na čvrstoj sterilnoj hranjivoj podlozi (Müller-Hinton agaru - MHA). Cilindri prečnika 9 mm su postavljeni na površinu čvrste hranjive podloge na koju je prethodno zasijana određena čista bakterijska kultura. U cilindre je mikropipetom nakapano 100 μ l određene količine (1:2; 1:5 i 1:10) ekstrakta i alkohola. Da bi se isključio uticaj maslinovog ulja na antibakterijsko djelovanje ekstrakta bijelog ljiljana kao kontrola, u cilindar je nakapano 100 μ l maslinovog ulja. Sposobnost rasta i razmnožavanja soja zavisi od njegove osjetljivosti na ispitivani ekstrakt, tako da se oko cilindra formira bistra prozirna zona u kojoj nema rasta mikroorganizama, ukoliko efekat postoji. Tako pripremljene ploče su držane 30

minuta na sobnoj temperaturi kako bi se omogućilo ravnomjerno difundiranje u podlogu, a onda su inkubirane na 37°C/24 časa.

Za svaki mikroorganizam i za svaku koncentraciju ekstrakta bijelog ljiljana, urađena su po tri ponavljanja, a rezultati su očitani kao prečnik zone inhibicije rasta i izraženi kao srednja vrijednost u milimetrima.

Da bi se vidjelo da li ekstrakt bijelog ljiljana ima baktericidnu ili bakteriostatsku moć, sa zona inhibicije je uziman mali komadić agara i dodavan u hranjivi bujon. Inkubacija je vršena na 37°C/24h. Ukoliko je nakon inkubacije došlo do zamućenja bujona, smatra se da je ulje djelovalo bakteriostatsko, odnosno, ukoliko je nakon inkubacije bujon ostao bistar, dejstvo ulja je baktericidno.

REZULTATI I DISKUSIJA

U radu je ispitana antibakterijska aktivnost ekstrakta bijelog ljiljana na pet referentnih i sedam bakterijskih kultura izolovanih iz kliničkog materijala. Rezultati koji su dobijeni prikazani su tabelarno i grafički (Tabela 1. i Grafikon 1.).

Rezultati istraživanja su pokazali da je ulje ekstrakta bijelog ljiljana ispoljilo antibakterijsko djelovanje na sve testirane bakterijske vrste, a intenzitet djelovanja je različit i kretao se u opsegu od 5,33 mm do 18,33 mm.

Табела 1. Зоне инхибиције раста тестираних бактеријских врста остварене са различитим концентрацијима екстракта улја бијелог љилјана и етанола

Микроорганизам	Екстракт бијелог љилјана : етанол			
	Екстракт	1:2	1:5	1:10
<i>Salmonella typhi</i> WDCM 00031	12,00±2,65	13,00±6,08	9,33±2,31	14,33±5,51
<i>Salmonella enterica</i> WDCM 00030	11,66±1,53	15,00±0,00	14,66±5,03	16,66±7,23
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00090	13,00±1,00	18,33±2,89	16,66±2,89	12,33±3,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00024	7,00±0,00	10,33±4,04	5,33±4,62	14,33±6,03
<i>Listeria monocytogenes</i> WDCM 00020	11,66±1,53	16,66±5,77	13,33±5,77	8,33±7,64
<i>Pseudomonas spp</i>	7,66±1,15	6,66±5,77	8,66±1,15	12,33±0,58
<i>Escherichia coli</i>	8,66±1,15	6,33±5,51	6,66±5,77	18,33±5,69
β хемолитична <i>Escherichia coli</i>	14,66±0,58	18,00±2,65	18,33±5,77	14,00±1,73
<i>Streptococcus</i> групе D	11,00±7,73	10,00±2,00	13,00±2,00	15,66±4,04
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,66±1,15	8,00±0,00	11,00±3,61	13,00±2,65
Коагулаза позитивни стафилокок	7,33±0,58	8,00±0,00	7,66±7,51	9,00±1,00
<i>Providencia stuartii</i>	7,66±0,58	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00

Приказане вриједности дате су у мм и представљају средњу вриједност зона инхибиције за три мјерења

Екстракт бијелог љилјана је показао најјачу антибактеријску активност према β - хем. *E. coli* са зonom инхибиције од 14,00 мм до 18,33 мм и нешто слабијим инхибиторним дејством према референтном соју *E. coli* са зonom инхибиције од 12,33 мм до 18,33 мм, док је према *E. coli* (клинички изолат) најјаче дјеловао у комбинацији са алкохолном 1:10 са зonom инхибиције 18,33 мм. Такође, потребно је истаћи јаће антибактеријско дјеловање екстракта и алкохола у концентрацији 1:10 на *P. aeruginosa* референтни (14,33 мм) и клинички изолат (12,33 мм).

Најманју или најслабију антибактеријску активност екстракт бијелог љилјана је исполјио према клиничким изолатима коагулаза позитиван стафилокок (зона инхибиције 7,33 мм до 9,00 мм)

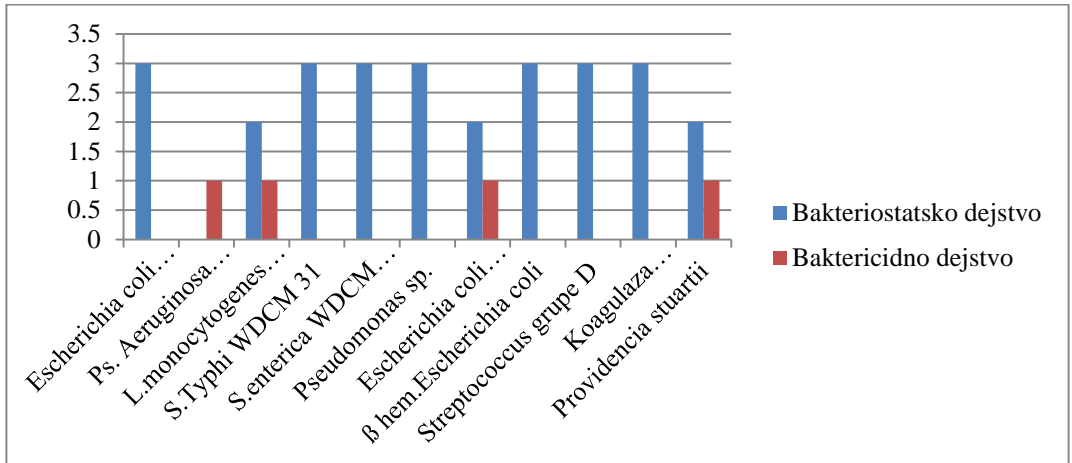
и *Providencia stuartii* (7,66 мм до 8,00 мм) у свим комбинацијима, што се може објаснити различитом растворљивошћу екстракта бијелог љилјана и његових компоненти. Хидрофобност је важна карактеристика етеричних улја и екстраката јер повећава пропустљивост ћелијске мембране бактерије и омогућава лакши пролазак компоненти у њен липидни слој. Промјена пропустљивости ћелијске мембране, обично је праћена губитком осмотске контроле ћелије, што се сматра основним принципом антимикубног дјеловања екстракта и етеричних улја (Бајпаи и сар., 2012, Бубонја и сар., 2008). Због различите растворљивости антибактеријских компоненти у води, примјенјују се различите методе испитивања антибактеријске активности. У раду је коришћена диск-дифузиона метода која у потпуности зависи од хидрофобности активних компоненти и брзине њихове дифузије кроз агар (Бубонја и сар., 2008).

Najnovija istraživanja u oblasti hemije, biohemije i medicine potvrđuju da ekstrakti biljaka sadrže fenolne kiseline, flavone, izoflavone, flavanole, katehine, tokoferole, tanine, terpene, te da pokazuju antimikrobna, antineoplastična, antiviralna, antiinflamatorna, antialergijska i antioksidativna svojstva (Wang i sar., 2019, Al-Bayati, 2018, Jia, 2015, Li i sar., 2018, Jin i sar., 2014, Han i Xie, 2013, Javed i sar., 2012, Lu i sar., 2013). Fenolne komponente toksično djeluju na mikroorganizme, a mehanizam djelovanja obuhvata inhibiciju oksidovanih komponenti, kao i moguću reakciju sa sulfhidrilnim grupama kroz više nespecifičnih reakcija sa proteinima. Polifenolna jedinjenja se akumuliraju uglavnom u ćelijskim zidovima i to najvećim dijelom na površini ploda (epidermalni i subepidermalni slojevi), jer biosinteza ovih jedinjenja zavisi od svjetlosti (Marzio i sar., 2011, Pjanović i sar. 2010., Rai, 2013).

Rezultati ovog rada ukazuju na antibakterijski potencijal ekstrakta bijelog ljiljana i u skladu su sa rezultatima drugih istraživača koji su se bavila istraživanjem ekstrakata biljaka (Fahimi i sar., 2015, *Patočka i Navratilova*, 2019, Devi i sar., 2016, Capasso i sar., 2005, Wang i sar., 2012, Matejić i sar., 2012, Sedighinia, 2012), ali i autora koji su se bavili ispitivanjem hemijskog sastava i antimikrobnog djelovanja eteričnog ulja ljiljana (Fahimi i sar. 2015, Wong i sar., 2019, Bates i sar., 2015, Achary i sar., 2012, Yarmolinsky i sar., 2009).

Da bi se vidjelo da li ekstrakt bijelog ljiljana ima baktericidnu ili bakteriostatsku moć, sa zona inhibicije je uziman mali komadić agara i dodavan u hranjivi bujon.

Na Grafikonu 1. je radi bolje preglednosti prikazan tip djelovanja ekstrakta bijelog ljiljana.



Grafikon 1. Prikaz djelovanja ekstrakta bijelog ljiljana na testirane mikroorganizme

Antibakterijska aktivnost ekstrakta bijelog ljiljana i njegovih komponenti može da varira od djelimične do potpune inhibicije rasta bakterija, tako da bakteriostatsko djelovanje ekstrakta bijelog ljiljana potvrđuje tu činjenicu. Samo u četiri slučaja ekstrakt bijelog ljiljana je djelovao baktericidno.

ZAKLJUČAK

Rezultati ovog rada su potvrdili određeni antibakterijski potencijal ekstrakta bijelog ljiljana na sve testirane bakterijske sojeve, ali u različitom opsegu.

-Najbolju antibakterijsku aktivnost ekstrakt bijelog ljiljana je ispoljio prema kliničkom izolatu β -hemolitična *Escherichia coli* sa zonom inhibicije od 14,66 mm do 18,33 mm.

-Slabiju antibakterijsku aktivnost ekstrakt bijelog ljiljan je ispoljio prema kliničkim izolatima *Providencia stuartii*, sa zonom inhibicije, od 7,66 mm do 8,00 mm u svim kombinacijama i koagulaza

pozitivnom stafilocoku, sa zonom inhibicije od 7,33 mm do 9,00 mm.

-Najslabiju antibakterijsku aktivnost ekstrakt bijelog ljiljana je ispoljio prema *P. aeruginosa* u kombinaciji ekstrakt: etanol 1:5 (5,33mm), zatim prema *E. coli* (6,33 mm) i *Pseudomonas spp* (6,66 mm), u kombinaciji ekstrakt:etanol 1:2.

Danas postoji sigurna tendencija vraćanju prirodi i ovaj rad predstavlja samo uvod u buduća klinička i laboratorijska istraživanja i podstrek vraćanju primjeni biljnih preparata u liječenju različitih oboljenja ljudi i životinja.

LITERATURA

1. Achary V.M.M., Panda B.B. (2012): *Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates*. Mutagenesis 2010, 25, 201–209. Molecules, 17 95
2. Al-Bayati N. (2018): *Antiproliferative Activity of Lilium candidum Alkaloid Extract on Human Breast Cancer Cell Line*. J Pharm Sci Res 10(8): 2014–2016.
3. Bajpai V.K., Baek K.H., Kang S.C. (2012): *Control of Salmonella in food by using essential oils: A review*. Food Research International, vol. 45. 722–734
4. Bates N. (2015): *Lily toxicity in cats*. Feline Focus 1(9): 333–337.
5. Brochardt J., Weyse D., Sheaffer C., Kauppi K., Fulcher G., Ehlke N., Biesboer D., Bey R. (2008): *Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin*. Journal of Medicinal Plants Research 2 (5): 98–110
6. Bubonja M., Mesarić M., Miše A., Jakovac M., Abram M. (2008): *Uticaj različitih čimbenika na rezultate testiranja osjetljivosti bakterija disk difuzijskom metodom*. Medicina 2008, Vol.44, No. 3–4, 280–284
7. Capasso F., Gaginella T.S., Grandolini G., Izzo A.A. (2005): *Fitoterapija – Priručnik biljne medicine*. Prometej, Novi Sad.
8. Devi N.I, Kumar S.N., Rajaram C. (2016): *Evaluation of hepatoprotective activity of Lilium candidum L. in experimental animal models*. World J Pharmaceu Res 5(12): 725–749.
9. Eisenreichová E., Haladová M.; Mučaji P., Grančai D. (2004): *The study of constituents of Lilium candidum L*. Acta Facult. Pharm. Univ. Comen. 51, 27–37.
10. Fahimi Sh., Hajimehdipoor H., Abdollahi M., Mortazavi S.A. (2015): *Burn healing plants in Iranian Traditional Medicine*. Research Journal of Pharmacognosy (RJP) 2(1), 2015: 53–68

11. Jie G., Zhang T., Jin Z.Y., Xu X.M., Wang J.H., Zha X.Q., Chen H.Q. (2015): *Separation, Purification, Structure Identification and Hypoglycemic Activity of Polysaccharides From Lilium lancifolium*. Food Chemistry, Vol. 169, 430-438
12. Han H., Xie H.C. (2013): *A study on the extraction and purification process of lily polysaccharide and its anti-tumor effect*. African J Trad Compl Allter Med 10(6): 485–489.
13. Huang W. T.T, Zhang H.H. Y., Xli H. Li (2015): *Role of effective composition on antioxidant, anti-inflammatory, sedative-hypnotic capacities of 6 common edible Lilium varieties*. J. Food Sci., 80 (4) pp. H857–H868
14. Javed S., Shoaib A., Mahmood Z., Mushtaq S., Iftikhar S. (2012): *Analysis of phytochemical constituents of Eucalyptus citriodora L. responsible for antifungal activity against post-harvest fungi*. Nat. Prod. Res. 26, 1732–1736.
15. Jia (2015): *Lily' Proliferation Inhibition on Human Gastric Cancer cell Lines SGC-7901 and Discussion of Functional Mechanism*. Yan'an University
16. Jiao H.L., Zhang Y.L., Niu L.X. (2015): *Phenolic composition and antioxidant activity of polyphenols from bulbs of Lilium lancifolium*. Thunb J. Northwest A & F Univ. (Nat. Sci. Ed.), 43 (7), pp. 150–154
17. Jin L., Zhang Y.L., Niu L.X., Luo J.R. (2014): *Antioxidant activity of polyphenolic compounds in bulbs of three Lilium species*. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 34 (5) pp. 995–1001
18. Kirby-Bauer A. (1996): *Antimicrobial sensitivity testing by agar diffusion method*. J Clin Pathol, 44:493
19. Kopaskova M., Hadjo L., Yankulova B., Jovtchev G., Galova E., Sevcovicova A., Mucaji P., Miadokova E., Bryant P., Chankova S. (2012): *Extract of Lillium candidum L. Can Modulate the Genotoxicity of the Antibiotic Zeocin*. Molecules 17,80–97 www.mdpi.com/journal/molecules
20. Lesinger Ivan (2016): *Ljiljan, cvijet omiljenog mirisa ima i snažna ljekovita svojstva* <https://living.vecernji.hr/zeleno-zona/prekrasni-ljiljan-ima-i-brojna-ljekovita-svojstva> 1074739
21. Li L., Liu X.D., Zhan J.H., Luo J.H., Yuan L.M., Zhou Z.Y., Chen X.J.N.H. (2018): *A study on the antitumor activity of chemical constituents from Lilium lancifolium thunb.* J. Hunan Univ. Chin. Med., 38 (10), pp. 46-49
22. Lu M., Han Z., Yao L. (2013): *In vitro and in vivo antimicrobial efficacy of essential oils and individual compounds against Phytophthora parasitica var. nicotianae*. J. Appl. Microbiol. 115
23. Marzio L.D, Marianecchi C., Petronea M., Rinaldib F., Carafab M. (2011): *Novel pH sensitive non-ionic surfactant vesicles: comparison between Tween 21 and Tween 20*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces: 82 (1),18–24.
24. Matejić J., Džamić A., Mihajilov-Krstev T., Randelović V., Krivošej Z., Marin P. (2012): *Total phenolic content, flavonoid concentration, antioxidant and antimicrobial activity of methanol extracts from three Seseli L. taxa*. Cent. Eur. J. Biol., 7(6), 1116–1122.
25. Mucaji P., Haladová M., Eisenreichová E., Šeršenň F., Ubik K., Grančai D. (2007): *Constituents in Lilium candidum L. and their antioxidative activity*. Ceska Slov Farm. Jan;56(1):27-29.
26. Patocka J., Navratilova Z. (2019): *Bioactivity of Lilium candidum L.* Biomedical Journal of Scientific & Technical Research June, 2019, Volume 18, 5, pp 13859-13862 DOI: 10.26717/BJSTR.2019.18.003204

Калаба и сар:

Антибактеријска својства екстракта бијелог љиљана (*Lilium candidum*)

27. Pjanovic R., Bosković-Vragolović N., Veljković-Giga J, Garić-Grulović R., Pejanović S., Bugarški B. (2010): *Diffusion of drugs from hydrogels and liposomes as drug carriers*. J. Chem. Technol. Biot. 85:693-698.
28. Rai A. (2013): *The antiinflammatory and antiarthritic properties of ethanol extract of Hedera helix*. Indian J Pharm Sci., 75(1): 99–102.
29. Sedighinia F., Afshar A.S., Soleimanpour S., Zarif R., Asili J., Ghazvini K. (2012): *Antibacterial activity of Glycyrrhiza glabra against oral pathogens: an in vitro study*. American Journal of Physiology 2.(3):1
30. Wang P., Li J., Attia F.A.K., Kang W., Wei J., Liu Z., Li C. (2019): *A critical review on chemical constituents and pharmacological effects of Lilium*. Food Science and Human Wellness, 8 (4), 330–336
31. Wang P., Su Z., Yuan W., Deng G., Li S. (2012): *Phytochemical constituents and pharmacological activities of Eryngium L. (Apiaceae)*. Pharmaceut. Crop., 3, 99–120.
32. Yarmolinsky L., Zaccai M., Ben-Shabat S., Mills D., Huleihel M. (2009): *Antiviral activity of ethanol extracts of Ficus benjamina and Lilium candidum in vitro*. New Biotechnol., 26, 307–313.
33. Zhang H.Q., Yan H., Qian D.W. (2017): *Analysis and evaluation of eight active ingredients in Lilium lancifolium from different regions China*. J. Chin. Mater. Med., 42 (2) , pp. 311–318
34. Zhao Q.Y., Ai Y.F., Wang A.H., Wang J.Z., Wang Y.M. (2015): *Depressant effects of Lilium lancifolium on human pulmonary adenocarcinoma cell line A549 in vitro*. Shanxi J. Tradit. Chin. Med., 36 (4), pp. 497–499

Рад примљен: 08.11.2019.

Рад прихваћен: 23.11.2019.

DOI 10.7251/VETJEN1902274K

UDK 582.572.2:633.88

*Original scientific paper*ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF WHITE LILY (*Lilium candidum*) EXTRACTVesna KALABA^{1*}, Željko SLADOJEVIĆ¹, Željka MARJANOVIĆ BALABAN,² Dragana KALABA³, Ivona PANIĆ¹¹Public Veterinary Institute of Republic of Srpska "Dr. Vaso Butozan", Banja Luka, Republic of Srpska²Faculty of Forestry, University of Banja Luka, Republic of Srpska³Faculty of Medicine - Department of Pharmacy, University of Banja Luka, Republic of Srpska

*Corresponding author: Doc.dr Vesna Kalaba: vesna.kalaba@virs-vb.com

Abstract: Natural extracts made from fresh plant material and biologically active compounds isolated from different plant species that have been used in folk medicine for centuries, may present valuable sources for production of novel natural preservatives and medicinal preparations. White lily-*Lilium candidum* is also used, for a long period of time, in folk medicine for healing of burns and frostbites, otitis and rhinitis as well as balm for washing wounds and cuts. Roots, leaves and flowers have medical properties. Nevertheless, there is little information in literature related to antibacterial effect of white lily extract on certain pathogens and there is a need to determine the justification for its use in traditional medicine.

