

UDK 619 (05)

ISSN 1840-2887 Штампа-Print

ISSN 2303-4475 Online

# ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ



## Veterinary Journal of Republic of Srpska

Волумен/Volumen XXII, бр./No 1-2, стр./page 01-209, Бања Лука/Ванја Лука, 2022



**„Једно здравље“ за бољу будућност!  
„One Health“ for a better future!**

UDK 619 (05)

ISSN 1840-2887 – Штампа-Print

ISSN 2303-4475 - Online

## ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ

## VETERINARY JOURNAL OF REPUBLIC OF SRPSKA

### Научни часопис - Scientific journal

Ветеринарски журнал Републике Српске, Вол. 22, број 1-2, стр. 1-209, Бања Лука, 2022  
Veterinary Journal of Republic of Srpska, Vol. XXII, No 1-2, page 1-209, Banja Luka, 2022

#### ИЗДАВАЧ – PUBLISHER:

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

#### СУИЗДАВАЧ – CO-PUBLISHER:

ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ, УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ, СРБИЈА  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, UNIVERSITY OF BELGRADE, SERBIA

#### 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 Милорад Мириловић, Dr Milorad Mirilović, PhD, (Србија-Serbia)  
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, (Северна Македонија, North Macedonia)  
Др Жељко Сладојевић, Dr Željko Sladojević, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)  
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 (Шведска-Sverige)  
Др Миломир Ковач, Dr Milomir Kovač, PhD, (Руска Федерација, Россијска Федерација)  
Др Неђељко Карабасил, Dr Nedjeljko Karabasil, PhD, (Србија-Serbia)  
Др Милан Балтић, Dr Milan Baltić, PhD, (Србија-Serbia)  
Др Смиљана Параш, Dr Smiljana Paraš, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)  
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 Виолета Сантрач, Dr Violeta Santrač, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)

**ТЕХНИЧКИ УРЕДНИК: -TECHNICAL EDITOR:** др Бојан Голић, dr Bojan Golić (БиХ-РС, В&Н-RS)

**ЛЕКТОР - ЛЕКТОР:** Маја Martinović

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

**РЕЦЕНЗИЈА:** Часопис се упућује на двоструку рецензију еминентним стручњацима. The journal is referred to a dual review by eminent experts.

#### ГОДИШЊЕ СЕ ОБЈАВЉУЈЕ 2 БРОЈА ЧАСОПИСА (јун/децембар или двоброј крајем године)

2 ISSUES OF MAGAZINES ARE PUBLISHED ANNUALLY (June / December or double issue at the end of the year)

Часопис је бесплатан и објављује се у електронској верзији и штампа у 300 примјерака. The magazine is free and is published in an electronic version and printed in 300 copies.

На основу Мишљења Министарства науке и технологије Републике Српске часопис је ослобођен пореза на промет. Based on the Opinion of the Ministry of Science and Technology of the Republic of Srpska, the magazine is exempt from sales tax.

**Штампа:** Штампариија Alfa studio Gradiška; **Press:** Alfa studio, Gradiška

78000 Бања Лука, Бранка Радичевића 18; 78000 Banja Luka, Branka Radičevića 18,

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

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

### Обим и политика часописа

Ветеринарски журнал Републике Српске је покренут 2001. године како би истраживачи код нас, 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 научних радова, кратких саопштења и приказа случаја. Ветеринарски журнал Републике Српске објављује се на једном од језика у службеној употреби у Босни и Херцеговини 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 индексиран 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 пријављивање (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 original scientific paper, review scientific paper, short communications, case report. *Veterinary Journal of Republic of Srpska* is published in one of the languages in official use in Bosnia and Herzegovina 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