Antibacterial activity of White lily extract on five reference cultures (*Escherichia coli* WDCM 00090, *Listeria monocytogenes* WDCM 00020, *Salmonella enterica* WDCM 00030, *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00024) and seven bacterial cultures (*Escherichia coli*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas* spp. β -hemolytic *Escherichia coli*, coagulase positive staphylococcus, *Staphylococcus aureus*, group D *Sreptococcus*) from Laboratory for Microbiology, Public Veterinary Institute of Republic of Srpska "Dr. Vaso Butozan", Banja Luka, were examined in this study. Results confirmed that white lily extract show certain antibacterial activity against examined pathogens used in this study. Antibacterial activity of White lily extract was in the range from 5.33 mm to 18.88 mm depending of bacterial strain and concentration of white lily extract.

Key words: *Lilium candidum*, antimicrobe activity, White lily extract

INTRODUCTION

Plant usage for medical purposes is widespread and nowadays 30-40% of all medical preparations contain one or more plant isolated bioactive components. More attention is given to usage of natural phitochemical components that own antimicrobial, antioxidative, antifungal, anticarcinogen, antiinflammatory and other properties that support prevention and therapy of many current diseases (Fahimi, 2015, Rai, 2013, Brochardt et al., 2008).

The healing properties of White lily is known for long period of time and is very appreciated in folk medicine. Numerous prescriptions from the Elizabethan era testify about usage of Lily's oil for medical purposes, since it was believed that Lily has magical power and was used in fever healing, as a balm for washing wounds as well as lining in treatment of burns and ulcer, but also for relieving symptoms of arthritis and rheumatism.

White lily (*Lilium candidum*) is a perennial plant that may grow up to 100 cm in high. It has characteristic smell and pretty big white funnel shaped flower with wide and long petals. Because of its beauty and specific smell, it is planted as ornamental plant in gardens and plants (Lesinger, 2016).

Lilium candidum contains different biologically active components which act antimflammatory, antimutagenic, antioxidative, antiviral (Fahimi et al., 2015, Lesinger, 2016, Eisenreichová et al., 2004, Mucaji, 2007). Usage of lily's oil in traditional medicine lasts for centuries, but modern medicine have disputed its medical properties for a long time. Nevertheless, experimental studies have confirmed some medical properties (Wang et al., 2019, Fahimi et al., 2015, Jie et al., 2015, Zhang et al., 2017).

Several studies that examined content and characteristics of *Lilium candidum*, as well as its agenspositive/negative effects on organism, have been obtained during last twenty years (Wang et al., 2019, Fahimi et al., 2015, Zhao et al., 2015, Bates, 2015, Kopaskova et al., 2012, Huang, 2015).

Lily, i.e. its flowers, leaves and bulb, are rich in flavonides, glikosamides, organic acids, nitrogen and steroid compounds, saponines, vitamin C, tanine, eteric oils, while bulb additionally contains bitter matters, holing and phytosterol (Lesinger, 2016, Wang et al., 2019, Eisenreichová et al., 2004). As plant tissues and extracts contain tannin compounds, for which is known to react with skin proteins, by applying the White lily extract on skin, burn, i.e. injured

or diseased part, tannin reacts with protein, i.e. collagen fibers and creates a layer that protects tissue from further development of necrosis (Fahimi et al. 2019, Kovačević, 2004).

In contact with cells, tissues and microorganisms, White lily extract exerts an effect i.e. improve/amplify ability of organism to respond to certain physical and chemical impacts in a way to "vacuum" smaller doses of the same or similar agent (Lesinger, 2016, Achary et al., 2012).

White lily extract is obtained by maceration of fresh flowers in unrefined olive oil and is known for its anti-inflammatory effect. It is dissolved well in alcohol and acetone, and not so well in organic solvents (Kopaskova et al., 2012, Eisenreichová et al., 2004). White lily extract is quite used in pharmaceutical-cosmetic industry due to its beneficial effect on skin (improved epitelisation). It is also used for treatment of various rashes, strains, lichens, psoriasis and eczema. It is also used for everyday care of mature and dry skin, skin that needs to be revitalized and is excellent protector of skin during winter days (Lesinger, 2016, Huang et al., 2015).

There is little data in available literature related to antibacterial properties of Lily oil extract and due to that the aim of this study is to examine antibacterial properties of Lily oil extract on certain pathogens and to establish justification of its usage in traditional (folk) medicine and to establish whether it has a bactericidal or bacteriostatic action on examined bacterial cultures.

MATERIAL AND METHODS

Fresh flowers with ferns of White lily *Lilium candidum*, sampled from plantation "Klindić", Banja Luka, Republic of Srpska, were used as raw material for production of oil extract. Fresh flowers with ferns are immersed in a jar filled with cold pressed olive oil in quantity 1:3. Well

closed jar is kept on sunlight for 40 days, with occasional shaking. Prepared and for a while kept oil is filtered and kept in dark bottle protected from direct impact of sunshine. White lily extract is mixed with 96% alcohol in concentrations: 1:2, 1:5 and 1:1



Picture 1. Disk diffusion test

For examination of antibacterial activity of White lily extract reference culture *Escherichia coli* WDCM 00090, *Listeria monocytogenes* WDCM 00020, *Salmonella typhi* WDCM 00030, *Salmonella enterica* WDCM 00030, *Pseudomonas aeruginosa* WDCM 00024 (BCCM™/LMG BACTERIA COLLECTION, Belgium) were used and isolated from culture collection of Laboratory for Microbiology of Veterinary Institute “Dr Vaso Butozan“ Banja

Luka: *Escherichia coli*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas spp.*, β -hemolytic *Escherichia coli*, coagulase positive staphylococcus, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus group D* (urine, throat swab, nasal swab, humans and animals). Cultures were seeded in nutrition broth and incubated on 37°C/18h. Petri dishes with adequate media (Müller - Hinton agar) were seeded with 0.1 ml of bacterial suspension whose concentration was 10⁵cfu/ml.



Picture 2. Reading the results

For examination of White lily extract on growth inhibition of selected bacterial species, agar diffusion method was used (Kirby-Bauer,

1996) on solid sterile nutrition broth (Müller-Hinton agar - MHA). Cylinders with 9 mm diameter were settled on solid culture media

surface which was previously seeded by certain pure bacterial culture. In cylinders, 100 µl of certain quantity (1:2; 1:5 i 1:10) of extract and alcohol was pured, drop by drop by micropipete. To eliminate impact of olive oil on antibacterial effect of White lily extract, as control, drop by drop 100 µl of olive oil was pured in cylinders. Capability of growth and reproduction of strain depends on its sensitivity to examined extract, so clear transparent zone without microorganism growth is formed around cylinder if effect exists. Prepared plates were kept on room temperature for 30 minutes in order to provide evenly diffusion in media, and then were incubated on 37°C/24 hours.

For each microorganism and for each concentration of White lily extract three repetitions were obtained, and results were read as diameter of growth inhibition zone and presented as average in millimeters.

In order to see if White lily extract has bactericide or bacteriostatic power, little piece of agar was taken from inhibition zone and added to nutrition broth. Incubation was obtained on 37°C/24h. If broth was turbid after incubation, it is considered that oil had bacteriostatic effect, i.e., if broth stayed cleared after incubation, oil had bactericide effect.

RESULTS AND DISSCUSION

Antibacterial activity of of White lily extract on five reference and seven bacterial cultures isolated from clinical materials was examined in this study. Obtained results are presented by tables and figures (Table 1. and Figure 1.).

Obtained results indicate that White lily extract oil perform antibacterial activity on all tested bacterial species, and intensity of action differed and ranged from 5.33 to 18.33 mm.

Table 1. Growth inhibition zone of tested bacterial species realized with different concentrations of White lily extract oil and ethanol

Microorganism	White lily extract : ethanol			
	Extract	1:2	1:5	1:10
<i>Salmonella typhi</i> WDCM 00031	12.00±2.65	13.00±6.08	9.33±2.31	14.33±5.51
<i>Salmonella enterica</i> WDCM 00030	11.66±1.53	15.00±0.00	14.66±5.03	16.66±7.23
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00090	13.00±1.00	18.33±2.89	16.66±2.89	12.33±3.06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00024	7.00±0.00	10.33±4.04	5.33±4.62	14.33±6.03
<i>Listeria monocytogenes</i> WDCM 00020	11.66±1.53	16.66±5.77	13.33±5.77	8.33±7.64
<i>Pseudomonas spp</i>	7.66±1.15	6.66±5.77	8.66±1.15	12.33±0.58
<i>Escherichia coli</i>	8.66±1.15	6.33±5.51	6.66±5.77	18.33±5.69
β hemolytic <i>Escherichia coli</i>	14.66±0.58	18.00±2.65	18.33±5.77	14.00±1.73
<i>Streptococcus</i> group D	11.00±7.73	10.00±2.00	13.00±2.00	15.66±4.04
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.66±1.15	8.00±0.00	11.00±3.61	13.00±2.65
Coagulase positive staphylococcus	7.33±0.58	8.00±0.00	7.66±7.51	9.00±1.00
<i>Providencia stuartii</i>	7.66±0.58	8.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00

Showed values are given in mm and present average value of inhibition zone for three measurements. White lily extract showed the highest antibacterial activity towards β hemolytic *E. coli* with inhibition zone from 14.00 mm to 18.33 mm and something less intensive inhibitory effect towards reference *E. coli* strain with inhibition zone from 12.33 mm to 18.33 mm, while it affected *E. coli* (clinical isolate) mostly in combination with alcohol 1:10 with inhibition zone 18.33 mm. Also, it is important to emphasize that there was stronger antibacterial effect of extract and alcohol in concentration 1:10 on *P. aeruginosa* reference (14.33 mm) and clinical isolate (12.33 mm).

White lily extract showed lowest or the weakest antibacterial activity towards clinical isolates of coagulase positive staphylococcus (inhibition zone 7.33mm to 9.00 mm) and *Providencijsa stuartii* (7.66 mm to 8.00 mm) in all combinations, that can be explained by different solubility of White lily extract and its components. Hydrophobicity is important characteristic of eteric oils and extracts since it increases bacterial cell membrane permeability and provides easier passage of components within its lipid layer. Altered permeability of cell membrane is usually associated with the loss of cell osmotic control, which is considered as fundamental principle of antimicrobial action of extracts and eteric oils (Bajpai et al., 2012, Bubonja et al., 2008). Because of different solubility of antibacterial components in water, different methods of examination of antibacterial activities are used. In this study, disk diffusion method which totally depends on hydrophobicity of the active components and the rate of their diffusion through the agar, was used (Bubonja et al., 2008).

The latest studies in the field of chemistry, biochemistry and medicine confirm that plant extracts contain phenolic acid, flavones, isoflavones, flavanols, catechins, tocopherols, tannins, terpenes and to show antimicrobial, antineoplastic, antiviral, antiinflammatory, antiallergic and antioxidant properties (Wang et al., 2019, Al-Bayati, 2018, Jia, 2015, Li et al., 2018, Jin et al., 2014, Han and Xie, 2013, Javed et al., 2012, Lu et al., 2013). Phenol components have toxic effect on microorganisms, and mechanism of action includes inhibition of oxidized components, as well as possible reaction with sulfhydryl groups through more non specific reactions with proteins. Polyphenolic compounds are accumulated mainly in cell walls and mostly on yield's surface (epidermal and subepidermal layers), since biosynthesis of these compounds is light dependent (Marzio et al., 2011, Pjanović et al. 2010, Rai, 2013).

Results of this study indicate on antibacterial potency of White lily extract and are in accordance with results of other researchers who studied plant extracts (Fahimi et al., 2015, Patocka and Navratilova, 2019, Devi et al., 2016, Capasso et al., 2005, Wang et al., 2012, Matejić et al., 2012, Sedighinia, 2012), but also with those who examined chemical composition and antimicrobial effect of Lily eteric oil (Fahimi et al. 2015, Wong et al., 2019, Bates et al., 2015, Achary et al., 2012, Yarmolinsky et al., 2009).

In order to resolve whether White lily extract has bactericide or bacteriostatic power, little piece of agar was taken from inhibition zone and added in nutrition broth.

For better presentation, type of action of White lily extract is presented on Figure 1.

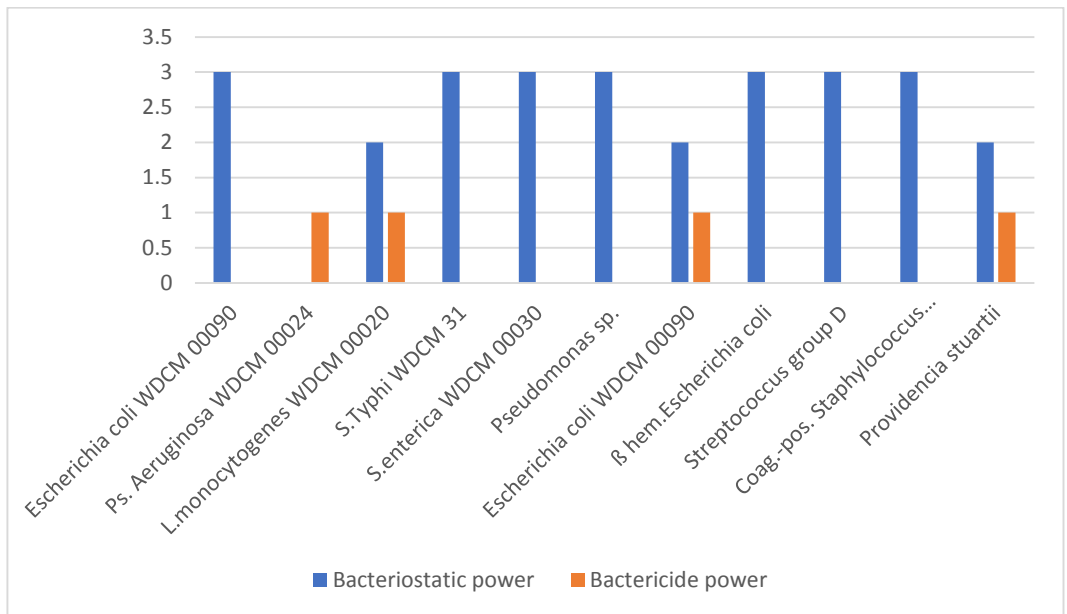


Figure 1. Presentation of White lily extract action on tested microorganisms

Antibacterial activity of White lily extract and its components may vary from partial to total inhibition of bacterial growth, so that

bacteriostatic action of White lily extract confirm that fact. Only in four cases White lily extract had bactericide effect.

CONCLUSION

Results of this study confirmed certain antibacterial potency of White lily extract on all tested bacterial strains, but in different range.

-White lily extract showed best antibacterial activity towards clinical isolate β-hemolytic *Escherichia coli* with inhibition zone from 14.66 mm to 18.33 mm.

-White lily extract showed weaker antibacterial activity towards clinical isolates *Providencia stuartii*, with inhibition zone from 7.66 mm to 8.00 mm in all combinations and coagulase positive

staphylococcus with inhibition zone from 7.33 mm to 9.00 mm.

-White lily extract showed weakest antibacterial activity towards *P. aeruginosa* in combination extract: ethanol 1:5 (5.33mm), then towards *E.coli* (6.33 mm) and *Pseudomonas* spp (6.66 mm) in combination extract: ethanol 1:2.

Nowadays, there is a certain tendency for returning to nature and this study presents only introduction in further clinical and laboratory examinations and stimulus for plant preparations usage in treatments of different diseases in humans and animals.

REFERENCES

1. Achary V.M.M., Panda B.B. (2012): *Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates*. Mutagenesis 2010, 25, 201–209. Molecules, 17 95
2. Al-Bayati N. (2018): *Antiproliferative Activity of Lilium candidum Alkaloid Extract on Human Breast Cancer Cell Line*. J Pharm Sci Res 10(8): 2014–2016.
3. Bajpai V.K., Baek K.H., Kang S.C. (2012): *Control of Salmonella in food by using essential oils: A review*. Food Research International, vol. 45. 722–734
4. Bates N. (2015): *Lily toxicity in cats*. Feline Focus 1(9): 333–337.
5. Brochardt J., Weyse D., Sheaffer C., Kauppi K., Fulcher G., Ehlke N., Biesboer D., Bey R. (2008): *Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin*. Journal of Medicinal Plants Research 2 (5): 98–110
6. Bubonja M., Mesarić M., Miše A., Jakovac M., Abram M. (2008): *Uticaj različitih čimbenika na rezultate testiranja osjetljivosti bakterija disk difuzijskom metodom*. Medicina 2008, Vol.44, No. 3–4, 280–284
7. Capasso F., Gaginella T.S., Grandolini G., Izzo A.A. (2005): *Fitoterapija – Priručnik biljne medicine*. Prometej, Novi Sad.
8. Devi N.I., Kumar S.N., Rajaram C. (2016): *Evaluation of hepatoprotective activity of Lilium candidum L. in experimental animal models*. World J Pharmaceu Res 5(12): 725–749.
9. Eisenreichová E., Haladová M.; Mučaji P., Grančai D. (2004): *The study of constituents of Lilium candidum L.* Acta Facult. Pharm. Univ. Comen. 51, 27–37.
10. Fahimi Sh., Hajimehdipoor H., Abdollahi M., Mortazavi S.A. (2015): *Burn healing plants in Iranian Traditional Medicine*. Research Journal of Pharmacognosy (RJP) 2(1), 2015: 53–68
11. Jie G., Zhang T., Jin Z.Y., Xu X.M., Wang J.H., Zha X.Q., Chen H.Q. (2015): *Separation, Purification, Structure Identification and Hypoglycemic Activity of Polysaccharides From Lilium lancifolium*. Food Chemistry, Vol. 169, 430–438
12. Han H., Xie H.C. (2013): *A study on the extraction and purification process of lily polysaccharide and its anti-tumor effect*. African J Trad Compl Allter Med 10(6): 485–489.
13. Huang W. T.T, Zhang H.H. Y., Xli H. Li (2015): *Role of effective composition on antioxidant, anti-inflammatory, sedative-hypnotic capacities of 6 common edible Lilium varieties*. J. Food Sci., 80 (4) pp. H857-H868
14. Javed S., Shoaib A., Mahmood Z., Mushtaq S., Iftikhar S. (2012): *Analysis of phytochemical constituents of Eucalyptus citriodora L. responsible for antifungal activity against post-harvest fungi*. Nat. Prod. Res. 26, 1732–1736.
15. Jia (2015): *Lily' Proliferation Inhibition on Human Gastric Cancer cell Lines SGC-7901 and Discussion of Functional Mechanism*. Yan'an University
16. Jiao H.L., Zhang Y.L., Niu L.X. (2015): *Phenolic composition and antioxidant activity of polyphenols from bulbs of Lilium lancifolium*. Thunb J. Northwest A & F Univ. (Nat. Sci. Ed.), 43 (7), pp. 150-154
17. Jin L., Zhang Y.L., Niu L.X., Luo J.R. (2014): *Antioxidant activity of polyphenolic compounds in bulbs of three Lilium species*. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 34 (5) pp. 995–1001

18. Kirby-Bauer A. (1996): *Antimicrobial sensitivity testing by agar diffusion method*. J Clin Pathol, 44:493
19. Kopaskova M., Hadjo L., Yankulova B., Jovtchev G., Galova E., Sevcovicova A., Mucaji P., Miadokova E., Bryant P., Chankova S. (2012): *Extract of Lilium candidum L. Can Modulate the Genotoxicity of the Antibiotic Zeocin*. Molecules 17,80-97 www.mdpi.com/journal/molecules
20. Lesinger Ivan (2016): *Ljiljan, cvijet omiljenog mirisa ima i snažna ljekovita svojstva* <https://living.vecernji.hr/zelena-zona/prekrasni-ljiljan-ima-i-brojna-ljekovita-svojstva-1074739>
21. Li L., Liu X.D., Zhan J.H., Luo J.H., Yuan L.M., Zhou Z.Y., Chen X.J.N.H. (2018): *A study on the antitumor activity of chemical constituents from Lilium lancifolium thumb*. J. Hunan Univ. Chin. Med., 38 (10), pp. 46–49
22. Lu M., Han Z., Yao L. (2013): *In vitro and in vivo antimicrobial efficacy of essential oils and individual compounds against Phytophthora parasitica var. nicotianae*. J. Appl. Microbiol. 115
23. Marzio L.D, Marianecci C., Petronea M., Rinaldi F., Carafab M. (2011): *Novel pH sensitive non-ionic surfactant vesicles: comparison between Tween 21 and Tween 20*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces: 82 (1),18–24.
24. Matejić J., Džamić A., Mihajilov-Krstev T., Randelović V., Krivošej Z., Marin P. (2012): *Total phenolic content, flavonoid concentration, antioxidant and antimicrobial activity of methanol extracts from three Seseli L. taxa*. Cent. Eur. J. Biol., 7(6), 1116–1122.
25. Mucaji P., Haladová M., Eisenreichová E., Šeršenň F., Ubik K., Grančai D. (2007): *Constituents in Lilium candidum L. and their antioxidative activity*. Ceska Slov Farm. Jan;56(1):27–29.
26. Patocka J., Navratilova Z. (2019): *Bioactivity of Lilium candidum L.* Biomedical Journal of Scientific & Technical Research June, 2019, Volume 18, 5, pp 13859-13862 DOI: 10.26717/BJSTR.2019.18.003204
27. Pjanovic R., Bosković-Vragolović N., Veljković-Giga J, Garić-Grulović R., Pejanović S., Bugarški B. (2010): *Diffusion of drugs from hydrogels and liposomes as drug carriers*. J. Chem. Technol. Biot. 85:693-698.
28. Rai A. (2013): *The antiinflammatory and antiarthritic properties of ethanol extract of Hedera helix*. Indian J Pharm Sci., 75(1): 9–102.
29. Sedighinia F., Afshar A.S., Soleimanpour S., Zarif R., Asili J., Ghazvini K. (2012): *Antibacterial activity of Glycyrrhiza glabra against oral pathogens: an in vitro study*. American Journal of Physiology 2.(3):1
30. Wang P., Li J., Attia F.A.K., Kang W., Wei J., Liu Z., Li C. (2019): *A critical review on chemical constituents and pharmacological effects of Lilium*. Food Science and Human Wellness, 8 (4), 330–336
31. Wang P., Su Z., Yuan W., Deng G., Li S. (2012): *Phytochemical constituents and pharmacological activities of Eryngium L. (Apiaceae)*. Pharmaceut. Crop., 3, 99–120.
32. Yarmolinsky L., Zaccai M., Ben-Shabat S., Mills D., Huleihel M. (2009): *Antiviral activity of ethanol extracts of Ficus binjamina and Lilium candidum in vitro*. New Biotechnol., 26, 307-313.
33. Zhang H.Q., Yan H., Qian D.W. (2017): *Analysis and evaluation of eight active ingredients in Lilium lancifolium from different regions China*. J. Chin. Mater. Med., 42 (2), pp. 311–318

34. Zhao Q.Y., Ai Y.F., Wang A.H., Wang J.Z., Wang Y.M. (2015): *Depressant effects of Lilium lancifolium on human pulmonary adenocarcinoma cell line A549 in vitro*. Shanxi J. Tradit. Chin. Med., 36 (4), pp. 497–499

Article received: 08.11.2019.

Article accepted: 23.11.2019.

DOI 10.7251/VETJSR1902283M

UDK 637.62:636.32/38

*Originalni naučni rad***MIKROSKOPSKA ISTRAŽIVANJA VUNSKIH VLAKANA PRAMENKE U CILJU
KVALITETNIJEG RAZVRSTAVANJA SIROVE VUNE****Nadžida MLAČO¹, Amela KATICA¹, Velija KATICA², Almira SOFTIĆ², Vedad ŠAKIĆ²,
Velida ČUTAHIJA^{1*}, Pamela BEJDIĆ¹, Nedžad HADŽIOMEROVIĆ¹, Jasmin KATICA³**¹ Veterinary Faculty University of Sarajevo, Department of Anatomy, Histology and Embriology, Zmaja od Bosne 90, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina² Veterinary Faculty, University of Sarajevo, Department of Animal Science, Zmaja od Bosne 90, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina³ Veterinary Faculty, University of Sarajevo, Department of Food and Nutrition of Domestic Animals, Zmaja od Bosne 90, 7100 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

*Corresponding author: nadzida.mlaco@yahoo.com

Kratak sadržaj: U Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, kao i većini zemalja Balkana, vuna predstavlja veliki ekološki problem. Nakon striže ovaca, farmeri obično ostavljaju vunu na mjestima striže što predstavlja teško razgradiv otpad organskog porijekla. Otkupna cijena takve, netretirane vune je veoma mala kao i njen kvalitet. Istraživanjem smo pokušali skrenuti pažnju na kvalitet vunskih vlakana pojedinih dijelova tijela, sa jednog drugog aspekta, što je u konačnici veoma bitno u tekstilnoj industriji i selekciji vune u daljoj preradi. Kutikulu čine orožale ćelije, ljuspice, koje se nalaze na površini runskih vlakana. Jedna od značajnih uloga kutikule je zaštitna. Naime, kutikula štiti vunsko vlakno od različitih vanjskih inzulta, bilo mehaničkih, fizičko-hemijskih (kao što je isparavanje amonijaka u loše održavanim nastambama i sl.), koji mogu oštetiti runo, te ga na taj način učiniti manje kvalitetnim. Na istraživanim uzorcima runskih vlakana ustanovili smo izvjesne razlike u položaju i obliku orožalih ljuspica, zavisno od dijela tijela odakle su uzorkovane. Međutim, mikroskopskom analizom uzoraka uzetih sa korijena repa, ustanovili smo da su ljuspice znatno manjih dimenzija, finije građe u odnosu na raspored i izgled rožnih ljuspica sapi. U radu smo komparirali izgled, raspored ljuspica kutikule, što je veoma važno u procjeni kvaliteta vune, te njenoj daljoj upotrebi kao sirovine.

Ključne riječi: dubska, pivska pramenka, industrija, vunsko vlakno, kutikula

UVOD

U Bosni i Hercegovini i Crnoj Gori, kao i u većini država Balkana, proizvodnja vune u posljednjih dvadesetak godina gotovo da nema nikakvu ekonomsku važnost. Vuna je nus-proizvod, koji u posljednje vrijeme stvara poteškoće, jer vunu ovakvog kvaliteta gotovo je nemoguće prodati, pa ona postaje i ekološki problem.

U rasnoj strukturi ovaca u Bosni i Hercegovini i Crnoj Gori najzastupljenije su autohtone pasmine ovaca, koje se uglavnom odlikuju malom proizvodnjom vune po grlu, a vuna je lošeg i neujednačenog kvaliteta, slabe elastičnosti i valovitosti i nema garantovanih cijena odnosno poznatog i sigurnog otkupljiivača. Nadalje, ovce se ne pripremaju za strižu, dok se sortiranje vune po kvalitetu uopšte ne provodi. Zbog lošeg i neujednačenog kvaliteta, većina proizvedene vune ne može se smatrati odgovarajućom za tekstilnu industriju, ali se može smatrati adekvatnom za proizvodnju drugih proizvoda (prekrivači, dušeci, tepisi, jastuci, suveniri, izolacioni materijali, itd.).

Prema podacima WTO-a, obzirom na dijametar vunskih vlakana, kao i njihov kvalitet, vuna predstavlja široko upotrebnu sirovinu, prvenstveno u tekstilnoj industriji, građevinarstvu, poljoprivredi kao gnojivo ili materijal za malčiranje koji sprečava rast korova i uz to odlično

zadržava vlagu. Industrija ekoloških izolacionih materijala, kako termičkih, tako i akustičnih, koristi je u proizvodnji novih materijala otpornih na toplotu, koji imaju antistatičke i antialergijske osobine.

Vunska vlakna u runu ovaca predstavljaju kvantitativne, ali prije svega kvalitativne parametre u proizvodnji vune i određivanju njezine upotrebljivosti u daljoj preradi. Vlakna nisu jednakog kvaliteta, kako po hemijskom sastavu, tako i tehničkim karakteristikama, što umnogome zavisi o rasi ili soju, načinu uzgoja, zoohigijenskim uslovima, načinu ishrane, klimatskim uslovima, hormonalnom statusu i slično, (Savić i sar., 2007, Savić i sar., 2014). Našim istraživanjima nastojimo uzgajivačima ukazati na značaj klimatskih faktora i dobi na kvalitet vunskih vlakana autohtone pramenke (dubski i pivski soj), što će vjerovatno imati uticaja na ukupnu proizvodnju i iskorištenost sirove vune kao osnovne sirovine u zahtjevnoj tekstilnoj industriji. Još detaljnijim mikroskopskim istraživanjima vunskih vlakana domaćih pasmina ovaca, pokušali smo skrenuti pažnju na njezinu iskoristivost u različitim pravcima, od tekstilne industrije (proizvodnja ćilima, odjevnih predmeta i sl.) do upotrebe u građevinarstvu, kao termički izolator.

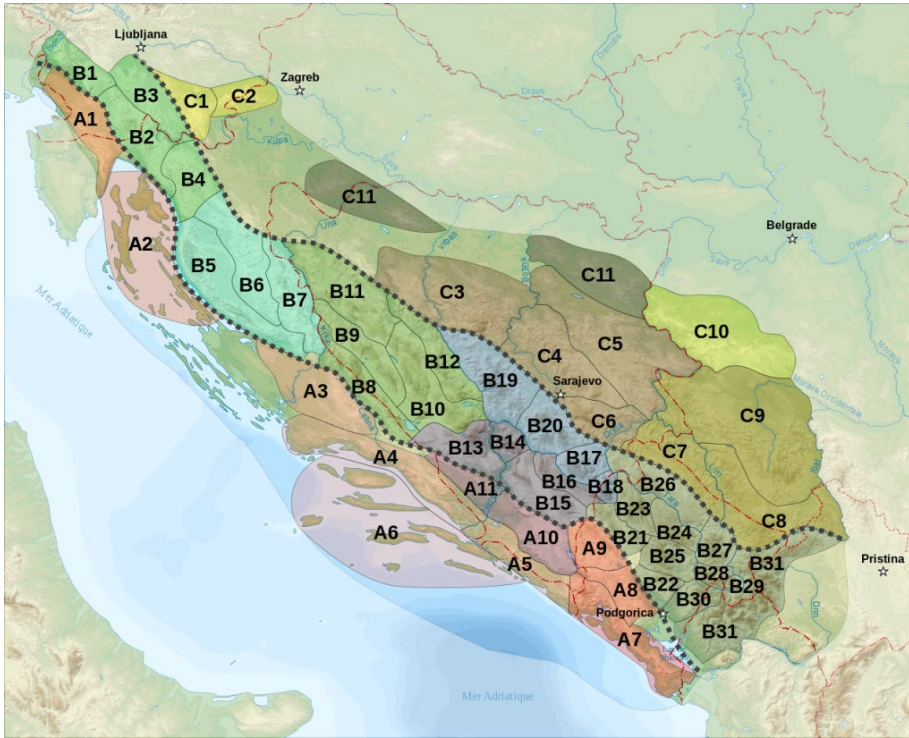
MATERIJAL I METODE

Uzorke za mikroskopska istraživanja vunskih vlakana ovaca, dubske i pivske pramenke, uzeli smo sa dva različita lokaliteta, planina Vlašić – Bosna i Hercegovina i Pivska planina (Dubljevići i Kovači Orah) – Crna Gora. Dinarsko gorje ima tri pojasa: Primorski,

Centralni, Sjevero-istočni, a u svakom od njih nalazi se više geografskih područja. Pivske ovce se uzgajaju u centralnom pojasu Dinarskog gorja, u geografskom području Durmitora i Sinjajevine (B23, 24). Dubske ovce u sjeveroistočnom pojasu Dinarskog gorja u geografskom području Vlašića (C3). (Slika 1).

Млаћо и сар:

Микроскопска истраживања vunskih vlakana pramenke u cilju kvalitetnijeg razvrstavanja sirove vune



Slika 1. Područje uzgoja pramenke: Dinarsko gorje i geografska područja uzgoja pivske i dubske pramenke (Izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/24/Dinaric_Alps_subdivisions_fr.svg/1265px-Dinaric_Alps_subdivisions-fr.svg.png)

Ukupno je uzorkovano vunsko vlakno sa 40 jedinki (po dvadeset sa svakog lokaliteta) i to 10 u proljeće i 10 u jesen sa svakog lokaliteta. Runo za mikroskopsku analizu uzeto je sa različitih dijelova tijela, korijen repa, plećka i sapi odsijecanjem pramenova uz samu kožu. Takvi uzorci, sa oba istraživana lokaliteta i u različitim vremenskim periodima (proljeće i jesen), stavljali su se u označene plastične vrećice do momenta mikroskopiranja. Prije mikroskopiranja, da bi se uklonile nečistoće, uzorci su se prali neutralnim sapunom, ispirali vodom, a zatim ponovo destilovanom vodom.

Radi mikroskopiranja i transparentnosti, uzorci su se postavljali u vodonikov-peroksid (H_2O_2) 24 sata, a poslije u ksilol 48 sati. Nakon toga, uzorci su ponovno ispirani u destilovanoj vodi, nakon čega su ostavljeni da se osuše. Tako pripremljeni uzorci postavljeni su na predmetna stakla i uklopljeni u kapi glicerina, nakon čega su mikroskopirani.

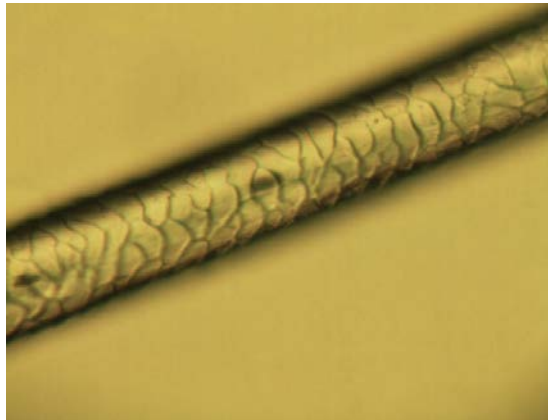
Mikroskopiranja kutikule korijena repa, plećke, sapi sa različitih lokaliteta, vršena su binokularnim svjetlosnim mikroskopom (Motic 120M), pod uvećanjem 200 i 400 puta.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Vunsko vlakno se sastoji iz tri dijela: glavice (bulbusa), korijena i stabla (prava vlakna, dio vlakna pod kožom). Stablo je najduži dio vlakna i čini vunski pokrivač ovce (Katica i sar., 2010, Katica i sar., 2015). Vunsko vlakno je rožna tvorevina građena iz dva, ponekad iz tri sloja. To su pokožica (*cuticula*, *epidermis*), kora ili srednji sloj (*substratia corticalis*), srž (*substratia medullaris*).

Kutikulu čine orožale ćelije, ljuspice, koje se nalaze na površini runskih vlakana. Jedna od značajnih uloga kutikule je zaštitna (Kozarić, 1997). Naime, kutikula štiti vunsko vlakno od različitih vanjskih inzulata, bilo mehaničkih, fizičko-hemijskih (kao što je isparavanje amonijaka u loše održanim nastambama i sl.), koji mogu oštetiti runo, te ga na taj način učiniti manje kvalitetnim. Na istraživanim uzorcima runskih vlakana ustanovili smo izvjesne razlike u položaju i obliku orožalih ljuspica, zavisno od dijela tijela odakle su uzorkovane, bez obzira da li se radilo o dubskoj ili pivskoj pramenki. Tako

na sapima (Slika 2), rožnate ljuspice naliježu jedna preko druge u kontinuitetu. Nepravilnog su oblika i podsjećaju na crepove krova. Obično je takav izgled kutikule vezan za gruba vunška vlakna. Nasuprot takvom izgledu kutikule, na uzorcima uzetih sa sapi i dubske i pivske pramenke, za očekivati je bilo da na korijenu repa imamo još grublju strukturu u rasporedu rožnatih ljuspica. Međutim, mikroskopskom analizom uzoraka uzetih sa korijena repa, ustanovili smo da su ljuspice znatno manjih dimenzija, finije građe (Slika 3) u odnosu na raspored i izgled rožnih ljuspica sapi. Na rubovima runa uzetog sa korijena repa, može se uočiti i ljevkasti izgled rožnih ljuspica poredanih cirkularno (Slika 5), što je odlika finijeg i kvalitetnijeg runa. Uzorci runa uzetih sa plečke pokazuju na tzv. prelaznu formu kutikule (Slika 4). Orožale ljuspice su dosta velike, mnogougone i gotovo da se jasno izraženi rubovi ljuspica spajaju jedna s drugom u jednu cjelinu.



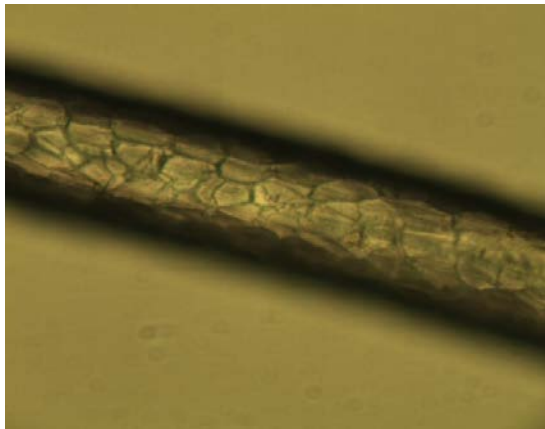
Slika 2. Nativni preparat; x 400; sapi

Млаћо и сар:

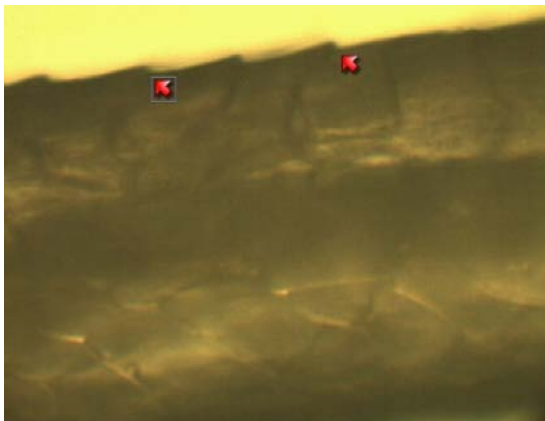
Микроскопска истраживања vunskih vlakana pramenke u cilju kvalitetnijeg razvrstavanja sirove vune



Slika 3. Nativni preparat; x 400; korijen repa



Slika 4. Nativni preparat; x 400; plećka



Slika 5. Nativni preparat; imerzija; raspored lispica; korijen repa

Vuna je proizvod kože i predstavlja skup vunskih vlakana, specifične strukture i fizičkih osobina koje ih čine pogodnim za pređenje (Mitić, 1984). Osnovna jedinica vune je vunsko vlakno, odnosno dio koji se nalazi iznad površine kože i koji se ekonomski koristi za proizvodnju tkanina i dr. Sva vlakna nisu jednaka po hemijskom sastavu, histološkoj građi, niti po tehnološkim odlikama (Mioč i sar., 2006). Vunska vlakna rastu iz papila smještenih u folikulima. Rast vlakana počinje krajem drugog ili početkom trećeg mjeseca intrauterinog razvoja jagnjeta. Vlakna izbijaju iz kože pojedinačno ili u grupicama. Pojedinačna vlakna povezuju grupice u Y snopiće, pramenčiće, pramenove i runo. Nakon prve striže vunska vlakna nisu više šiljasta (Vegara, 1991).

Sveobuhvatnim istraživanjem runa dubske i pivske pramenke, uzorkovanih sa različitih lokaliteta, različitih ambijentalnih uslova, te godišnjih doba, pokušali smo ustanoviti kvantitet, eventualne morfološko-histološke, odnosno kvalitativne posebnosti runa ova dva soja.

Istraživanja kutikule runskih vlakana su pokazala različitosti u rasporedu, obliku i nalijeganju jedna preko drugih kutikularnih ljuspica, njihovom kontinuitetu sa različitim dijelova tijela.

Kutikula dubske i pivske pramenke je generalno pokazivala nježniju strukturu u proljetnom periodu u odnosu na jesenji. Posebno kutikula korijena repa je bila ujednačene strukture uzoraka uzetih i sa jednog i sa drugog lokaliteta u pomenutim periodima. Rezultati naših istraživanja umnogome će pomoći, prije svega uzgajivačima, jer će im dati izvjesne smjernice kada je u pitanju striža ovaca, koja mora uključivati prethodnu pripremu da bi se dodatno poboljšao kvalitet runa. Istraživanja su posebno zanimljiva za tekstilnu industriju, jer će se na osnovu dobijenih rezultata moći pristupiti ozbiljnom razvrstavanju runskih vlakana. Najgrublje runo se može koristiti kao ekološki prihvatljiv građevinski materijal zbog iznimno velikih vrijednosti debljine runskih vlakana sa pojedinih dijelova tijela. Dakle, ovčja vuna danas ne bi trebala biti „ekološki problem” već, upravo suprotno, vrijedna ekološka sirovina, koja će svoju primjenu naći u širokom spektru potreba.

ZAKLJUČCI

Izgled kutikule, vanjskog, zaštitnog omotača runskih vlakana je varirao u zavisnosti od regije tijela kako kod dubske tako i kod pivske pramenke. Rožnate ljuspice na sapima oba soja pramenke su podsjećale na crepove krova, jer su pravilno nalijegale jedna preko druge, što je odlika grubih vunskih vlakana. Međutim, kutikula korijena repa je bila nešto finije građe, rožne ljuspice su bile manjih dimenzija u odnosu na one uzorkovane sa sapi, a pri vrhu su se završavale ljevasto. Na plečkama je preovladavala tzv. prelazna forma kutikule, gdje su rožne ljuspice bile uočljive, velike i mnogougaone sa izraženim rubovima koji se međusobno spajaju.