	Стр./pp.
QUORUM SENSING У МИКРОБИОЛОГИЈИ ХРАНЕ <i>Снежана Булајић, Тијана Ледина, Јасна Ђорђевић</i>	5-17
QUORUM SENSING IN FOOD MICROBIOLOGY <i>Snežana Bulajić, Tijana Ledina, Jasna Đorđević</i>	18-30
ДЕКЛАРИСАЊЕ МЕСА– МИШЉЕЊЕ И ПОВЕРЕЊЕ ПОТРОШАЧА <i>Јелена Јањић, Милан Ж. Балтић, Мирјана Ловреновић, Славен Грбић, Драго Недић, Споменка Ђурић, Бранислав Вејновић, Лазо Пендовски, Милорад Мириловић</i>	31-43
MEAT DECLARATION – CONSUMER OPINION AND CONFIDENCE <i>Jelena Janjić, Milan Ž. Baltić, Mirjana Lovrenović, Slaven Grbić, Drago Nedić, Spomenka Đurić, Branislav Vejnović, Lazo Pendovski, Milorad Mirilović</i>	44-56
МИКРОБИОЛОШКА ИСПРАВНОСТ I ФИЗИКАЛНО-КЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ КВАЛИТЕТА КОЗЈИХ I ОВЉИХ СИРЕВА ИЗ ХЕРЦЕГОВИНЕ <i>Ана Сесар, Маја Дрмаћ, Виктор Ландека, Бојан Голић</i>	57-67
MICROBIOLOGICAL SAFETY AND PHYSICOCHEMICAL QUALITY PARAMETERS OF GOAT AND SHEEP CHEESE FROM HERZEGOVINA <i>Ana Sesar, Maja Drmać, Viktor Landeka, Bojan Golić</i>	58-79
QUORUM ANALIZA KVALITETA SEKSIRANOG SEMENA BIKOVA КОМПЈУТЕРСКИ АСИСТИРАНОМ АНАЛИЗОМ SEMENA-CASA <i>Слободанка Ваканјак, Горан Пантић, Љубомир Јовановић, Владимир Магаš, Данијела Кировски</i>	80-89
ANALYSIS OF THE QUALITY OF SEXED BULL SEMEN BY COMPUTER-ASSISTED SEMEN ANALYSIS-CASA <i>Slobodanka Vakanjac, Goran Pantić, Ljubomir Jovanović, Vladimir Magaš, Danijela Kirovski</i>	90-100
АНТИХЕЛМИНТИЧКИ ПОТЕНЦИЈАЛ ЕТАРСКОГ УЛЈА КОРИЈАНДЕРА (CORIANDRUM SATIVUM L.) КОД ОВАЦА <i>Филип Штрбац, Антонио Боско, Коста Петровић, Драгича Стојановић, Радомир Ратајак, Наташа Симић, Дејан Орчић, Ђиузеппе Криноли, Лаура Риналди</i>	101-113
АНТИХЕЛМИНТИЧКИ ПОТЕНЦИЈАЛ ЕТАРСКОГ УЛЈА КОРИЈАНДЕРА (CORIANDRUM SATIVUM L.) КОД ОВАЦА <i>Filip Štrbac, Antonio Bosco, Kosta Petrović, Dragica Stojanović, Radimir Ratajac, Nataša Simin, Dejan Orčić, Giuseppe Cringoli, Laura Rinaldi</i>	114-126
АНТИХЕЛМИНТИЧКИ ПОТЕНЦИЈАЛ ЕТАРСКОГ УЛЈА КОРИЈАНДЕРА (CORIANDRUM SATIVUM L.) КОД ОВАЦА <i>Filip Štrbac, Antonio Bosco, Kosta Petrović, Dragica Stojanović, Radimir Ratajac, Nataša Simin, Dejan Orčić, Giuseppe Cringoli, Laura Rinaldi</i>	127-141
КРИПТОРХИЗМА КОД ПАСА <i>Јован Спасојевић, Иван Галић, Бојан Тохолј, Иван Станчић, Сандра Никوليћ, Ивана Давидов, Тијана Кукурић, Ненад Поповић</i>	127-141
CRYPTORCHIDISM IN DOGS <i>Jovan Spasojević, Ivan Galić, Bojan Toholj, Ivan Stančić, Sandra Nikolić, Ivana Davidov, Tijana Kukurić, Nenad Popović</i>	142-155