Mikroskopska istraživanja kutikule vunskih vlakana su pokazala različitost u mikrostrukтури i izgledu rožnih ljuspica. Kutikula uzoraka sa korijena repa bila je neočekivano finije građe, u odnosu na kutikulu sapi, ili plečke, oba soja pramenke. Rožne ljuspice kutikule na repu su manjih dimenzija i pravilno su nalijegale jedna preko druge u vidu lijevka. Kutikula vunskih vlakana sapi je pokazivala grublju građu, dok je prelaznu formu predstavljala kutikula plečke i kod dubske i pivske pramenke.

Rezultati istraživanja mogu pomoći uzgajivačima da pri striži ovaca, mogu odmah razvrstati vunu, te time usmjeriti sirovinu ka daljoj proizvodnji, namjenski.

LITERATURA

1. Katica A., Mlačo N., Hasanbašić D., Hamzić E. (2010): *Osnove veterinarske histologije*. Univerzitet u Sarajevu, Veterinarski fakultet, Sarajevo.
2. Katica A., Mlačo N., Šakić V., Šatrović E., Kovčić I. (2015): *Koža i derivati kože životinja*. Univerzitet u Sarajevu, Veterinarski fakultet, Sarajevo.
3. Kozarić Zvonimir (1997): *Veterinarska histologija*. Veterinarska izdanja, Naklada Karolina, Zagreb.
4. Mioč B., Sušić V., Pavić V., Barać Z., Prpić Z. (2006): *Priprema ovaca za strižu, striža i postupci sa vunom do transporta*. Stočarstvo, UDK 636.083.45, (129–141); Zagreb.
5. Mitić A.N. (1984): *Ovčarstvo*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
6. Savić M., Dimitrijević V., Trailović R., Vegara M., Dimitrijević B., Bečkei Ž., Petrujkić B., Cojkić A. (2014): *Selekcijski kriterijumi u organskom stočarstvu*. Veterinarski glasnik 68 (5–6), Beograd.
7. Savić M., Jovanović S., Vegara M. (2007): *Stočarstvo*. Univerzitet u Beogradu, Norwegian University of Life Sciences, 1–304, Beograd.
8. Vegara M. (1991): *Razvoj vunskih folikula pramenke u dobi od šest do 26 mjeseci*. Doc. diss., Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo.

Rad primljen: 08.10.2019.

Rad prihvaćen: 01.12.2019.

DOI 10.7251/VETJEN1902290M

UDK 637.62:636.32/.38

*Original scientific paper***MICROSCOPIC EXAMINATION OF WOOL FIBERS IN PRAMENKA FOR THE QUALITY CLASSIFICATION OF RAW WOOL****Nadžida MLAČO¹, Amela KATICA¹, Velija KATICA², Almira SOFTIĆ², Vedad ŠAKIĆ², Velida ČUTAHIJA^{1*}, Pamela BEJDIĆ¹, Nedžad HADŽIOMEROVIĆ¹, Jasmin KATICA³**¹ Veterinary Faculty University of Sarajevo, Department of Anatomy, Histology and Embryology, Zmaja od Bosne 90, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina² Veterinary Faculty, University of Sarajevo, Department of Animal Science, Zmaja od Bosne 90, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina³ Veterinary Faculty, University of Sarajevo, Department of Food and Nutrition of Domestic Animals, Zmaja od Bosne 90, 7100 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

*Corresponding author: nadzida.mlaco@yahoo.com

Abstract: In Bosnia and Herzegovina, Montenegro, as well as in most Balkan countries, wool is a major environmental problem. After sheep shearing, farmers usually leave the wool at the shear sites, providing poorly degradable organic waste. The purchase price of such untreated wool is as low as its quality. By this research, we have tried to draw attention, from another aspect, to the quality of wool fibers of certain parts of the body, which is ultimately very important in the textile industry and in the selection of wool for further processing. The cuticle is made from cornified cells, flakes, located on the surface of wool fibers. One of the significant roles of the cuticle is the protective. Namely, the cuticle protects the wool fibers from various external factors, whether mechanical or physic-chemical (such as ammonia evaporation in poorly maintained facilities, etc.), which can damage the fleece and thus make it less quality. We have found some differences in the flakes position and shape in the wool fibers we investigated, depending on part of the body from which they were sampled. However, by microscopic analyses of samples taken from the root of the tail, we have found that the flakes were much smaller and finer in structure than the arrangement and appearance of the cornified flakes from the rump. In this study, we have compared the appearance and arrangement of flakes of cuticle, which is very important in assessing the quality of wool and its further use as a raw material.

Key words: Dubska and Pivska pramenka, industry, wool fiber, cuticle

INTRODUCTION

In the last twenty years, production of wool has almost no economic significance in Bosnia and Herzegovina, Montenegro and most Balkan countries. Wool is by-product, which has been causing problems lately, since it is almost impossible to sell low quality wool which than becomes environmental problem.

Most represented sheep breeds in Bosnia and Herzegovina and Montenegro are autochthonous, mainly characterized by wool low production per animal. Wool is of poor and uneven quality, with poor elasticity and undulation that have no guaranteed prices or known and safe buyer. Furthermore, sheep are not prepared for shearing, while the sorting of wool by quality is not carried out. Due to poor and uneven quality, most of produced wool cannot be considered suitable for the textile industry, but can be considered as adequate for other productions (blankets, mattresses, carpets, pillows, souvenirs, insulation materials, etc.).

According to WTO data, given the diameter of the wool fibers, as well as their quality, wool is a widely used raw material, primarily in the textile, construction, agriculture, as fertilizer or material that inhibits weed growth and, in addition, retains moisture. The environmental insu-

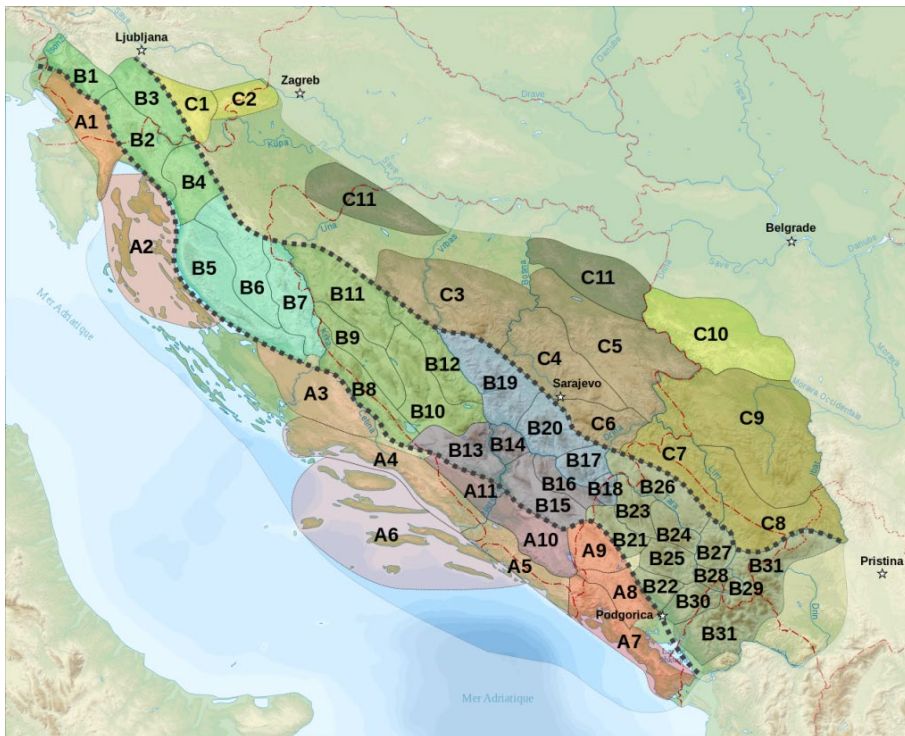
lation materials industry, both thermal and acoustic, use wool fibers in production of new heat resistant materials that have antistatic and anti-allergic properties.

The wool fibers in the sheep fleece represent quantitative but above all qualitative parameters in the production of wool and in determining its usability in further processing. The fibers are not of the same quality, both in chemical composition and technical characteristics, which largely depends on breed or strain type, breeding method, zoohygienic conditions, diet, climatic conditions, hormonal status, etc. (Savić et al., 2007, Savić et al., 2014). The aim of our study is to show to breeders the importance of climatic factors and age on the wool fibers quality of autochthonous Pramenka (Dubska and Pivska strains), which is likely to have an impact on the total production and usability of raw wool as a basic raw material in the demanding textile industry. With even more subtle microscopic investigations of the wool fibers of domestic sheep breeds, we have tried to draw attention to its different usability, from the textile industry (production of carpets, clothing, etc) to use in construction, as a thermal insulator.

MATERIAL AND METHODS

Samples for microscopic examinations of sheep wool fibers, both Dubska and Pivska pramenka, were taken from two different locations: Vlašić mountain - Bosnia and Herzegovina and Pivska mountain (Dubljevići and Kovači Orah) - Montenegro. Dinara Highlands have three zones: Littoral, the Central and the

North-East, with several geographic areas within each. Pivska sheep are breeding in the Central region of Dinara Highlands, in the geographical areas of Durmitor and Sinjajevina (B23, 24). Dubska sheep are breeding in the North-East region of the Dinara Highlands in the geographic area of Vlašić (C3). (Picture 1).



Picture 1. Area of Pramenka breeding: Dinara Highlands and geographic areas of Pivska and Dubska pramenka breeding (Source:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/24/Dinaric_Alps_subdivisions_fr.svg/1265px-Dinaric_Alps_subdivisions-fr.svg.png)

A total of 40 wool fibers were sampled (per twenty from each locality), 10 in the spring and 10 in the fall from each locality. The fleece for microscopic analyses was taken from different parts of the body: the root of the tail, the shoulder and the rump by cutting of the strands along

the skin. Such samples, from both localities and at different time periods (spring and autumn) were placed in labeled plastic bags until microscopic analysis. Prior to microscopic analyses, the samples were washed with neutral soap to remove impurities, and then washed with water

Mlaćo et al:

Microscopic examination of wool fibers in Pramenka for the quality classification of raw wool

and again with distilled water. For microscopic analyses and transparency, the samples were placed in hydrogen peroxide (H₂O₂) for 24 hours and subsequently in xylolum for 48 hours. The samples were then washed again in distilled water, after which they were allowed to dry. The prepared samples were placed on

glass slides, embedded in glycerol drops, and then microscopically analyzed.

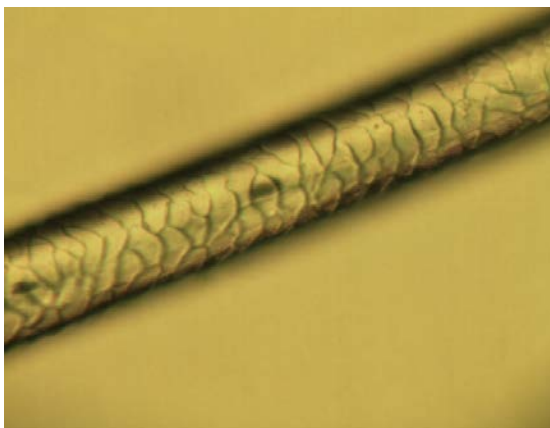
Microscopic analyses of the cuticle of the root of the tail, shoulders and rumps from different localities were performed with a binocular light microscope (Motic 120M), zoomed 200 and 400 times.

RESULTS AND DISCUSSION

The wool fiber consists of three parts: the head (bulbus), the root and the tree (straight fibers, part of the fibers under the skin). The tree is the longest part of the fiber and forms the wool blanket of the sheep (Katica et al., 2010, Katica et al. 2015). Wool fiber is a cornified structure made up of two, sometimes three layers. Those are the epidermis (*cuticula, epidermis*), cortex or middle layer (*substratia corticalis*), medulla (*substratia medullaris*).

The cuticle is made of cornified cells, flakes, located on the surface of wool fibers. One of the most important roles of cuticle is the protective (Kozarić, 1997). Namely, the cuticle protects the wool fiber from various external insults, whether mechanical, physicochemical (such as ammonia evaporation in poorly maintained facilities, etc.), which can damage the fleece and make it less quality. We have found some differences in the flakes position and shape on the examined wool fibers samples, depending on the part of the body from which they were sampled, regardless of whether they were from Dubska or Pivska pramenka. Thus,

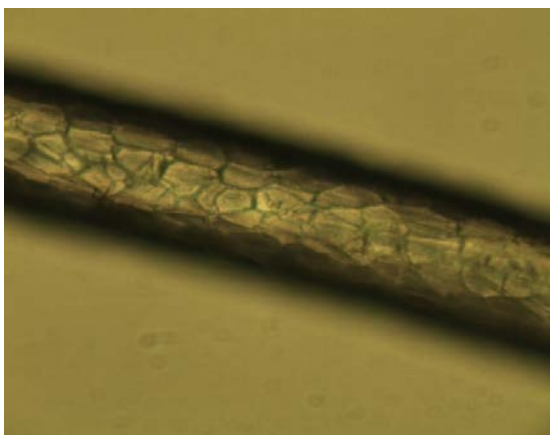
on rumps (Picture 2), the cornified flakes stick over one another in continuity. They are irregular in shape and reminds on roof *tiles*. Usually, this cuticle appearance is associated with rough wool fibers. In contrast to this, on the samples taken from the rumps of Dubska and Pivska pramenka, it was expected that an even rougher structure in the cornified flakes arrangement would be at the root of the tail. However, by microscopic analyses of samples taken from the root of the tail, we found that the flakes are much smaller in size, finer in structure (Picture 3) compared to the arrangement and appearance of the cornified flakes on the rumps. On the edges of the fleece taken from the root of the tail, the funnel appearance of the cornified flakes lined circularly are seen (Picture 5). That is a feature of finer fleece with better quality. Samples of fleece taken from the shoulder indicate the so-called transitional cuticle shape (Picture 4). The cornified flakes are quite large, polygonal, and with distinct edges of the flakes that clearly blend into one another.

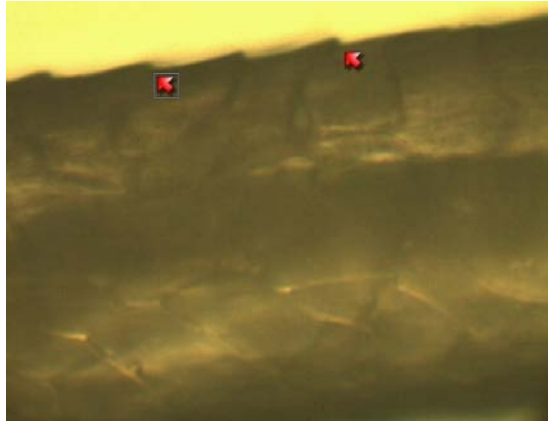


Picture 2. Native preparation; x 400; rumps



Picture 3. Native preparation; x 400; root of the tail



Picture 4. Native preparation; x 400; shoulder**Picture 5. Native preparation; immersion; flakes arrangement; root of the tail**

Wool is the skin product and is a set of wool fibers with specific structure and physical properties that make it suitable for spinning (Mitić, 1984). The basic unit of wool is the wool fiber, i.e. the part above the skin surface that is economically used for the textile production, etc. All fibers are not equal in chemical composition, histological structure, or technological characteristics (Mioč et al., 2006). Wool fiber grows from the papillae located in the follicle. Fiber growth begins at the end of the second or at the beginning of the third month of intrauterine lamb development. The fibers come out of the skin individually or in groups. The individual fibers connect into Y bundles, strands and fleece. After the first shear, the wool fibers are no longer pointed (Vegara, 1991).

Through a comprehensive study of Dubska and Pivska pramenka fleece, sampled from different localities, ambient conditions and seasons, we tried to establish the quantitative, morphological-histological and qualitative features of fleece originated from these two strains.

Studies of the cuticle of the wool fibers have shown differences in the arrangement, shape and attachment of the flakes to one another, as well as their continuity from different parts of the body.

The cuticle of the Dubska and Pivska pramenka generally showed a softer structure in the spring than in the fall. In particular, the cuticle of the root of the tail was of uniform structure in samples taken from both localities in the both periods. Our results will help the breeders, as they will give them some guidance for sheep shearing which must include preparation in order to improve the fleece quality. The research is of particular interest to the textile industry, since the obtained results will enable classification of wool fibers. The roughest fleece can be used as eco-friendly construction material because of the extremely high values of the thickness of the wool fibers from individual body parts. Nowadays sheep wool should not be “environmental problem” but, on the contrary, valuable organic raw material, which will find its application on a wide market.

CONCLUSIONS

The appearance of the cuticle, the outer, protective sheath of wool fibers, varied depending on the region of the body in both Dubska and Pivska pramenka. The cornified flakes on the rumps of the both strains reminded on the roof *tiles* because they were correctly stacked over one another, which is a feature of rough wool fibers. However, the cuticle of the root of the tail was slightly finer in structure, the cornified flakes were smaller in size than those sampled from rumps, and ended at the apex with a funnel. On the shoulder, the so-called transitional cuticle shape was dominant, which was characterized by prominent, large and polygonal cornified flakes that were noticeable, large and polygonal with prominent edges that join together.

Microscopic examinations of the wool fiber cuticle have revealed differences in the microstructure and appearance of cornified flakes. In both strains, the cuticle of the root of the tail was unexpectedly finer in structure than the cuticle of the rumps or shoulders. The cornified flakes of the cuticle on the tail are smaller in size and are correctly folded over each other in the form of the funnel. The cuticle of the wool fibers on the rumps showed a rougher structure, while the transitional form was represented by the cuticle of the shoulders in both the Dubska and Pivska pramenka.

Based on the obtained results, we would like to draw attention to the fact that as early as during sheep shearing, breeders can initially sort out the wool, thus directing the raw material toward further production, purposefully.

REFERENCES

1. Katica A., Mlaćo N., Hasanbašić D., Hamzić E. (2010): *Osnove veterinarske histologije*. Univerzitet u Sarajevu, Veterinarski fakultet, Sarajevo.
2. Katica A., Mlaćo N., Šakić V., Šatrović E., Kovčić I. (2015): *Koža i derivati kože životinja*. Univerzitet u Sarajevu, Veterinarski fakultet, Sarajevo.
3. Kozarić Zvonimir (1997): *Veterinarska histologija*. Veterinarska izdanja, Naklada Karolina, Zagreb.
4. Mioč B., Sušić V., Pavić V., Barać Z., Prpić Z. (2006): *Priprema ovaca za strižu, striža i postupci sa vunom do transporta*. Stočarstvo, UDK 636.083.45, (129–141); Zagreb.
5. Mitić A.N. (1984): *Ovčarstvo*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
6. Savić M., Dimitrijević V., Trailović R., Vegara M., Dimitrijević B., Bečkei Ž., Petrujkić B., Cojkić A. (2014): *Selekcijski kriterijumi u organskom stočarstvu*. Veterinarski glasnik 68 (5–6), Beograd.
7. Savić M., Jovanović S., Vegara M. (2007): *Stočarstvo*. Univerzitet u Beogradu, Norwegian University of Life Sciences, 1–304, Beograd.
8. Vegara M. (1991): *Razvoj vunskih folikula pramenke u dobi od šest do 26 mjeseci*. Doc. diss., Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo.

Article received: 08.10.2019.

Article accepted: 01.12.2019.

DOI 10.7251/VETJSR1902297S

UDK 636.7.09:[616.33/.34-022.7:579.84

Приказ случаја

ПОСТОПЕРАТИВНА ИНФЕКЦИЈА РАНЕ ТВРДОГ НЕПЦА СА *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* КОД ПСА: ПРИКАЗ СЛУЧАЈАОЛИВЕР СТЕВАНОВИЋ^{1*}, МИЉАН ДОБРИЈЕВИЋ¹, ДЕЈАН ВУЈАНИЋ¹, ДРАГО НЕДИЋ²

¹ Ветеринарска амбуланта „БЛ вет“ Бања Лука, Степе Степановића 173, 78000 Бања Лука, Босна и Херцеговина

² ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука, Бранка Радичевића 18, 78000 Бања Лука, Босна и Херцеговина

* Коренсподентни аутор: Оливер Стевановић: oliver.13.stevanovic.bih@gmail.com

Кратак садржај: Инфекције рана код паса и мачака са ентеробактеријама из рода *Klebsiella* spp. су ријетке у клиничкој пракси. У Ветеринарску амбуланту „БЛ-вет“ Бања Лука доведена је женка бултеријера стара 8 мјесеци. Из анамнезе од власника сазнајемо да је куја оперисана у другој ветеринарској клиници неколико седмица прије него што су власници примијетили обилан исједак из носа. Клиничким прегледом је установљено да је опште стање пса неизмијењено. Из ноздрва је био примјетан обилан гнојни исцједак свијетло-зелене боје са примјесам хране. Из усне шупљине, био је осјетан јак задах – *foetor ex ore*. Прегледом усне шупљине се уочава свјеже инфицирана рана на тврдом непцу. Зарастање ране је било очигледно отежано са присутном инфекцијом, тако да су рубови непца остали неприпојени. Тек након узимања бриса дна ране, могло се уочити да је ријеч о активном гнојном процесу. *Klebsiella pneumoniae* је изолована из ране непца код пса.