---

	Стр./pp.
ЗНАЧАЈ САРАДЊЕ ЛЕКАРА И ВЕТЕРИНАРА У КОНЦЕПТУ ЈЕДНО ЗДРАВЉЕ <i>Бранислава Белић, Марко Цинцковић, Николина Новаков, Марија Јефтић, Драгана Димитријевић, Бобан Ђурић</i>	156-166
IMPORTANCE OF COLLABORATION BETWEEN PHYSICIANS AND VETERINARIANS IN ONE HEALTH CONCEPT <i>Branislava Belić, Marko Cincović, Nikolina Novakov, Marija Jeftić, Dragana Dimitrijević, Boban Đurić</i>	167-177
АКТИВНОСТ СЕЛЕНОЕНЗИМА GP <sub>x</sub> -1 И GP <sub>x</sub> -3 У КРВИ РАДНИХ КОЊА НА ТЕРИТОРИЈИ ЦЕНТРАЛНЕ СРБИЈЕ <i>Оливера Валчић, Петар Милосављевић, Иван Јовановић, Светлана Милановић</i>	178-185
ACTIVITY OF SELENENZYMES GP <sub>x</sub> -1 AND GP <sub>x</sub> -3 IN THE BLOOD OF WORKING HORSES IN THE TERRITORY OF CENTRAL SERBIA <i>Olivera Valčić, Petar Milosavljević, Ivan Jovanović, Svetlana Milanović</i>	186-193
УПУТСТВО АУТОРИМА И РЕЦЕНЗЕНТИМА INSTRUCTIONS FOR AUTHORS AND REVIEWERS	194-201 202-209

---



DOI 10.7251/VETJSR2201005B

UDK 006.4:[663/664:658.562

Прегледни научни рад

## QUORUM SENSING У МИКРОБИОЛОГИЈИ ХРАНЕ

Снежана БУЛАЈИЋ, Тијана ЛЕДИНА, Јасна ЂОРЂЕВИЋ\*

Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

\*Коресподентни аутор: Јасна Ђорђевић, jasna.djordjevic@vet.bg.ac.rs

### Сажетак

Последњих неколико деценија, наша перцепција о бактеријама и њиховим заједницама значајно се променила. У прошла времена преовладавало је мишљење да заједнице бактерија представљају популацију ћелија које делују индивидуално. Данас је добро документована чињеница да механизам међућелијске комуникације, познат као „*quorum sensing*“, има важну улогу у контролисању различитих целуларних процеса бактерија као што су биолуминисценција, вируленција, толеранција на дезинфицијенсе, спорулација, покретљивост, стварање биофилма и антимикробна резистенција.

Разумевање система међућелијске комуникације даје могућност контроле раста непожељних бактерија у матриксу хране и развоја нове стратегије у обезбеђивању квалитета и безбедности хране.

**Кључне речи:** quorum sensing, квалитет и безбедност хране.

### УВОД

„*Quorum sensing*“ (QS), термин успостављен од стране Fuqua и Winans (1994), представља универзални механизам којим бактерије препознају промене у окружењу. Препознајући новонастале промене, микробни свет има могућност да правовремено реагује, развијањем специфичне одбрамбене стратегије у циљу адаптације на неповољне услове у простору и кроз време. На овај начин, чином социјализације (удруживања) у моменту када густина популације достигне критични ниво, бактерије синхронизују своје понашање и тиме оптимизују шансе за преживљавање у конкурентивним нишама.

Бројне грам-негативне и грам-позитивне врсте бактерија су способне да своје активности прилагоде друштвеном добру и координишу колективно понашање у оквиру мултимикробне заједнице. Механизам удруженог

битисања подразумева синтетисање ниско молекуларних сигналних молекула. Бактерије (ћелије „емитери“), континуирано генеришу сигнал, на почетку раста у ниској концентрацији, а потом, како се, временом, густина популације повећава, сигнал се акумулира. Једном, када концентрација сигнала достигне критични ниво, што бактерије перципирају као остварен „кворум“, сигнал реагује са рецепторским протеином ћелије „респондера“, и кроз координисану експресију одређених гена покреће се јединствени, заједнички одговор заједнице у циљу преживљавања.