Кључне ријечи: *Klebsiella pneumoniae*, постоперативна инфекција, пас

УВОД

Инфекције рана код паса и мачака са ентеробактеријама из рода *Klebsiella* spp. су ријетке у свакодневној клиничкој пракси. Микробиолошком анализом инфицираних рана код паса је утврђена заступљеност од 1,7% врсте *Klebsiella pneumoniae* (Угумова и сар., 2012). Нешто већи број изолата *Klebsiella pneumoniae* (16,7%) је утврдио Rahman и сар. (2003). Ентеробактерије су ријетко изоловане из уједних рана код паса (Meuysers и сар., 2008). Ентеробактерије, а посебно представници рода *Klebsiella* spp. праве значајан проблем код тзв. „болничких или нозокомијалних“ инфекција (Glickman, 1981, Seliškar и сар., 2007). Инфекција са врстом

Klebsiella oxytoca је описана код два пса након стоматолошког захвата, с тим да је инфекција код једног пса била фатална након што је након екстракције премоларног зуба ушао у септични шок (Seliškar и сар., 2007). Нозокомијалне инфекције са клебсијелама су честе у хуманој медицини и скоро увијек се повезују са контаминираним катетерима и интрахо-спиталним чесмама (Lowe и сар., 2012).

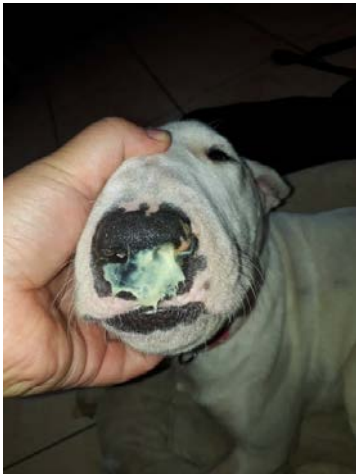
У овом раду је описана инфекција тврдог непца код пса са ентеробактеријом *Klebsiella pneumoniae* након оперативне санације расцјепат тврдог непца.

ОПИС СЛУЧАЈА

У Ветеринарску амбуланту „БЛ-вет“ Бања Лука доведена је женка бултеријера стара 8 мјесеци. Из анамнезе од власника сазнајемо да је куја оперисана у другој ветеринарској клиници неколико седмица прије него што су власници примијетили обилан исцједак из носа. На препоруку ветеринара, пас је храњен мекшом храном након операције.

Клиничким прегледом је установљено да је опште стање пса неизмијењено. Из ноздрва је примјетан обилан гнојни исцједак

свијетло-зелене боје са примјесима хране. Из усне шупљине био је осјетан јак задах – *foetor ex ore*. Прегледом усне шупљине се уочава свјеже инфицирана рана на тврдом непцу. Зарастање ране је било очигледно отежано са присутном инфекцијом, тако да су рубови непца остали неприпојени. Гној са остацима хране је тешко било запазити само инспекцијом усне шупљине пса, је се налазио у дну ране непца. Тек након узимање бриса дна ране, могло се уочити да је ријеч о активном гнојном процесу.

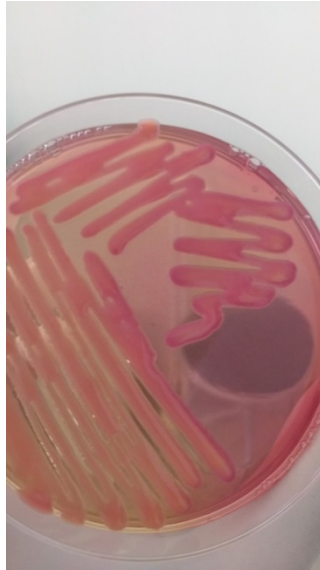


Слика 1 и 2. Постоперативна инфекција са клебсијелом

На основу клиничког прегледа, донесена је одлука да се изврши микробиолошка анализа дна инфициране ране, с обзиром на присуство обилног гнојног садржаја. Узорак бриса дна ране је насађен на крвни агар са 5% овчије крви и Меконки (*MacConkey*) агар. Након 24 часа, на крвној плочи је примијећен раст карактеристичних сивих, нехемолитичких, крупних, сивих и мукоидних колонија. На Меконки (*MacConkey*) агару су

биле уочљиве лактоза позитивне мукоидне колоније. Даљом примарном идентификацијом (оксидаза тест, каталаза тест, бојење по Граму) бактеријске културе је утврђено да је ријеч о врсти из фамилије *Enterobacteriaceae*. С обзиром на специфичан раст на Меконки (*MacConkey*) агару – мукоидне колоније са лактоза позитивним бактеријама, постављена је сумња на род *Klebsiella*.

Стевановић и сар:

Постоперативна инфекција ране тврдог неща са *Klebsiella pneumoniae* код пса: приказ случаја

Слика 3. Мукоидне колоније на MacConkey агару

Чиста култура након 24 часа инкубације на неутралном агару је достављена на дефинитивну идентификацију у Лабораторију за микробиологију Универзитетског клиничког центра у Бањој Луци. Аутоматским системом „VITEK 2 Biomerieux“ је утврђено да се ради о ентеробактерији *Klebsiella pneumoniae*. Додатно, на систему је утврђен профил осјетљивости на изабране антимикробне лијекове. Изолат је био осјетљив на цефалоспорине (цефуроксима, цефиксим, цефтриаксон, цефепим), азтреонам, дорип-енем, ертапенем, имипенем, меропенем, левофлоксацин, моксифлоксацин, тигеци-клин, хлорамфеникол, колестин, тримет-оприм и сулфометоксазол/триметоприм. Резистенција је доказана на ампи-цилин/сулбактам и пиперацилин.

Пас је подвгнут антимикробној терапији, при чему су парентерално апликовани флуорхинолони (енрофлоксацин) у дози 5mg/kg у трајању од седам дана. Сљедећих седам дана, апликовани су парентерално сулфонамиди са триметопримом у дози од 1 ml. на 10 kg. Клинички симптоми (исцједак из носа, гнојна инфекција ране) су се смањили након терапије, али нису у потпуности изостали. Из информација које смо добили од власника смо сазнали да је пас у ветеринарској клиници поново оперисан, али се рана није могла у потпуности санирати, тако да је била константно изложена новим инфекцијама. Тренутно је пас удомљен у Словенији, а гнојни садржај се редовно аспирира из ране, а антимикробна терапија се више не спроводи.

ДИСКУСИЈА

У овом раду је приказан случај ријетке постоперативне инфекције са ентеробактеријом *Klebsiella pneumoniae*, што се у свакодневној клиничкој пракси ријетко сусреће. Клебсиела је чест налаз нозокомијалних инфекција у великим болничким центрима код људи и животиња, при чему се среће значајна заступљеност антимикуробне резистенције (Glickman, 1981, Johnson, 2002). У ветеринарској пракси, овакви случајеви су ријетки, јер код нашег изолата на основу добијеног антибиограма је утврђено да је већи број антимикуробних лијекова учинковит против клебсиеле.

Инфекција у нашем случају је настала вјероватно перорално, јер рану у усној дупљи није било могуће заштитити од контаминације из спољашње средине. Такође, доказано је да *Klebsiella pneumoniae* може да буде нормална микробиолошка флора у усној шупљини паса (Kasempimolporn и сар., 2003). Међутим, као значајан опортунистички патоген, ова ентеробактерија може да у

случају септикемије доведе до значајних компликација па и смрти (Roberts и сар., 2002). Циљ антимикуробне терапије у нашем случају је био да се инфекција максимално санира прије поновне хируршке обраде, и самим тим максимално смањи ризик од реинфекције и септикемије.

Постоперативне инфекције се често сусрећу у ветеринарској пракси (Eugster и сар., 2012), и не могу се увијек сматрати стручном грешком, јер је хоспитализација и редован мониторинг пацијената у нашим клиникама и амбулантама и даље ријеткост. Међутим, у случају компликованих инфекција које не одговарају на емпиријску терапију са изузетном клиничком презентацијом са обилним и нетипичним гнојним садржајем (гној зелене боје са одурним мирисом, са примјесам крви итд.), потребно је узорковати и послати на бактериолошку претрагу. У таквим случајевима, једино је оправдана терапија на основу добијеног антибиограма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Glickman L.T. (1981): *Veterinary nosocomial Klebsiella infections*. J Am Vet Med Assoc 179: 1389–1392.
2. Eugster S., Schawalder P., Gaschen F., Boerlin P. (2004): *A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats*. Veterinary surgery, 33: 542–550
3. Johnson J.A. (2002): *Nosocomial infections*. Vet Clin North Am Small Anim Pract 32: 1101–26.
4. Kasempimolporn S., Benjavongkulchai M., Saengseesom W., Sitprija V. (2003): *Oral bacterial flora of dogs with and without rabies: a preliminary study in Thailand*. Journal of the Medical Association of Thailand, 86: 1162–1166.
5. Lowe C., Willey B., O’Shaughnessy A., Lee W., Lum M., Pike K., Larocque C., Dedier H., Dales L., Moore C., McGeer A. (2012): *Outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella oxytoca infections associated with contaminated handwashing sinks*. Emerging infectious diseases, 18: 1242.
6. Mayers B., Schoeman J.P., Goddard A., Picard J. (2008): *The bacteriology and antimicrobial susceptibility of infected and non-infected dog bite wounds: Fifty cases*. Vet. Microbiol. 127: 360–368.

Стевановић и сар:

Постоперативна инфекција ране тврдог непа са *Klebsiella pneumoniae* код пса: приказ случаја

7. Rahman M.M., Biswas D.B., Islam M.M., Islam M.A. (2003): *Cultural sensitivity of septic wound in animals*. Pak. J. Biol. Sci. 6: 741–744.
8. Roberts D.E., McClain H.M., Hansen D.S., Currin P., Howerth E.W. (2000): *An outbreak of Klebsiella pneumoniae infection in dogs with severe enteritis and septicemia*. Journal of veterinary diagnostic investigation, 12: 168–173.
9. Seliškar A., Zdovc I., Zorko B. (2007): *Nosocomial Klebsiella oxytoca infection in two dogs*. Volume 4 Slov Vet Res 44 97–137;
10. Urumova V., Chaprazov T.S., Lyutskanov M., Borisov I. (2012): *Microbiological analyses of canine infected wounds*. Revue Méd. Vét, 163: 201–205.

Рад примљен: 13.10.2019.

Рад прихваћен: 02.12.2019.

DOI 10.7251/VETJEN1902302S

UDK

Case report

POSTOPERATIVE WOUND INFECTION OF HARD PALATE WITH KLEBSIELLA PNEUMONIAE IN A DOG: CASE REPORT

Oliver STEVANOVIĆ^{1*}, Miljan DOBRIJEVIĆ¹, Dejan VUJANIĆ¹, Drago NEDIĆ²¹Veterinary clinic "BL vet" Banja Luka, Stepe Stepanovića 173, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina²PI Veterinary Institute of Republic of Srpska "Dr. Vaso Butozan" Banja Luka, Branka Radičevića 18, 78000 Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

* Corresponding author: Oliver Stevanovic: oliver.13.stevanovic.bih@gmail.com

Abstract: Infection of wounds in dogs and cats with enterobacteria from the genus *Klebsiella* spp. are rare in clinical practice. A female, Bull Terrier was brought to the veterinary clinic "BL-vet" Banja Luka at the age of 8 months. According to the owner, the dog was operated in another clinic and a several weeks later they noticed an abundant nasal discharge. Clinical examination revealed that the general condition of the dog was unchanged. There was a noticeable abundant purulent discharge, light-green in color with food remains from the nostrils. In the oral cavity, a foul breath - *foetor ex ore* was registered. By examining the oral cavity, a fresh-infected wound on the hard palate was visible. The wound healing was difficult due to the present infection, leaving the edges of the palate wound unattached. Only after taking a swab of the bottom of the wound, it could be noticed that this was an active suppurative process. *Klebsiella pneumoniae* was isolated from the wound of the dog's palate.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, postoperative infection, dog

INTRODUCTION

Infection of dogs and cats with enterobacteria of the genus *Klebsiella* spp. are rare in daily clinic practice. Microbiological analysis of infected wounds in dogs revealed that the prevalence of *Klebsiella pneumoniae* is 1.7% (Urumova et al., 2012). A slightly higher number of *Klebsiella pneumoniae* isolate (16.7%) was established by Rahman et al. (2003). Enterobacteria are rarely isolated from bite wounds in dogs (Meyers et al., 2008). Enterobacteria, especially representatives of the genus *Klebsiella* spp. provoke significant problem in so-called „hospital or nosocomial“ infections (Glickman, 1981, Seliškar et al., 2007). Infection with

Klebsiella oxytoca has been described in two dogs after dental surgery, but infection in one of them was fatal since the dog entered in septic shock after extraction of the premolar tooth (Seliškar et al., 2007). Nosocomial infections with *Klebsiella* spp. are common in human medicine and are almost always associated with contaminated catheters and intrahospital faucets (Lowe et al., 2012).

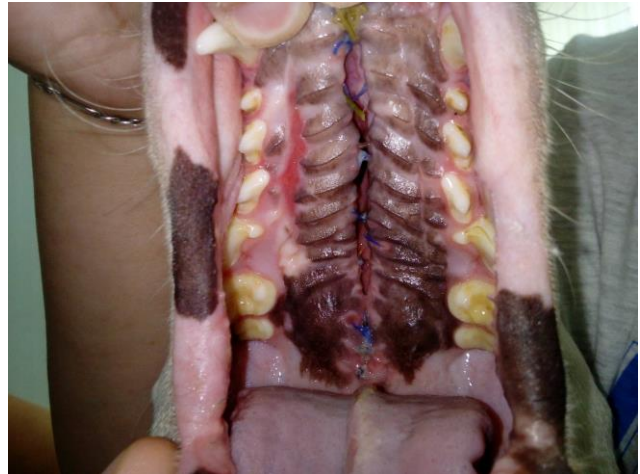
This paper describes a hard palate infection in a dog with the enterobacterium *Klebsiella pneumoniae* after surgical repair of cleft hard palate.

CASE DESCRIPTION

An eight months old female Bull Terrier was brought to the Veterinary Clinic “BL-vet” Banja Luka. We found out, from anamnesis, that the several weeks before owner noticed a abundant discharge from the nose, the animal was operated in another veterinary clinic. As veterinarian recommended, the dog was fed with softer food after surgery.

Clinical examination revealed that the general condition of the dog was unchanged. An abundant light-green purulent discharge with

food remains was observed from the nostrils. There was strong smell from the oral cavity - *foetor ex ore*. Examination of oral cavity reveals a freshly infected wounds in the hard palate. The wound healing was difficult due to the present infection, leaving the edges of the palate wound unattached. The pus with the food residue was hard to notice only by inspecting the dog's oral cavity, since it was located at the bottom of the wounded palate. Only after taking the swab of the bottom of the wound it was possible to notice that there was an active purulent process.



Pictures 1 and 2. Postoperative infection with *Klebsiella*

Based on clinical examination and due to the presence of abundant purulent content, a decision to obtain a microbiological analyses of the bottom of the infected wound was made. The wound swab was seeded onto 5% sheep blood agar and *MacConkey* agar. After 24 hours, growth of characteristic gray, non-hemolytic, large and mucoid colonies was observed on the

blood plate. On *MacConkey* agar, lactose positive mucoid colonies were observed. By further primary identification (oxidase test, catalase test, Gram staining) of bacterial culture, it was determined that it belongs to one of the species from family *Enterobacteriaceae*. Given the specific growth on *MacConkey* agar – mucoid colonies with lactose positive bacteria – the *Klebsiella* genus was suspected.



Picture 3. Mucoïd colonies on *MacConkey* agar

After twenty four hours of incubation on neutral agar, pure culture was delivered for definitive identification at the Laboratory for Microbiology of the University Clinical Center in Banja Luka. Using the automatic system „VITEK 2 Bi-omerieux“ presence of enterobacterium *Klebsiella pneumoniae* has been confirmed. In addition, a sensitivity on selected antimicrobials was established on the system. The isolate was sensitive to cephalosporins (cefuroxime, cefixime, ceftria-xone, cefepime), aztreonam, doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem, levofl-oxacin, moxifloxacin, tigecycline, chloramp-henicol, colistin, trimethoprimol and sulfamethoxazole/trimethoprim. Resistance has been demonstrated for ampicillin/sulbactam and piperacillin.

The dog was exposed to antimicrobial therapy, with 5mg/kg of fluoroquinolones (enrofloxacin) administrated parenterally for seven days. For next seven days, sulfonamides with trimethoprim in the dose of 1 ml per 10 kg was administered. Clinical signs (nasal discharge, purulent wound infection) reduced after therapy but were not completely absent. From information received from owners, we realized that the dog was exposed to surgery again at the veterinary clinic, but the wound could not be fully repaired, and thus was constantly exposed to new infections. Currently, dog is housed in Slovenia, purulent content is regularly aspirated from the wound and antimicrobial therapy is no longer being administrated.

DISCUSSION

The case of rare postoperative infection with the enterobacterium *Klebsiella pneumoniae*, which is rarely encountered in everyday clinical practice, is described in this paper. *Klebsiella* is a common finding of nosocomial infections in large hospital centers both in humans and animals, with significant antimicrobial resistance being found (Glickman, 1981, Johnson, 2002).

In veterinary practice, such cases are rare, because it was found in our isolate, based on obtained antibiogram, that a great number of antimicrobials are effective against *Klebsiella*.

In our case, infection was probably oral, since the wound in oral cavity was not able to be protected from environmental contamination. Also, it was proved that *Klebsiella pneumoniae*

Stevanović et al:

Postoperative wound infection of hard palate with *Klebsiella pneumoniae* in a dog: case report

could be a normal microbial flora in the oral cavity of dogs (Kasempimolporn et al., 2003). However, as a significant opportunistic pathogen, this enterobacteria, in the case of septicemia, can provoke significant complications, including death (Roberts et al., 2002). In our case, the goal of antimicrobial therapy was to maximize the cure of the infection before re-surgical treatment, thereby minimizing the risk of reinfection and septicemia.

Postoperative reinfections are common in veterinary practice (Eugster et al., 2012), and

cannot be always considered as professional mistakes, as hospitalization and regular monitoring of patients in our clinics and ambulances are still rare. However, in the case of complicated infections that do not respond to empirical therapy, with pronounced clinical presentation and with abundant and atypical purulent content (green pus with odor, blood admixture etc), it should be sampled and sent for bacteriological examination. In such cases, therapy based on antibiogram is the only choice.

REFERENCES

1. Glickman L.T. (1981): *Veterinary nosocomial Klebsiella infections*. J Am Vet Med Assoc 179: 1389–1392.
2. Eugster S., Schawalder P., Gaschen F., Boerlin P. (2004): *A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats*. Veterinary surgery, 33: 542–550
3. Johnson J.A. (2002): *Nosocomial infections*. Vet Clin North Am Small Anim Pract 32: 1101–26.
4. Kasempimolporn S., Benjavongkulchai M., Saengseesom W., Sitprijia V. (2003): *Oral bacterial flora of dogs with and without rabies: a preliminary study in Thailand*. Journal of the Medical Association of Thailand, 86: 1162–1166.
5. Lowe C., Willey B., O’Shaughnessy A., Lee W., Lum M., Pike K., Larocque C., Dedier H., Dales L., Moore C., McGeer A. (2012): *Outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella oxytoca infections associated with contaminated handwashing sinks*. Emerging infectious diseases, 18: 1242.
6. Mayers B., Schoeman J.P., Goddard A., Picard J. (2008): *The bacteriology and antimicrobial susceptibility of infected and non-infected dog bite wounds: Fifty cases*. Vet. Microbiol. 127: 360–368.
7. Rahman M.M., Biswas D.B., Islam M.M., Islam M.A. (2003): *Cultural sensitivity of septic wound in animals*. Pak. J. Biol. Sci. 6: 741–744.
8. Roberts D.E., McClain H.M., Hansen D.S., Currin P., Howerth E.W. (2000): *An outbreak of Klebsiella pneumoniae infection in dogs with severe enteritis and septicemia*. Journal of veterinary diagnostic investigation, 12: 168–173.
9. Seliškar A., Zdovc I., Zorko B. (2007): *Nosocomial Klebsiella oxytoca infection in two dogs*. Volume 4 Slov Vet Res 44 97–137;
10. Urumova V., Chaprazov T.S., Lyutskanov M., Borisov I. (2012): *Microbiological analyses of canine infected wounds*. Revue Méd. Vét, 163: 201–205.

Article received: 13.10.2019.

Article accepted: 02.12.2019.

DOI 10.7251/VETJSR1902306B

UDK 636.7.083+636.8.083]:637.5.05

*Originalni naučni rad***KORIŠTENJE OBROKA NA OSNOVI SIROVOG MESA (BARF) U HRANIDBI PASA I MAČAKA****Diana BROZIĆ^{1*}, Željko MIKULEC¹, Marko SAMARDŽIJA², Dražen ĐURIČIĆ³, Hrvoje VALPOTIĆ²**

1 Zavod za prehranu i dijetetiku životinja, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska

2 Klinika za porodništvo i reprodukciju, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska

3 Veterinarska stanica Đurđevac, Đurđevac, Hrvatska

*Korespondentni autor: Diana Brozić, e-pošta: diana.brozic@vef.hr

Kratki sadržaj: Obroci na osnovi sirovog mesa ili popularnije nazvani BARF obroci (eng. *Biologically Appropriate Raw Food*) definiraju se kao hrana za kućne ljubimce koja u svom sastavu sadržava termički neobrađene sirovine životinjskog podrijetla, domaćih ili divljih životinja te se koristi u hranidbi pasa i mačaka koje obitavaju u neposrednom kontaktu s čovjekom. Hranidba na temelju sirovog mesa može se podijeliti na dvije osnovne kategorije: komercijalno dostupni gotovi proizvodi i obroci pripremljeni od vlasnika (tzv. *homemade* BARF). Kod kuće spravljani obroci temelje se na recepturama koje omogućuju vlasniku samostalno pripremanje BARF obroka no one ne moraju biti u skladu s propisanim preporukama o unosu hranjivih tvari, što može rezultirati razvojem brojnih patoloških stanja uzrokovanih pogreškama u hranidbi. Nedostatak istraživanja rezultat je rasprave o riziku i pozitivnim učincima takve prehrane. Dosadašnja istraživanja potvrdila su znatno bolju probavljivost BARF obroka u usporedbi sa ekstrudiranom hranom i odličnu palatabilnost. Međutim, istraživanja koje bi potvrdila pozitivne učinke korištenja BARF obroka sa ciljem postizanja boljeg zdravstvenog stanja ili kao obrok izbora kod pojedinih patologija, nedostatna su, te se promicanje BARF prehrane temelji na istraživanjima koja su provedena na malom uzorku u kratkom razdoblju ili su dostupna u obliku popularne neregulirane literature. S druge strane, istraživanja kojima se upozorava na javnozdravstveni rizik kod hranjenja BARF obrocima značajno su brojnija. Naime, mikrobiološka ispravnost BARF obroka bitan je segment koji proizvođači moraju redovito kontrolirati uz neizostavno održavanje hladnog lanca u svim fazama proizvodnje i skladištenja kako bi se onemogućila kontaminacija i umnažanje patogena sa zoonotskim potencijalom.

Ključne riječi: BARF, kućni ljubimci, prehrana, smjernice

UVOD

Posljednjih godina sve je popularniji trend hranjenja pasa i mačaka BARF (eng. *Biologically appropriate raw food*) obrokom, pored uobičajenih režima hranjenja ekstrudiranom ili konzerviranom hranom. Procjenjuje se kako broj vlasnika koji svoje pse u potpunosti ili djelomično hrani obrocima na osnovi sirovog mesa u pojedinim zemljama Europe doseže i do visokih 51 % (Corbee i sur., 2013). Proizvodi koji sadrže nusproizvode životinjskog podrijetla, a koji nisu podvrgnuti termičkoj obradi mogu se podijeliti u tri skupine: tzv. žvakalice (svinjske uši, žile, tetive), obroci na osnovi sirovog mesa pripremljeni kod kuće (tzv. *homemade* BARF) i komercijalni BARF pripravnici koji uključuju sirovine: mišićno tkivo, unutarnje organe i kosti te ponekad i nepasterizirane mliječne proizvode i jaja (Freeman i sur., 2013). Dodatno, u BARF obroke mogu se uključiti različiti vitaminsko – mineralni dodatci, ulja, voće i povrće. Vlasnici koji odabiru BARF režim hranjenja često to čine iz razloga što smatraju da se radi o prirodnom proizvodu bez dodanih konzervansa ili stabilizatora i bez dodanih ugljikohidrata što bi

kao rezultat dovelo do pozitivnih učinaka na zdravlje i opće stanje kućnog ljubimca (Morgan i sur., 2017). Međutim, i dalje bez znanstvenih dokaza, motivacija i odabir hranjenja BARF obrokom često se temelji na osobnom iskustvu vlasnika ili proizvođača (Freeman i sur., 2013, Morgan i sur., 2017). Neujednačen stav unutar veterinarske struke rezultat je nedostatka istraživanja koja bi dala odgovore na mnogobrojna pitanja o razini potencijalnog rizika ili s druge strane, potvrdila pozitivne učinke ovakvog oblika hranjenja te indiciranost korištenja uslijed pojedinih patologija. Istraživanja koja upozoravaju na javnozdravstveni rizik prilikom hranjenja kućnih ljubimaca sirovim obrokom, brojnija su, pri čemu se naglašava potreba za odgovornim ponašanjem uslijed korištenja sirovog obroka u kućanstvima. Posljedica neujednačenog stava o prednostima i rizicima hranjenja kućnih ljubimaca sirovim obrocima rezultirala je velikim brojem nejasnih i kontradiktornih informacija dostupnih vlasnicima kućnih ljubimaca i veterinarima.

HRANIDBA PASA I MAČAKA OBROCIMA NA OSNOVI SIROVOG MESA

Najrašireniji koncept hranjenja obrokom na osnovi sirovog mesa je BARF (eng. *Bones and Raw Food*) koncept hranjenja, čiji akronim danas češće prevodi kao *Biologically Appropriate Raw Food* (biološki usklađena sirova hrana). Hranidba pasa BARF obrokom temelji se na predator – plijen sustavu hranjenja, pri čemu se u obrok uključuju isključivo namirnice bez termičke obrade koje bi se u prirodi nalazile u režimu hranjenja predatora, vuka (Stahler i sur., 2006). Obrok se formulira na način da odražava sastav ulovljenog plijena te

se uobičajeno sastoji od: mišićja, unutarnjih organa, hrskavice i kosti te izvora vlaknine u obliku povrća ili voća, pri čemu se često slijedi omjer dodavanja pojedinih komponenata u približnim udjelima od: 80% mišićja, 10% kosti, 5% jetre i 5% ostalih sekretornih organa. Kroz BARF koncept prehrane, psi se, poput mačaka, uvrštavaju u obvezne mesojede te se od strane pobornika BARF prehrane ugljikohidratna komponenta u obroku smatra nepoželjnom i štetnom (Billinghurst, 2003).

SASTAV OBROKA NA OSNOVI SIROVOG MESA

Obroci na osnovi sirovog mesa definišu se kao hrana za kućne ljubimce koja u svom sastavu sadrži termički neobrađene sirovine životinjskog podrijetla, domaćih ili divljih životinja (Freeman i sur., 2013). Hranidba na temelju sirovog mesa može se podijeliti na dvije osnovne kategorije: komercijalno pripremljena i ona kućne izrade (tzv. *homemade*). Kod kuće spravljeni obroci temelje se na recepturama i omogućuju vlasniku njihovo samostalno pripremanje. No, objavljene recepture ne moraju biti u skladu s propisanim preporukama o unosu hranjivih tvari (Streiff i sur., 2002, Dillitzer i sur., 2011). Nutritivno neuravnoteženi obroci mogu dovesti do razvoja brojnih patoloških stanja uzrokovanih pogreškama u hranidbi (Taylor i sur. 2009, Heinze i sur., 2012, Larsen i sur., 2012, Stockman i sur., 2013).

Najčešći izbor vlasnika kućnih ljubimaca jesu komercijalni zamrznuti pripravci BARF obroka, koji su često deklarirani kao uravnotežena i potpuna hrana za kućne ljubimce (NRC, 2006). Formulacije koje su uravnotežene

i deklarirane kao potpuni obrok za sve dobi i pasmine, moraju biti uravnotežene i u skladu sa potrebama za hranjivim tvarima kod pasa velikih i gigantskih pasmina u ranoj fazi razvoja (Hazewinkel i sur., 1991, FEDIAF, 2018). Navedeno će uvjetovati dodatak kalcija i fosfora, uobičajeno uključenog u obliku mljevenih kosti, u omjeru od 1,1-1,6 : 1 te zastupljenost mnogih vitamina, makrominerala i elemenata u tragovima u višim koncentracijama no što je propisano za obroke za odrasle pse (FEDIAF, 2018). Sastav komercijalnih pripravaka BARF obroka ovisno o osnovnoj recepturi proizvođača, sirovinama koji se koriste i postupcima u proizvodnji mogu se značajno razlikovati (Freeman i sur., 2013). Komercijalni pripravci BARF obroka za pse često su dostupni u trgovinama hrane za kućne ljubimce no formulacije istog koncepta namjenjene mačkama rijetko se mogu naći na tržištu u obliku gotovog proizvoda, stoga se vlasnici mačaka, koji ih žele hraniti BARF obrokom, češće služe dostupnim recepturama i samostalno izrađuju sirovi obrok.

PROBAVLJIVOST BARF OBROKA

Istraživanjima je utvrđena bolja probavljivost sirove bjelačevine kod sirovog obroka u usporedbi s termički obrađenim čime se dokazuje bolja probavljivost BARF obroka u usporedbi sa hranom koja prolazi termičku obradu uvjetovanu proizvodnim postupkom (ekstruzija ili konzerviranje) (Crissey i sur., 1997, Vester i sur., 2010, Kerr i sur., 2012). Na probavljivost utječe mnoštvo faktora koji su prisutni u procesu proizvodnje hrane za kućne ljubimce: sastav, temperatura u procesu obrade i način obrade: kuhanje, konzerviranje i

ekstrudiranje. Naime, termičkom obradom, a tako i ostalim procesima koji su uključeni u ekstrudiranje (vlaga i tlak), proteini i aminokiseline prolaze kroz strukturne promjene koje imaju utjecaj na probavljivost proteina i biološku dostupnost aminokiselina ili može doći do Maillardove reakcije, pri čemu će nastati reakcija slobodne aminoskupine i karbonilnog spoja (Friedman, 1996, Hendriks i sur., 1999, Rutherford i sur., 2007). Bolja probavljivost BARF formulacija rezultat će manjom količinom fecesa (Vester i sur. 2010).

UTJECAJ NA ZDRAVSTVENI STATUS ŽIVOTINJE

Pozitivni učinci koji se pripisuju BARF konceptu hranjenja često uključuju: pozitivan

utjecaj na imunski odgovor, zdravlje dlačnog pokrivača i kože, smanjenje plaka i zubnog

Brozić i sar:

Korištenje obroka na osnovi sirovog mesa (BARF) u hranidbi pasa i mačaka

kamenca, bolju aktivnost i opće stanje životinje (Morgan i sur., 2017). Hranidba BARF obrocima nije praćena kroz dugoročna znanstvena istraživanja, stoga se uz oprez mora govoriti o potencijalnom pozitivnom učinku hranjenja sirovim obrokom (*Schlesinger i Joffe*, 2011). Međutim, izrazito visoka probavljivost i jednostavan sastav BARF obroka, često sa samo jednim izvorom bjelancevina, i stoga potencijalnim alergenom, može rezultirati dobrim terapijskim odgovorom uslijed kožne ili gastrointestinalne manifestacije alergije, pod uvjetom da životinja nije alergična na protein iz sastava (Brozić i sur., 2017). BARF koncept hranjenja temelji se na uključivanju sirovih kosti

u obrok te se one često dodaju u obliku mljevenih kosti u komercijalne pripravke. Hranjenje pasa i mačaka termički neobrađenim cijelim kostima ne može se smatrati u potpunosti bez rizika jer one mogu predstavljati potencijalan opasnost od razvoja opstipacije i perforacije unutar probavnog sustava, ozljeđaju zubi i usne šupljine (Thompson i sur., 2012). Prilikom izrade BARF obroka ključno je da u sastav ne ulaze rizične sirovine, poput tkiva štitne žlijezde, u slučaju da proizvođač koristi mišićje glave i vrata. Prehrana BARF obrokom sa tkivom štitnjače može rezultirati razvojem hipertireoidizma uzrokovanog hranom (Kohler i sur., 2012).

MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST BARF OBROKA

Dosad provedenim istraživanjima utvrđen je značajan rizik od mikrobiološke neispravnosti kod komercijalnih i kod kuće pripremljenih BARF obroka (*Lejeune i Hancock* 2001, *Joffe i Schlesinger*, 2002, *Weese i sur.*, 2005). No, i termički obrađena hrana za kućne ljubimce također može biti izvorom patogena sa zoonotskim potencijalom i na taj način predstavljati rizik za infekciju ljudi (Behravesht i sur., 2010, *Nemser i sur.*, 2014). Posebno je opasna tvrdnja, koja se često promiče od strane pobrobnika BARF režima prehrane, kako patogeni u sirovom mesu ne predstavljaju rizik za kućne ljubimce, pse ili mačke, jer je njihov probavni sustav prilagođen hranjenju sirovim mesom. Naime, mnogobrojna su istraživanja koja potvrđuju kliničku manifestaciju salmoneloze zabilježene kod pasa hranjenih sirovim mesom (*Chengappa i sur.*, 1993, *Stiver i sur.*, 2003, *Morley i sur.*, 2006, *Leonard i sur.*, 2011). Kao i kod ljudi, na prijenos i manifestaciju kliničke slike, utjecati će mnogi faktori, među kojima i skupno držanje životinja, dob i imunostatus životinje (*Hellgren i sur.*, 2019). Dodatno, incidencija pozitivnog nalaza

patogena *Salmonella spp.* povezana je sa vrstom mesa: koja je kod pilećeg mesa znatno veća od mesa govedine i svinjetine (*Zhao i sur.*, 2002, *Bohaychuk i sur.*, 2006, *Mollenkopf i sur.*, 2011, *Cook i sur.*, 2012). Pored uzročnika *Salmonella spp.*, patogeni čija se važnost naglašava u kontroli mikrobiološke ispravnosti BARF obroka jesu: *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium spp.*, *Campylobacter jejuni* i *Listeria spp.* (*Freeman i Michel*, 2001, *Weese i sur.*, 2005, *Strohmeyer i sur.*, 2006, *Bohaychuk i sur.*, 2006, *Lenz i sur.*, 2009). Kontaminacija parazitima u mesu i ribi može se kontrolirati postupkom zamrzavanja. Vrijeme i temperatura pri kojoj se postupak može provesti ovisi o vrsti parazita i vrsti mesa koja se koristi u formulacijama (*Kotula i sur.*, 1991, *Huss i sur.*, 2000). Zbog rizika od mikrobiološke kontaminacije nusproizvoda životinjskog podrijetla, proizvođači BARF obroka u procesu proizvodnje mogu koristiti obradu putem visokog hidrostatskog tlaka čime je moguće smanjiti broj patogena u mesu no ne u potpunosti (*Aymerich i sur.*, 2008, *Baert i sur.*, 2009).

SMJERNICE ZA HRANIDBU KUĆNIH LJUBIMACA BARF OBROKOM

Javnozdravstveni rizik, kao rezultat korištenja BARF obroka, prisutan je za vlasnike i ostale članove kućanstva koji svakodnevno postaju izloženi kontaktnom prijenosu patogenih mikroorganizama prisutnih u sirovom mesu (*Lejeune i Hancock, 2001*). Moguća je i kontaminacija okoliša kao posljedica izlučivanja uzročnika iz organizma domaćina pri čemu kućni ljubimac može biti asimptomatski kliconoša (*Finley i sur., 2006*). Navedeno je od posebnog značaja za imunokompromitirane osobe, djecu i starije ukućane te trudnice koji borave uz ljubimca (*Finley i sur., 2006, Kukanich, 2011*). Stoga je od iznimne važnosti upozoriti vlasnike na rizike koji su prisutni kod hranjenja pasa i mačaka BARF obrokom i dati im smjernice za što sigurnije korištenje. Pri tome je ključno staviti naglasak na važnost higijene okoliša i osobne higijene članova kućanstva koji dolaze u kontakt s BARF obrokom i kućnim ljubimcem, provođenje osobne higijene (pranje ruku) te pranje i dezinfekcija zdjelica vode i hrane i provođenje higijene kućanstva. Poseban naglasak bitno je staviti na onemogućavanje feko-oralnog kontakta, ili kontakta odmah nakon hranjenja kada postoji najveći rizik za kontaktni prijenos patogena. Vlasnika je potrebno upozoriti da redovito kontrolira parazitske bolesti psa i/ili mačke koprološkom pretragom stolice. Bitno je upozoriti vlasnika da BARF obrok kupuje od provjerenog i registriranog proizvođača, čiji su proizvodi u skladu sa propisanim smjernicama o razini hranjivih tvari u hrani za kućne ljubimce (*NRC, 2006, FEDIAF, 2018*). Nadalje, ako je odabir vlasnika hranjenje kućnog ljubimca prema recepturi (tzv.

homemade BARF) uz samostalno pripremanje obroka, važno je upozoriti na važnost hranjenja obrokom koji je uravnotežen i koji se temelji na recepturi izrađenoj od kvalificiranih stručnjaka u području prehrane kućnih ljubimaca, kako bi se izbjegle greške u hranidbi: suficit i/ili deficit hranjivih tvari, poglavito makrominerala, elemenata u tragovima i vitamina. Od važnosti je i upozoriti na potencijalan zdravstveni rizik ovakvog načina hranjenja te procijeniti koje životinje nisu kandidati za prehranu BARF formulacijama: životinje s bubrežnom i jetrenom patologijom, povijest pankreatitisa, gigantske pasmine pasa u ranoj fazi rasta, pacijenti narušenog imunosnog statusa, narušena peristaltika probavnog sustava ako su u formulaciju dodane mljevene kosti (*Brozić i sur., 2017*). Prilikom boravka osoba narušenog imunosnog statusa, djece, starijih, trudnica te žena koje doje u kućanstvu, potrebno je upozoriti na visok rizik od širenja i prijenosa mikroorganizama i parazita sa zoonotskim potencijalom. Dodatno, proizvođači bi u uputama korištenja svojih proizvoda morali istaknuti pravilan postupak prilikom rukovanja i pripremanja obroka koji bi uključivao: postupak odmrzavanja na temperaturi do 10°C i postupak pripreme kada će se odmrzavati dio obroka koji će se neposredno nakon odmrzavanja iskoristiti. Bitno je upozoriti da se jednom odmrznuto pakiranje BARF obroka ne zamrzava ponovno. Kod hranjenja, obrok u zdjelici za hranjenje treba biti što kraće te, ako životinja odbija jesti, obrok je potrebno ukloniti (*Hellgren i sur., 2018*).

LITERATURA

1. Aymerich T., Picouet P. A., Monfort J. M. (2008): *Decontamination technologies for meat products*. Meat. Sci. 78, 114-129.
2. Baert L., Debevere J., Uyttendaele M. (2009): *The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses*. Int. J. Food Microbiol. 131, 83-94.

3. Behravesh C. B., Ferraro A., Deasy M., Dato V., Moll M., Sandt C., Rea N. K., Rickert R., Marriott C., Warren K., Urdaneta V., Salehi E., Villamil E., Ayers T., Hoekstra R. M., Austin J. L., Ostroff S., Williams I. T. (2010): *Human Salmonella infections linked to contaminated dry dog and cat food, 2006-2008*. Pediatrics 126, 477–483.
4. Billingham I. (1993): *Give your dog a bone: the practical commonsense way to feed dogs for a long healthy life*. Australia: Bridge Printery Ian Billingham. Alexandria, NSW.
5. Bohaychuk V. M., Gensler G. E., King R. K., Manninen K. I., Sorensen O., Wu J. T., Stiles M. E., McMullen L. M. (2006): *Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada*. J. Food Prot. 69, 2176–2182.
6. Brozić D., Mikulec Ž., Valpotić H. (2017): *Hranidba pasa i mačaka obrocima na osnovi sirovog mesa: prednosti i rizici*. Hrvatski veterinarski vjesnik. 25, 40–48.
7. Chengappa M. M., Staats J., Oberst R. D., Gabbert N. H., Mcvey S. (1993): *Prevalence of Salmonella in raw meat used in diets of racing greyhounds*. J. Vet. Diagn. Invest. 5, 372–377.
8. Cook A., Odumeru J., Lee S., Pollari F. (2012): *Campylobacter, Salmonella, Listeria monocytogenes, verotoxigenic Escherichia coli, and Escherichia coli prevalence, enumeration, and subtypes on retail chicken breasts with and without skin*. J. Food Prot. 75, 34–40.
9. Corbee R.J., Breed R.D., Hazewinkel H.A.W. (2013): *Feeding practice of dog owners active on internet forums. 17th European Society of Veterinary and Comparative Nutrition Congress*, Sep 19–21. Ghent, Belgium.
10. Crissey S. D., Swanson J. A., Lintzenich B. A., Brewer B. A., Slifka K. A. (1997): *Use of a raw meat-based diet or a dry kibble diet for sand cats (Felis margarita)*. J. Anim. Sci. 75, 2154–2160.
11. Dillitzer N., Becker N., Kienzle E. (2011): *Intake of minerals, trace elements and vitamins in bone and raw food rations in adult dogs*. Br. J. Nutr. 106, 53–56.
12. European Pet Food Industry Federation (FEDIAF) (2018): *Nutritional Guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs*. FEDIAF, Brussels, Belgija.
13. Finley R., Reid-Smith R., Weese J. S., Angulo F. J. (2006): *Human health implications of Salmonella-contaminated natural pet treats and raw pet food*. Clin. Infect. Dis. 42, 686–691.
14. Freeman L. M., Chandler M. L., Hamper B. A., Weeth L. P. (2013): *Current knowledge about the risks and benefits of raw meat-based diets for dogs and cats*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 243, 1549–1558.
15. Freeman L. M., Michel K. E. (2001): *Evaluation of raw food diets for dogs*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218, 705–709.
16. Friedman M. (1996): *Food Browning and Its Prevention: An Overview*. J. Agric. Food Chem. 44, 631–653.
17. Hazewinkel H. A., Van Den Brom W. E., Van T. K. A. T., Voorhout G., Van Wees A. (1991): *Calcium metabolism in Great Dane dogs fed diets with various calcium and phosphorus levels*. J. Nutr. 121, 99–106.
18. Heinze C. R., Gomez F. C., Freeman L. M. (2012): *Assessment of commercial diets and recipes for home-prepared diets recommended for dogs with cancer*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 241, 1453–1460.