Процеси контролисани од стране „*quorum sensing*“ система укључују биолуминисценцију, спорулацију, компетенцију, продукцију антимикуробних пептида, стварање биофилма, антимикуробну резистенцију, секрецију фактора вируленције, стварање токсина, трансфер коњугативних плазида, као и продукцију ензима чија се активност доводи у везу са кваром хране (Smith и сар., 2004; Zhao и сар., 2020; Wang и Xie, 2020).

### Врсте сигналних молекула

У основи, „*quorum sensing*“ систем подразумева производњу и читавање екстрацелуларних сигнала. Сигнали су хемијске природе, сигнални молекули, тзв. аутоиндуктори. Често, мада не и увек, гени који су одговорни за синтезу сигналних молекула и одговор на исте, активирају властиту експресију, чиме се објашњава назив аутоиндуктор. Према Amtoг и сар. (2008), идентификовани сигнални молекули се деле у 4 категорије:

1. Н-ацил хомосерин лактони (АХЛ), деривати масних киселина, генерички названи аутоиндуктори 1 (АИ-1); продукују их и користе грам-негативне бактерије углавном за комуникацију унутар врсте. Интрацелуларна акумулација довољне концентрације АХЛ покреће активацију транскрипције различитих промотера унутар бактеријског генома. Неколико фактора као што су температура, рН, садржај NaCl, састав медијума за раст и фаза раста могу утицати на количину продуктованих АХЛ. Продукција Ц4-хомосерин лактона од стране *Aeromonas hydrophila* 519 зависи од температуре раста, концентрације глукозе и соли, као и рН вредности медијума за култивацију (Medina-Martinez и сар., 2006). Исти аутори утврђују да при базној рН вредности, АХЛ постају нестабилни и подлежу хидролизи. Уласком бактерија у стационарну фазу, смањује се количина АХЛ (Ravn и сар., 2001). Примери фенотипова регулисаних од стране АХЛ укључују продукцију антимикуробних пептида, антимикуробну резистенцију, формирање биофилма, статус компетенције за преузимање ДНК, диференцијацију ћелија, биолуминисценцију, раст,



- трансфер плазида, експресију фактора вируленције, као и продукцију различитих екстрацелуларних ензима.
2. фураносил борат диестер, познат као аутоиндуктор 2 (АИ-2); стварају их грам-негативне али и грам-позитивне бактерије и тиме служи као универзални сигнал за комуникацију унутар и између врста; одговоран за модулацију неколико фенотипских измена, као што су експресија фактора вируленције, нивои АБЦ транспортера код *Salmonella Typhimurium*, продукција протеаза, транскрипција бројних гена код *Escherichia coli*, биолуминисценција код *Vibrio* spp. Продукција АИ-2, као и у случају АИ-1, условљена је температуром и формулацијом медијума за раст, као и променама у интрацелуларном метаболизму и деловањем стресора.
  3. аутоиндуктор 3 (АИ-3) представља сигнал за гене вируленције ентерохеморагичне *Escherichia coli* (ЕХЕЦ); продукција овог аутоиндуктора утврђена је и код интестиналне микробиоте људи што имплицира могућу улогу у комуникацији између врста.
  4. аутоиндуковани пептиди (АИП) које продукују и користе грам-позитивне бактерије. АИП се синтетишу на рибозомима као прекурзор пептиди, трансформишу се у активни пептид и бивају експортирани ван ћелије деловањем АБЦ транспортера у АТП-зависном процесу. Ови пептиди се карактеришу малом молекулском масом (5-26 аминокиселинских резидуа), високом стабилношћу, специфичношћу и диверзитетом. Сигнал ових пептида се обично читава на површини ћелија путем сензора хистидин киназе, када аутофосфорилација киназе покреће уједно и фосфорилацију регулатор протеина, што, у крајњем исходу доводи до транскрипције одговарајућих гена. Примери фенотипова модулираних активношћу аутоиндукованих пептида укључују генетичку компетенцију и спорулацију код *Bacillus subtilis* и *Streptococcus pneumoniae*, вируленцију код *Enterococcus faecalis*, као и продукцију антимикробних састојака као што су низин (*Lactococcus lactis*) и субтилизин (*Bacillus subtilis*). Ипак, типичан пример АИП посредованог QS механизма је *agr* систем код *Staphylococcus aureus* (Abisado и сар., 2018) и *Listeria monocytogenes*. *Staphylococcus aureus* представља коменсалну микробиоту људи, али испољава и патогена својства по продору у ткиво домаћина. Механизам патогености стафилокока подразумева бифазичну стратегију: при ниској густини популације стафилококе врше експресију протеина који промовишу адхеренцију на мукозне површине и колонизацију, док се при високој