19. Hellgren J., Hästö L. S., Wikström C., Fernström L., Hansson I. (2019): *Occurrence of Salmonella, Campylobacter, Clostridium and Enterobacteriaceae in raw meat-based diets for dogs*. Veterinary Record, Vet. Rec.
20. Hendriks W., Emmens M., Trass B., Pluske J. (1999): *Heat processing changes the protein quality of canned cat foods as measured with a rat bioassay*. J. Anim. Sci. 77, 669.
21. Huss H. H., Reilly A., Ben Embarek K. (2000): *Prevention and control of hazards in seafood*. Food control 11, 149–156.
22. Joffe D. J., Schlesinger D. P. (2002): *Preliminary assessment of the risk of Salmonella infection in dogs fed raw chicken diets*. Can. Vet. J. 43, 441–442.
23. Kerr K. R., Vester Boler B. M., Morris C. L., Liu K. J., Swanson K. S. (2012): *Apparent total tract energy and macronutrient digestibility and fecal fermentative end-product concentrations of domestic cats fed extruded, raw beef-based, and cooked beef-based diets*. J. Anim. Sci. 90, 515–522.
24. Kohler B., Stengel C., Neiger R. (2012): *Dietary hyperthyroidism in dogs*. J. Small. Anim. Pract. 53, 182–184.
25. Kotula A. W., Dubey J. P., Sharar A. K., Andrews C. D., Shen S. K., Lindsay D. S. (1991): *Effect of freezing on infectivity of Toxoplasma gondii tissue cysts in pork*. Journal of Food Protection, 54, 687–690.
26. Kukanich K. S. (2011): *Update on Salmonella spp contamination of pet food, treats, and nutritional products and safe feeding recommendations*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 238, 1430–1434.
27. Larsen J. A., Parks E. M., Heinze C. R., Fascetti A. J. (2012): *Evaluation of recipes for home-prepared diets for dogs and cats with chronic kidney disease*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 240, 532–538.
28. Lejeune J. T., Hancock D. D. (2001): *Public health concerns associated with feeding raw meat diets to dogs*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 219, 1222–1225.
29. Lenz J., Joffe D., Kauffman M., Zhang Y., Lejeune J. (2009): *Perceptions, practices, and consequences associated with foodborne pathogens and the feeding of raw meat to dogs*. Can. Vet. J. 50, 637–643.
30. Leonard E. K., Pearl D. L., Finley R. L., Janecko N., Peregrine A. S., Reid-Smith R. J., Weese J. S. (2011): *Evaluation of pet-related management factors and the risk of Salmonella spp. carriage in pet dogs from volunteer households in Ontario (2005-2006)*. Zoonoses Public Health 58, 140–149.
31. Mollenkopf D. F., Kleinhenz K. E., Funk J. A., Gebreyes W. A., Wittum T. E. (2011): *Salmonella enterica and Escherichia coli harboring bla_{CMY} in retail beef and pork products*. Foodborne Pathog. Dis. 8, 333–336.
32. Morgan S.K., Willis S., Shepherd M. L. (2017): *Survey of owner motivations and veterinary input of owners feeding diets containing raw animal products*. Peer J. 5, 303
33. Morley P. S., Strohmeyer R. A., Tankson J. D., Hyatt D. R., Dargatz D. A., Fedorka-Cray P. J. (2006): *Evaluation of the association between feeding raw meat and Salmonella enterica infections at a Greyhound breeding facility*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 228, 1524–1532.
34. National Research Council (2006): *Nutrient requirements of dogs and cats*. National Academies Press. Washington, DC.

35. Nemser S. M., Doran T., Grabenstein M., Mcconnell T., Mcgrath T., Pamboukian R., Smith A. C., Achen M., Danzeisen G., Kim S., Liu Y., Robeson S., Rosario G., Mcwilliams Wilson K., Reimschuessel R. (2014): *Investigation of Listeria, Salmonella, and toxigenic Escherichia coli in various pet foods*. Foodborne Pathog. Dis. 11, 706–709.
36. Rutherford S. M., Rutherford-Markwick K. J., Moughan P. J. (2007): *Available (ileal digestible reactive) lysine in selected pet foods*. J. Agric. Food Chem. Discipline 55, 3517–3522.
37. Schlesinger D. P., Joffe D. J. (2011): *Raw food diets in companion animals: a critical review*. Can. Vet. J. 52, 50–54.
38. Stahler D. R., Smith D. W., Guernsey D. S. (2006): *Foraging and feeding ecology of the gray wolf (Canis lupus): lessons from Yellowstone National Park, Wyoming, USA*. J. Nutr. 136, 1923–1926.
39. Stiver S. L., Frazier K. S., Mauel M. J., Styer E. L. (2003): *Septicemic salmonellosis in two cats fed a raw-meat diet*. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 39, 538–542.
40. Stockman J., Fascetti A. J., Kass P. H., Larsen J. A. (2013): *Evaluation of recipes of home-prepared maintenance diets for dogs*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 242, 1500–1505.
41. Streiff E., Zwischenberger L. B., Butterwick R. F., Wagner E., Iben C., Bauer J. E. (2002): *A comparison of the nutritional adequacy of home-prepared and commercial diets for dogs*. J. Nutr. 132, 1698–1700.
42. Strohmeyer R. A., Morley P. S., Hyatt D. R., Dargatz D. A., Scorza A. V., Lappin M. R. (2006): *Evaluation of bacterial and protozoal contamination of commercially available raw meat diets for dogs*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 228, 537–542.
43. Taylor M. B., Geiger D. A., Saker K. E., Larson M. M. (2009): *Diffuse osteopenia and myelopathy in a puppy fed a diet composed of an organic premix and raw ground beef*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 234, 1041–1048.
44. Thompson H. C., Cortes Y., Gannon K., Bailey D., Freer S. (2012): *Esophageal foreign bodies in dogs: 34 cases (2004-2009)*. J. Vet. Emerg. Crit. Care. (San Antonio) 22, 253–261.
45. Vester B. M., Burke S. L., Liu K. J., Dikeman C. L., Simmons L. G., Swanson K. S. (2010): *Influence of feeding raw or extruded feline diets on nutrient digestibility and nitrogen metabolism of African wildcats (Felis lybica)*. Zoo. Biol. 29, 676–686.
46. Weese J. S., Rousseau J., Arroyo L. (2005): *Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets*. Can. Vet. J. 46, 513–516.
47. Zhao T., Doyle M. P., Fedorka-Cray P. J., Zhao P., Ladely S. (2002): *Occurrence of Salmonella enterica serotype typhimurium DT104A in retail ground beef*. J. Food Prot. 65, 403–407.

Rad primljen: 08.10.2019.

Rad prihvaćen: 01.12.2019.

DOI 10.7251/VETJEN1902314B

UDK 636.7.083+636.8.083]:637.5.05

*Original scientific paper***RAW MEAT-BASED DIET (BARF) IN DOGS AND CATS NUTRITION****Diana BROZIĆ^{1*}, Željko MIKULEC¹, Marko SAMARDŽIJA², Dražen ĐURIČIĆ³, Hrvoje VALPOTIĆ²**¹Department of Nutrition and Dietetics in Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, Croatia²Clinics of Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, Croatia³Veterinary Station Đurđevac, Đurđevac, Croatia

*Corresponding author: Diana Brozić, e-mail: diana.brozić@vef.hr

Abstract: Diet based on raw meat or more popularly called BARF (*Biologically Appropriate Raw Food*) is defined as pet food diet that is composed of thermally untreated animal products that are either derived from wild or domestic animals and is used as a pet food diet for pets in households. Raw meat-based diet can be divided into two basic categories: commercially available finished products and diet prepared by pet owner (called *homemade* BARF). Homemade diets are based on recipes that are enabling the owner to self prepare the diet. Nevertheless, the recipes used do not have to be in coordinance with official recommendations that could potentially result in the development of pathologies as a result of nutrient imbalances. The lack of good quality studies has resulted in a general discussion on the subject of the potential risks and benefits that arise from this feeding practice. Studies have determined higher digestibility and excellent palatability of BARF diets. Nevertheless, studies that would prove beneficial effects of BARF diet on health or as a diet of choice for certain pathologies are lacking. The proponents of BARF diets base their recommendation on studies conducted on a small sample over a short period of time, or on popular publications that have not undergone peer review. On the other hand, research based on evaluation of infectious disease risks when feeding a BARF diet, is of the better quantity and quality. Namely, microbiological safety of BARF diets is a crucial segment that manufacturers are obligated to control with the additional control of all other production procedures (cold chain in all phases of production and storage) to minimize the contamination with zoonotic pathogens.

Key words: BARF, pets, nutrition, guidelines

INTRODUCTION

In recent years, the trend of feeding dogs and cats with BARF (*Biologically appropriate raw food*) diet has become increasingly popular, besides the usual feeding with extruded or canned diet. It is estimated that the number of pet owners who feed their dogs wholly or partly on raw meat diet in some European countries reaches up to 51 % (Corbee et al., 2013). Products containing animal by-products and not subjected to heat treatment can be divided into three groups: so called chews (porcine ears, veins, tendons), raw meat based homemade diets (so called *homemade* BARF) and commercial BARF preparations that include muscle tissue, internal organs and bones and sometimes unpasteurized dairy products and eggs (Freeman et al., 2013). Additionally, various vitamins and mineral supplements, oil, fruits and vegetables can be included in BARF diet. Pet owners who choose the BARF feeding regimen often do so because they consider it to be a natural product without added preservatives or stabilizers and without added

carbohydrates, which as a result would have positive effects on health and general condition of the pet (Morgan et al., 2017). However, still without scientific evidence, the motivation and choice to feed a BARF diet is often based in the personal experience of the pet owner or manufacturer (Freeman et al., 2013, Morgan et al., 2017). Inconsistency within veterinary profession is the result of the lack of research that would answer the questions related to the level of potential risk or, on the other hand, confirm the positive effects of this feeding form and the indication of its use in diseased animals. Research that indicates on public health risks when feeding pets with a raw diet is more numerous, emphasizing the need for responsible behaviors as a result of using a raw diet in householders. The consequence of the inconsistency in attitudes related to benefits and risks of pet feeding with raw diets is a larger amount of unclear and contradictory information available to pet owners and veterinarians.

FEEDING DOGS AND CATS WITH RAW MEAT-BASED DIETS

The most widespread concept of raw meat-based diet is BARF (Bones and Raw Food) diet concept, whose acronym is now more commonly translated as *Biologically Appropriate Raw Food*. BARF diet for dogs is based on a predator-prey feeding pattern, whereby only non-heat-treated foods that are naturally in the predator i.e. wolf feeding regime are included in the diet (Stahler et al., 2006). The diet is formulated to reflect the composition of the prey caught and is usually composed of muscle, internal organs,

cartilage, bones and a source of fiber in the forms of vegetables or fruits. Usually the ratio of individual components is in approximate proportion of 80% of muscles, 10% bones, 5% liver and 5% other secretory organs. Through the BARF concept of diet, dogs are, like cats, included as obligatory carnivores and, by the proponents of BARF diet, the carbohydrate component in the diet is considered undesirable and harmful (Billinghurst, 2003).

RAW MEAT-BASED DIET COMPOSITION

Raw meat-based diets are defined as pet food containing thermally untreated products of either domestic or wild animals' origin (Freeman et al., 2013). Diet based on raw meat can be divided

into two basic categories: commercially prepared and prepared by pet owner (so called *homemade*). Diets made at home are based on recipes and allow the owner to prepare them by

himself. However, used recipes do not have to be in coordinance with official recommendations related to prescribed nutrient intake recommendations (Streiff et al., 2002, Dillitzer et al., 2011). Nutritionally unbalanced diets can lead to the development of numerous path-ological states caused by feeding disturbances (Taylor et al. 2009, Heinze et al., 2012, Larsen et al., 2012, Stockman et al., 2013).

Commercial frozen BARF diets, which are usually *declared* as balanced and complete pet diets, are most commonly chosen by pet owners (NRC, 2006). Balanced formulations that are declared as complete diets for all ages and breeds, must be balanced and in accordance with the nutrient requirements of large and giant dog breeds at an early stage of development (Hazewinkel et

al., 1991, FEDIAF, 2018). This will lead to the addition of calcium and phosphorous, usually included in the form of ground bones in the ratio of 1.1-1.6:1, and the presence of many vitamins, macro-minerals and trace elements at higher concentrations than prescribed for adult dog diets (FEDIAF, 2018). The composition of commercial BARF diet may vary significantly, due to manufacturer's basic recipe, used raw material and production process (Freeman et al., 2013). Commercially prepared BARF diets for dogs are often available in pet shops. On the other hand, formulations of the same concept for cats are rarely available on the market as finished products, so cat owners who want to feed cats with BARF diets usually use available recipes and prepare diets by themselves.

BARF DIET DIGESTIBILITY

Studies have confirmed a better digestibility of crude protein in raw diet compared to heat treated one, thus proving a better digestibility of a BARF diet compared to foods undergoing a heat treatment process (extrusion or canning) (Crissey et al., 1997, Vester et al., 2010, Kerr et al., 2012). Digestibility is influenced by many factors that are present in the pet food production process: composition, processing temperature and processing method: cooking, caning and extrusion. Namely, by thermal treatment, as well as

processes involved in extrusion (moisture and pressure), proteins and amino acids undergo structural changes that affect the digestibility of proteins and the bioavailability of amino acids, or may result in Maillard reaction, which will result in a reaction of free amino groups and the carbonyl compound (Friedman, 1996, Hendriks et al., 1999, Rutherford et al., 2007). Better digestibility of BARF formulations will result in less feces production (Vester et al., 2010).

IMPACT ON ANIMAL'S HEALTH STATUS

Positive effects attributed to the BARF concept of feeding often include: a positive effect on immune response, the coat and skin health, reduction of dental plaque and tartar, better activity and general condition of animal (Morgan et al., 2017). BARF diet feeding has not been monitored through long-term scientific research, so potential positive effect of feeding with raw diet should be considered with caution (*Schlesinger and Joffe*, 2011). However, the extremely high digestibility and simple composition of BARF

diet, often with only one source of protein, as a potential allergen, can result in a good therapeutic response due to the skin or gastrointestinal manifestation of the allergy, provided the animal is not allergic to the protein from the composition (Brozić et al., 2017). The BARF feeding concept is based in the incorporation of raw bones into the diet and these are often added in the form of ground bones to commercial preparations. Feeding dogs and cats with thermally untreated whole bones cannot be considered

completely risk free, since they can be a potentially dangerous due to constipation and perforation within digestive system as well as teeth and the oral cavity injuries (Thompson et al., 2012). When making a BARF diet, it is crucial that no hazardous raw materials, such as thyroid tissue,

are included in the composition, if the manufacturer uses muscle of head and neck. Eating a BARF diet with thyroid tissue can result in the development of food induced hyperthyroidism (Kohler et al., 2012).

MICROBIOLOGICAL SAFETY OF BARF DIET

The research conducted so far has identified a significant risk of microbial malfunction in commercial and home prepared BARF diets (Lejeune and Hancock 2001, Joffe and Schlesinger, 2002, Weese et al., 2005). However, thermally treated pet food can also be a source of pathogen with zoonotic potential and thus be a risk for human infection (Behravesh et al., 2010, Nemser et al., 2014). Particularly dangerous is the claim, often promoted by BARF diet proponents, that pathogenic in raw meat are not a risk to pets, dogs and cats, since their digestive system is adapted to raw meat feeding. Namely, numerous studies confirming the clinical manifestation of salmonellosis have been reported in dogs that were fed with raw meat (Chengappa et al., 1993, Stiver et al., 2003, Morley et al., 2006, Leonard et al., 2011). As with humans, the transmission and manifestation of the clinical signs will be influenced by many factors including breeding of animals in group, age and immune status of animal (Hellgren et al., 2019). Additionally, the incidence of *Salmonella*

spp. is associated with meat type which is significantly higher in chicken meat than beef and pork meat (Zhao et al., 2002, Bohaychuk et al., 2006, Mollenkopf et al., 2011, Cook et al., 2012). Besides causative agent *Salmonella spp.*, pathogens that are important in controlling the microbiological safety of BARS rations are: *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium spp.*, *Campylobacter jejuni* and *Listeria spp.* (Freeman and Michel, 2001, Weese et al., 2005, Strohmeier et al., 2006, Bohaychuk et al., 2006, Lenz et al., 2009). Parasite contamination in meat and fish can be controlled by the freezing process. The time and temperature at which the procedure can be performed depends on the type of parasite and of the meat used in the formulations (Kotula et al., 1991, Huss et al., 2000). Due to the risk of microbial contamination of animal by-products, producers of BARF diet may use high hydrostatic pressure treatment in the production process, which may reduce, although not completely, the number of pathogens in meat (Aymerich et al., 2008, Baert et al., 2009).

GUIDELINES FOR PETS FEEDING WITH BARF DIET

Public health risk, as a result of a BARF diet use, is present for owners and other household members who are exposed to the contact transmission of raw meat pathogenic microorganisms on daily basis (Lejeune and Hancock, 2001). Environmental contamination is also possible as a result of the excretion of the pathogens from the host organism whereby the pet may be an asymptomatic carriers (Finley et al., 2006). It is

of particular importance for immunocompromised persons, children and the elderly, as well as pregnant women that live surrounded by pets (Finley et al., 2006, Kukanich, 2011). It is therefore of crucial importance to alert owners to the risk related to feeding dogs and cats with BARF diet and to give them guidance on how to use them safely. It is crucial to emphasize the importance of environmental and personal hygiene for household members who are in contact with

BARF diet and pet, the conduct of personal hygiene (hand washing), and the washing and disinfection of water and food bowls as well as household. Particular emphases are on disabling fecal-oral contact, or contact immediately after feeding, when there is the greatest risk of contact transmission of the pathogen. The owner should be warned to regularly control parasitic diseases of the dog and/or cat by a coprological examination. It is important to warn the owner to purchase the BARF diet from a verified and registered manufacturer, whose products comply with the prescribed nutrient content of the pet food (NRC, 2006, FEDIAF, 2018). Furthermore, if pet owner chooses to feed pet according to the recipe (so called *homemade* BARF) with self-prepared diet, it is important to take care that balanced diet based on recipe is made by qualified experts in the field of pet nutrition, in order to avoid mistakes in nutrition such as surplus and/or nutrient deficiency, in particular macrominerals, trace elements and vitamins. It is also important to warn them of the potential health risks of this feeding method and to evaluate which animals are not candidates for BARF for-

mulations: animals with renal and hepatic pathology, history of pancreatitis, giant dog breeds in early stage of growth, patients with impaired immune status, animals with impaired digestive system function caused by addition of ground bones to the formulation (Brozić et al., 2017). During the stay of people with impaired immune status, children, the elderly, pregnant women and women who are breastfeeding in the household, it is necessary to warn them about the high risk of spread and transmission of microorganisms and parasites with zoonotic potential. In addition to that, manufacturers should indicate in the instructions for use of their products the proper procedure for handling and preparing the meal which would include: a defrosting procedure on temperature of 10°C, and a preparation procedure for defrosting a portion of the diet to be used immediately after defrosting. It is important to warn them that once a defrosted package of BARF diet is not frozen again. When feeding, the diet in the feeding bowl should be as short as possible and, if the animal refuses to eat, the diet should be removed (Hellgren et al., 2018).

REFERENCES

1. Aymerich T., Picouet P. A., Monfort J. M. (2008): *Decontamination technologies for meat products*. Meat. Sci. 78, 114–129.
2. Baert L., Debevere J., Uyttendaele M. (2009): *The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses*. Int. J. Food Microbiol. 131, 83–94.
3. Behravesh C. B., Ferraro A., Deasy M., Dato V., Moll M., Sandt C., Rea N. K., Rickert R., Marriott C., Warren K., Urdaneta V., Salehi E., Villamil E., Ayers T., Hoekstra R. M., Austin J. L., Ostroff S., Williams I. T. (2010): *Human Salmonella infections linked to contaminated dry dog and cat food, 2006-2008*. Pediatrics 126, 477–483.
4. Billingham I. (1993): *Give your dog a bone: the practical commonsense way to feed dogs for a long healthy life*. Australia: Bridge Printery Ian Billingham. Alexandria, NSW.
5. Bohaychuk V. M., Gensler G. E., King R. K., Manninen K. I., Sorensen O., Wu J. T., Stiles M. E., McMullen L. M. (2006): *Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada*. J. Food Prot. 69, 2176–2182.
6. Brozić D., Mikulec Ž., Valpotić H. (2017): *Hranidba pasa i mačaka obrocima na osnovi sirovog mesa: prednosti i rizici*. Hrvatski veterinarski vjesnik. 25, 40–48.

7. Chengappa M. M., Staats J., Oberst R. D., Gabbert N. H., Mcvey S. (1993): *Prevalence of Salmonella in raw meat used in diets of racing greyhounds*. J. Vet. Diagn. Invest. 5, 372–377.
8. Cook A., Odumeru J., Lee S., Pollari F. (2012): *Campylobacter, Salmonella, Listeria monocytogenes, verotoxigenic Escherichia coli, and Escherichia coli prevalence, enumeration, and subtypes on retail chicken breasts with and without skin*. J. Food Prot. 75, 34–40.
9. Corbee R.J., Breed R.D., Hazewinkel H.A.W. (2013): *Feeding practice of dog owners active on internet forums. 17th European Society of Veterinary and Comparative Nutrition Congress*, Sep 19–21. Ghent, Belgium.
10. Crissey S. D., Swanson J. A., Lintzenich B. A., Brewer B. A., Slifka K. A. (1997): *Use of a raw meat-based diet or a dry kibble diet for sand cats (Felis margarita)*. J. Anim. Sci. 75, 2154–2160.
11. Dillitzer N., Becker N., Kienzle E. (2011): *Intake of minerals, trace elements and vitamins in bone and raw food rations in adult dogs*. Br. J. Nutr. 106, 53–56.
12. European Pet Food Industry Federation (FEDIAF) (2018): *Nutritional Guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs*. FEDIAF, Brussels, Belgija.
13. Finley R., Reid-Smith R., Weese J. S., Angulo F. J. (2006): *Human health implications of Salmonella-contaminated natural pet treats and raw pet food*. Clin. Infect. Dis. 42, 686–691.
14. Freeman L. M., Chandler M. L., Hamper B. A., Weeth L. P. (2013): *Current knowledge about the risks and benefits of raw meat-based diets for dogs and cats*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 243, 1549–1558.
15. Freeman L. M., Michel K. E. (2001): *Evaluation of raw food diets for dogs*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218, 705–709.
16. Friedman M. (1996): *Food Browning and Its Prevention: An Overview*. J. Agric. Food Chem. 44, 631–653.
17. Hazewinkel H. A., Van Den Brom W. E., Van T. K. A. T., Voorhout G., Van Wees A. (1991): *Calcium metabolism in Great Dane dogs fed diets with various calcium and phosphorus levels*. J. Nutr. 121, 99–106.
18. Heinze C. R., Gomez F. C., Freeman L. M. (2012): *Assessment of commercial diets and recipes for home-prepared diets recommended for dogs with cancer*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 241, 1453–1460.
19. Hellgren J., Hästö L. S., Wikström C., Fernström L., Hansson I. (2019): *Occurrence of Salmonella, Campylobacter, Clostridium and Enterobacteriaceae in raw meat-based diets for dogs*. Veterinary Record, Vet. Rec.
20. Hendriks W., Emmens M., Trass B., Pluske J. (1999): *Heat processing changes the protein quality of canned cat foods as measured with a rat bioassay*. J. Anim. Sci. 77, 669.
21. Huss H. H., Reilly A., Ben Embarek K. (2000): *Prevention and control of hazards in seafood*. Food control 11, 149–156.
22. Joffe D. J., Schlesinger D. P. (2002): *Preliminary assessment of the risk of Salmonella infection in dogs fed raw chicken diets*. Can. Vet. J. 43, 441–442.
23. Kerr K. R., Vester Boler B. M., Morris C. L., Liu K. J., Swanson K. S. (2012): *Apparent total tract energy and macronutrient digestibility and fecal fermentative end-product concentrations of domestic cats fed extruded, raw beef-based, and cooked beef-based diets*. J. Anim. Sci. 90, 515–522.

24. Kohler B., Stengel C., Neiger R. (2012): *Dietary hyperthyroidism in dogs*. J. Small. Anim. Pract. 53, 182–184.
25. Kotula A. W., Dubey J. P., Sharar A. K., Andrews C. D., Shen S. K., Lindsay D. S. (1991): *Effect of freezing on infectivity of Toxoplasma gondii tissue cysts in pork*. Journal of Food Protection, 54, 687–690.
26. Kukanich K. S. (2011): *Update on Salmonella spp contamination of pet food, treats, and nutritional products and safe feeding recommendations*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 238, 1430–1434.
27. Larsen J. A., Parks E. M., Heinze C. R., Fascetti A. J. (2012): *Evaluation of recipes for home-prepared diets for dogs and cats with chronic kidney disease*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 240, 532–538.
28. Lejeune J. T., Hancock D. D. (2001): *Public health concerns associated with feeding raw meat diets to dogs*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 219, 1222–1225.
29. Lenz J., Joffe D., Kauffman M., Zhang Y., Lejeune J. (2009): *Perceptions, practices, and consequences associated with foodborne pathogens and the feeding of raw meat to dogs*. Can. Vet. J. 50, 637–643.
30. Leonard E. K., Pearl D. L., Finley R. L., Janecko N., Peregrine A. S., Reid-Smith R. J., Weese J. S. (2011): *Evaluation of pet-related management factors and the risk of Salmonella spp. carriage in pet dogs from volunteer households in Ontario (2005-2006)*. Zoonoses Public Health 58, 140–149.
31. Mollenkopf D. F., Kleinhenz K. E., Funk J. A., Gebreyes W. A., Wittum T. E. (2011): *Salmonella enterica and Escherichia coli harboring bla_{CMY} in retail beef and pork products*. Foodborne Pathog. Dis. 8, 333–336.
32. Morgan S.K., Willis S., Shepherd M. L. (2017): *Survey of owner motivations and veterinary input of owners feeding diets containing raw animal products*. Peer J. 5, 303
33. Morley P. S., Strohmeier R. A., Tankson J. D., Hyatt D. R., Dargatz D. A., Fedorka-Cray P. J. (2006): *Evaluation of the association between feeding raw meat and Salmonella enterica infections at a Greyhound breeding facility*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 228, 1524–1532.
34. National Research Council (2006): *Nutrient requirements of dogs and cats*. National Academies Press. Washington, DC.
35. Nemser S. M., Doran T., Grabenstein M., McConnell T., Mcgrath T., Pamboukian R., Smith A. C., Achen M., Danzeisen G., Kim S., Liu Y., Robeson S., Rosario G., McWilliams Wilson K., Reimschuessel R. (2014): *Investigation of Listeria, Salmonella, and toxigenic Escherichia coli in various pet foods*. Foodborne Pathog. Dis. 11, 706–709.
36. Rutherford S. M., Rutherford-Markwick K. J., Moughan P. J. (2007): *Available (ileal digestible reactive) lysine in selected pet foods*. J. Agric. Food Chem. Discipline 55, 3517–3522.
37. Schlesinger D. P., Joffe D. J. (2011): *Raw food diets in companion animals: a critical review*. Can. Vet. J. 52, 50–54.
38. Stahler D. R., Smith D. W., Guernsey D. S. (2006): *Foraging and feeding ecology of the gray wolf (Canis lupus): lessons from Yellowstone National Park, Wyoming, USA*. J. Nutr. 136, 1923–1926.
39. Stiver S. L., Frazier K. S., Mauel M. J., Styer E. L. (2003): *Septicemic salmonellosis in two cats fed a raw-meat diet*. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 39, 538–542.

40. Stockman J., Fascetti A. J., Kass P. H., Larsen J. A. (2013): *Evaluation of recipes of home-prepared maintenance diets for dogs*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 242, 1500–1505.
41. Streiff E., Zwischenberger L. B., Butterwick R. F., Wagner E., Iben C., Bauer J. E. (2002): *A comparison of the nutritional adequacy of home-prepared and commercial diets for dogs*. J. Nutr. 132, 1698–1700.
42. Strohmeyer R. A., Morley P. S., Hyatt D. R., Dargatz D. A., Scorza A. V., Lappin M. R. (2006): *Evaluation of bacterial and protozoal contamination of commercially available raw meat diets for dogs*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 228, 537–542.
43. Taylor M. B., Geiger D. A., Saker K. E., Larson M. M. (2009): *Diffuse osteopenia and myelopathy in a puppy fed a diet composed of an organic premix and raw ground beef*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 234, 1041–1048.
44. Thompson H. C., Cortes Y., Gannon K., Bailey D., Freer S. (2012): *Esophageal foreign bodies in dogs: 34 cases (2004-2009)*. J. Vet. Emerg. Crit. Care. (San Antonio) 22, 253–261.
45. Vester B. M., Burke S. L., Liu K. J., Dikeman C. L., Simmons L. G., Swanson K. S. (2010): *Influence of feeding raw or extruded feline diets on nutrient digestibility and nitrogen metabolism of African wildcats (Felis lybica)*. Zoo. Biol. 29, 676–686.
46. Weese J. S., Rousseau J., Arroyo L. (2005): *Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets*. Can. Vet. J. 46, 513–516.
47. Zhao T., Doyle M. P., Fedorka-Cray P. J., Zhao P., Ladely S. (2002): *Occurrence of Salmonella enterica serotype typhimurium DT104A in retail ground beef*. J. Food Prot. 65, 403–407.

Article received: 08.10.2019.

Article accepted: 01.12.2019.

УПУТСТВО АУТОРИМА ЗА ПРИПРЕМАЊЕ РУКОПИСА

Општа упутства

Текст рукописа треба да се припреми у програму *MS Word* ћирилицом или латиницом (*Serbian Cyrilic, Serbian Latin*). Фонт треба да буде *Times New Roman*, величина фонта *12 pt* са једноструким проредом. Све маргине подесити на *2,54 mm*, а величине странице на А4 са обостраним поравнавањем са увлачењем сваког пасуса. Текст рада не треба да буде дужи од 15 страница са прилозима. У тексту избјегавати скраћенице и непотребне симболе. Избјегавати стране ријечи, а ако је нужно треба их превести на српски језик. Латинске називе писати у *италику*, а за називе лијекова

користити генеричка имена. Апарати и уређаји се наводе под оригиналним трговачким именима и са именом произвођача. Бројеве треба писати са зарезом и са минимално двије децимале. Користити мјерне јединице Међународног система јединица – *SI* систем. Фотографије, графиконе и табеле треба уврстити у рад, али због квалитета штампе је повољно слати их и у посебном фолдеру уз рад. Пожељно је да илустрације имају висок квалитет. Уз рад треба доставити декларацију аутора која се може преузети са сајта часописа.

Структура рада

Ветеринарски журнал Републике Српке објављује само научно-стручне радове који испуњавају критеријуме декларисане у Правилнику о публикавању научних публикација Министарства науке и технологије Републике Српске.

Оригинални научни рад треба да посједује следеће дијелове: насловну страну, кратак садржај, увод, материјал и методе, резултате, дискусију, закључак и списак литературе. По потреби је потребно написати захвалницу и напомену ако је истраживање финансирано са пројекта.

Насловна страна

На насловној страни написати:

- назив чланка - треба бити кратак и информативан; Пише се искључиво великим словима. Величина слова *12 (pt)*. У наслову не наводити скраћенице.
- имена аутора - написати испод наслова. Обавезно нагласити пуна имена и презимена аутора. У суперскрипту нагласити бројеве који означавају у фусноти институцију у којима су аутори запослени.

- име и презиме коресподентног аутора – навести на дну странице са контактом (*e-mail* и/или телефон) и институцијом гдје је аутор запослен;

Кратак садржај

Кратак садржај куцати на посебној страници у обиму до 250 ријечи. Поред наслова рада и имена аутора кратак садржај треба да посједује најбитније информације из рада. Испод кратког садржаја навести 3-6 кључних ријечи. Кратак садржај се пише на српском и енглеском језику.

Увод

У уводу рада описати тему којој је рад посвећен. Нагласити најновије чињенице и научне проблеме са образложењем циља сопствених испитивања. Увод не смије да буде опширан. Препоручује се да у уводу буду наглашени најновији литературни подаци. Увод мора да оправда истраживање.

Материјал и методе

Материјал и методе морају да јасно и концизно опишу оглед, материјал и животиње на којима су експерименти

изведени, као и методе које су коришћене у огледу.

Резултати

Резултати се требају приказати у виду текста, табела, графика и одређених илустрација. Табеле треба да буду јасне и прегледне, са обавезном легендом у којој је дато објашњење скраћеница и симбола. Сваки прилог треба да има наслов (изнад табела, односно испод графика и слика) у коме треба бити јасно назначено шта прилог приказује.

Дискусија

У дискусији извршити компарацију сопствених резултата са резултатима страних и домаћих аутора који су обрађивали проблем и тематику истих или сличних тема.

Закључак

У закључку се доносе коначна разматрања аутора на основу обрађене теме.

Литература

Користи се Харвардски начин навођења литературе. Референце морају да буду што новије и актуелније. Због смањења могућности грешака имена страних аутора се пишу на латиници у италику. Када се литература наводи у тексту пише се презиме аутора и година публикације (Недић, 2012). Ако су и питању два аутора пишу се презимена оба аутора и година публикације (*Spelly and Morgan*, 1998), а у случају више аутора после првог аутора додаје се скраћеница „и сар.“ (Недић и сар., 2011).

АДРЕСА ЧАСОПИСА:

ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука
Бранка Радичевић 18, 78000 Бања Лука
Телефон/факс: +387 229-210

Главни уредник: Проф. др Драго Н. Недић: drago.nedic@virs-vb.com; drago.nedic@gmail.com
<http://virs-vb.com/veterinarski-zurnal-rs/arhiva/>
<http://doisrpska.nub.rs/index.php/VJRS/issue/archive>

У списку литературе референце нумерисати арапским бројевима и сложити их по азбучном (ћирилица) или абecedном (латиница) реду. Наводе се на следећи начин:

Научни чланак:

Недић Д., Тешић М., Балтић М., Плавшић Б., Тајдић Н., Мириловић М. (2011): *Management and control program for suppression and eradikation of classical swine fever in Serbia*. Acta Vet 61:295-307.

Књига:

Тешић М., Недић Д. (2011): *Менаџмент ветеринарске праксе*, Факултет ветеринарске медицине, Београд.

Поглавље рада:

Alderson GLH (1991): *A system to maximize the maintenance of genetic variability in small populations*. In: Alderson L.: (Eds.) Genetic Conservation of Domestic Livestock, CAB International, Wallingford, str.18-29

Монографија:

Алексић-Ковачевић Сања (2005): *Лимфоми паса и мачака*. Младост биро, Београд

Рад или кратак садржај из Зборника радова:

Ђупић В., Траиловић Д., Добрић С., Велев Р. (2005): Значај рационалне примене лекова у ветеринарској медицини. *Proceeding of Workshop Clinica Veterinaria Ohrid*, Македонија, 3-7. септембар 207-9.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The text of the manuscript should be prepared in MS Word Cyrillic or Latin (Serbian Cyrillic, Serbian Latin). Font should be Times New Roman, font size 12 pt with single line spacing. All margins should be set to 2.54 mm for the page size to A4 with aligning and each paragraph indented. Text of the manuscript should not be longer than 15 pages with attachments (tables, illustrations).

The text should avoid unnecessary abbreviations and symbols. Also, authors should avoid foreign words, and if necessary, they should be translated into the Serbian language. Latin names must be written in *Italic*, and the for

names of the drugs must be used generic names. Appliances and devices are listed under the original trade name and the product name.

Numbers should be written with a comma and with a maximum of two decimal places. Use the measuring unit of the International System of Units – SI system. Photos, charts, and tables should be included in the text, but because of better quality authors can send them in a separate folder with paper. It is desirable to have the high quality of the illustrations. With the paper, it should be submitted declaration, which can be downloaded [HERE](#).

STRUCTURE OF THE PAPER

Veterinary Journal of Republic of Srpska publishes a scientific papers that meet technical criteria declared in the “Rulebook of publishing scientific publications” of the Ministry of Science and Technology of the Republic of Srpska.

Original scientific paper should have the following sections: title page, abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusion and list of references. If necessary, it can be written acknowledgments as last section of paper if the research funded by the project.

First page:

On the front page should be written:

Title of the article – should be short and informative. It must be written exclusively in capital letters, size 12 (pt). In the title should not be included abbreviations;

The author’s names – should be written under the title. Full names of the authors should be written. In superscript emphasize a number that indicates in a footnote of institutions name in which are authors employed;

Name and surname of the correspondent author should be listed on the bottom of the page with a contact (e – mail and / or phone) and the name of the institution where the author is employed;

Abstract

Abstract should be written on a separate page up to 250 words. In addition to the title and author’s name, a abstract should have the most important information from paper. It should be listed 3-6 keywords. Abstract is written in Serbian and English.

Introduction

In the introduction of the paper must be described the topic that is been devoted to investigation. Emphasize the latest facts and scientific problems with the explanation of aim and their own testing. Introduction may not be to extensive. It is recommended that in the introduction are highlighted latest literature data. Introduction must justify the research.

Materials and Methods

Materials and methods need to clearly and concisely describe the materials and animals on which experiments were performed, and the methods that were used in the experiment.

Results

The results should be presented in the form of text, tables, graphs and illustrations. Tables should be simple and clear, with a legend in

which the explanation of abbreviations and symbols are noted. Each contribution should have a title (above the table, and below the chart and figure), which should be clearly stated what contribution shows.

Discussion

The discussion should be carried out comparing the results of their own research with results of foreign and local authors who have dealt with the problem on the same or similar topics.

Conclusion

In conclusion, the authors should make a final review on the topics that are covered in paper.

References

Authors must use the Harvard method of citation. References must be current and topical. Because reducing the possibility of mistakes, the names of foreign authors are written in Latin and Italic. In the text, refer to the author's name and year of publication (Nedić, 2012). If are there two authors, it should be written the surnames of both authors and the year of publication (*Spelly and Morgan*, 1998), and in the case of more then two authors, to the name of first author must added abbreviation " et al." (Nedić et al., 2011). The list of references should be numbered in Arabic numerals and arranged alphabetically (Cyrillic and Latin).

Use the following system for arranging the references:

Editor- in-Chief: Prof.dr. Drago N. Nedic

E-mail: drago.nedic@virs-vb.com; drago.nedic@gmail.com

Public Institution Veterinary Institute of the Republic of Srpska „Dr. Vaso Butozan“ Banja Luka, Branka Radičevića 18

78000 Banja Luka

Republic of Srpska, B&H

Phone: +387 51 229-210

E-mail: drago.nedic@virs-vb.com

<http://virs-vb.com/veterinarski-zurnal-rs/arhiva/>

<http://doisrpska.nub.rs/index.php/VJRS/issue/archive>

Journal article:

Nedic D., Tesic M., Baltic M., Plavsic B., Tajdić N., Mirilovic M. (2011): *Management and control program for suppression and eradikation of classical swine fever in Serbia*. Acta Vet 61: 295-307.

Book:

Tesic M., Nedic D. (2011): *Menadžment veterinarske prakse*, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.

Chapter in the book:

Alderson GLH (1991): *A system to maximize the maintenance of genetic variability in small populations*. In: Alderson L.: (Eds.) Genetic Conservation of Domestic Livestock, CAB International, Wallingford, pp. 18-29.

Monograph:

Aleksic – Kovacevic Sanja (2005): *Limfomi pasa i mačaka*, Mladost Biro, Beograd.

Abstracts and short summaries from the proceedings:

Čupić V., Trailovic D., Dobric S., Velev R (2005): The importance of rational use of drugs in veterinary medicine. *Proceedings of Workshop Clinica Veterinaria Ohrid*, Macedonia, 3-7. September, 207-9.