концентрацији популације, ова својства гасе, а иницира се секреција токсина и протеаза, што поспешује дисеминацију стафилокока. Овај „switch“ у експресији гена је регулисан *agr* QS механизмом.

У новије време, описане су и друге врсте сигналних молекула, као што су колера аутоиндуктор 1, дикетопиперазини, 4–хидрокси-2-алкилквинолини дифузибилни сигнални фактори (Wang и Xie, 2020), различити метаболички продукти као што су индол, кратколанчане масне киселине, секундарне жучне киселине (Buffie и сар., 2015).

### ***Quorum sensing* у контексту микробне екологије**

У највећем броју случајева, досадашња испитивања QS механизма односила су се на проучавање молекуларног аспекта међућелијске комуникације, односно како QS утиче на вируленцију, спорулацију или коњугацију. Далеко мање се сагледавао еколошки концепт приче у средишту кога лежи главно питање – зашто уопште бактерије продукују сигналне молекуле, руководећи се притом основном еколошком парадигмом – све је са свим осталим у вези, али и како детерминанте еколошке нише утичу на комуникацију, посебно у случају када нишу представљају комплексни екосистеми хране. Иако се продукција сигналних молекула (АИ-1, АИ-2) доводи у везу са одређеним члановима микробиоте хране (*Pseudomonas* врсте, припадници фамилије *Enterobacteriaceae*, бактерије млечне киселине), веома мало се зна о утицају процесних параметара и услова складиштења на квалитет и квантитет ових сигнала у храни. Познато је да доминација једне групе бактерија у континууму производње и прераде хране представља резултат сложеног процеса микробне сукцесије, када специфична популација захваљујући својим имплицитним карактеристикама и усвајањем специфичне стратегије стиче нумеричку супериорност у ниши која се успоставља као интерплеј физикохемијских карактеристика матрикса хране и услова складиштења. Матрикс хране у већини случајева подразумева асоцијацију микробних ћелија са солидним супстратом, те су ћелије имобилизоване и локализоване у појединим микросрединама у високој концентрацији, а раст је присутан у виду микроколонија или биофилмова. На различитим местима унутар матрикса хране присутне су варијације у нивоу кисеоника, активности воде, храњивих материја и рН вредности. На основу интеракције свих ових фактора матрикс хране је представљен кроз серију међуповезаних микросредина, од којих поједине могу да фаворизују раст бактерија. Динамика раста и активност бактерија присутних у храни, било да се ради о узрочницима квара, патогеним бактеријама или корисној микробиоти

одређена је, великим делом, *in situ* међућелијским еколошким интеракцијама. Из овог разлога, еколошки приступ је неопходан у сагледавању међућелијске комуникације у различитим екосистемима хране. Врло вероватно, сагледавање еколошке димензије QS механизма дало би одговоре на следећа важна питања:

- Која је то критична концентрација QS сигнала потребна како би бактерије препознале кворум и покренуле експресију гена?
- Да ли услед динамичких (абиотичних) услова постоји концентрацијски градијент или хемијска деградација сигнала?
- Да ли је у генерисању и читавању QS сигнала просторна дистрибуција ћелија важнија од густина популације?
- Да ли је могуће да друге врсте или сојеви бактерија, који коегзистирају у истој ниши деактивирају и/или продукују исти аутоиндуктор?

### ***Quorum sensing* у микробиологији хране**

Међућелијска комуникација привлачи пажњу микробиолога хране услед доказа о повезаности QS и квара хране (Ammog и сар., 2008; Skandamis и сар., 2009; Galié и сар., 2018) и чињенице да су из матрикса покварене хране изоловане различите сигналне молекуле (Blana и Nychas, 2014), али и значаја QS у патогенези бактерија (Li и сар., 2018). Поред тога, неоспорна је улога QS у формирању биофилма у процесном окружењу (Galié и сар., 2018).

### ***Quorum sensing* и квар хране**

Квар хране животињског порекла углавном се доводи у везу са активношћу грам-негативних протеолитичних психротрофних бактерија, већином *Pseudomonas* spp., и родова фамилије *Enterobacteriaceae*, односно бактерија млечне киселине уколико се храна чува у условима модификоване атмосфере. Поред тога, активност хидролаза, углавном фосфолипаза пореклом грам-позитивних аеробних *Bacillus* spp. одговорна је за квар млека и производа од млека.

*Pseudomonas* spp. представљају доминантну микробиоту аеробно пакованог охлађеног меса, достижући ниво од  $10^9$  CFU/g у случају квара меса (Liu и сар., 2006). Јау и сар. (2003) утврђују повезаност QS и квара меса условљеног активношћу *Pseudomonas* spp., *Hafnia alvei* и *Serratia* spp., као доминантне психротрофне врсте *Enterobacteriaceae* фамилије изоловане из поквареног меса пакованог у вакууму и идентификују се као значајни продуценти АХЛ. Велики број АХЛ утврђује се у охлађеном говеђем и живинском месу чуваном у аеробним условима, у ситуацији када се бележи

---

висока концентрација *Pseudomonadaceae* ( $10^8$ - $10^9$  CFU/g) и *Enterobacteriaceae* ( $10^3$ - $10^4$  CFU/g), уз значајну протеолитичку активност (Liu и сар., 2006).

Yuan и сар. (2018) претпостављају улогу QS механизма током раста и метаболичке активности *Pseudomonas fluorescens*, честог узрочника квара млека и производа од млека, а услед способности дотичне врсте да синтетише АХЛ и екстрацелуларне протеазе. Већина (84,5%) сојева психротрофне протеолитичне микробиоте изоловане из сировог млека карактерише се продукцијом АХЛ (Pinto и сар., 2007). Иако се *Pseudomonadaceae* и *Enterobacteriaceae* не могу изоловати из пастеризованог и стерилизованог млека, утврђена преваленција АХЛ указује да АХЛ продуковани од стране иницијалне микробиоте сировог млека, по спроведеном термичком третману, задржавају у потпуности, или барем делом, своју активност. Продукција алкалне металопротеазе код соја *Pseudomonas fluorescens* 395, који поседује изразиту протеолитичку активност, регулисана је QS системом (Liu и сар., 2007). Продукција екстрацелуларних липолитичких и протеолитичких ензима од стране *Serratia proteamaculans* сој В5а контролисана је од стране QS система (Christensen и сар., 2003).

### **Quorum sensing и формирање биофилма**

Биофилм представља комплексни екосистем једне или више врста бактерија уроњених у екстрацелуларни полимерни матрикс. Развија се по обрасцима вишећелијског понашања и у коначном облику функционише као кооперативни конзорцијум бактерија на сложен, али усклађен начин. Овакав сесилни начин живота пружа бројне предности придруженим члановима – већа отпорност на стресне услове средине, неосетљивост на антимикуробна средства и средства за санитацију и дезинфекцију, што онемогућава ерадикацију биофилма из процесног окружења. Додатно, микробна заједница биофилма показује примитивну хомеостазу, примитивни циркулаторни систем, измену генетичког материјала и принцип метаболичке кооперације.

Први корак у формирању биофилма подразумева кондиционирање површине материјала и реверзибилно везивање ћелија за исти материјал. Потом, везивање постаје иреверзибилно и формирају се микроколоније. Коначно, филм поприма тродимензионалну структуру и комплексни екосистем је спреман за дисперзију. Индустрија млека, услед специфичности сировог супстрата (флуид) и разноликости технолошких процеса (различити температурни профили), пружа бројне могућности за колонизацију

биофилма. Танкови за сирово млеко, цевоводи, центрифуге, дупликатори за сир, проточни плочасти измењивачи топлоте и машине за паковање представљају примере тзв. површинских супстрата на којима се идеално угнезде биофилмови. Од посебног су значаја будући да представљају непрекидни, понављајући извор контаминације, што у крајњем случају нарушава квалитет и микробиолошки интегритет финалног производа.

QS систем је укључен у све фазе формирања биофилма: регулација густине популације, синхронизација метаболичке активности, тако да активност одговара нутритивним захтевима, али и расположивости храњивог супстрата. Поред тога, бактерије - резиденти биофилма, показују значајно различити геном/транскрипциони програм у поређењу са слободно живућим планктонским ћелијама.

Улога QS система у формирању биофилма у највећем броју случајева испитивана је код грам-негативних бактерија, где ацилирани хомосерин лактони (АХЛ) делују као сигналне молекуле. У ситуацији када концентрација АХЛ достигне критични ниво, АХЛ се везују на рецептор молекуле и формирани комплекс, као одговор на стресне услове средине, покреће експресију и секрецију фактора вируленције, екстрацелуларних протеаза, формирање биофилма, као и друге физиолошке функције (Li и сар., 2018).

*In vitro* студије показују да се *Salmonella* spp. лако приљубљују на радне површине и формирају биофилм (Coughlan и сар., 2016). *Salmonella* spp. и *E. coli* немају *luxI* ген који кодира АХЛ синтетазу и стога немају могућност синтезе АХЛ. Међутим, ови микроорганизми поседују LuxR хомолог, SdiA, који детектује сигнал продукован од других бактеријских врста. Присуство малих концентрација АХЛ продукованих од стране других бактерија, индукује формирање биофилма код *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium и *Vibrio* spp. (Jamuna Bai и Ravishankar Rai, 2016). Silagyi и сар. (2009) утврђују да АИ2 посредује у формирању биофилма *E. coli*, где активирани QS систем уједно учествује и у регулисању хемотаксе, синтези флагела и експресији гена одговорних за покретљивост.

Присуство Ц12 ХСЛ, једног од АХЛ сигнала, утиче на формирање биофилма *Salmonella* Enteritidis и промовише експресије фактора вируленције у анаеробним условима (Almeida и сар., 2017). Lamas и сар. (2016) утврђују везу између формирања биофилма од стране *S. enterica* и експресије QS-повезаних гена. Код *Campylobacter jejuni* синтеза АИ-2 игра главну улогу у формирању биофилма (Bezek и сар., 2016). Формирање биофилма код *Vibrio* spp. зависи од неколико кључних ензима, укључених у биосинтезу флагела, пила и полисахарида, као и регулатора протеина који

контролишу експресију истих гена (Giaouris и сар., 2015). *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* и *V. parahaemolyticus* присутни су у контаминираној храни и води, посебно плодовима мора, где формирају густо паковане биофилмове, што представља кључни фактор њиховог преживљавања у окружењу (Galić и сар., 2018). QS систем контролише формирање биофилмова и код грам-позитивних патогених бактерија преносивих храном: *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens* и *B. cereus* (Coughlan и сар., 2016). *L. monocytogenes* формира биофилмове на абиотичним површинама у заједници са другим бактеријама, као што су *Pseudomonas* spp. и *E. coli* (Giaouris и сар., 2015). Утврђено је да лактоза индукује стварање биофилма код *B. cereus*, на начин да повећава продукцију АИ-2 молекула (Duanis-Assaf и сар., 2015). Агг QS систем код *S. aureus* разликују се од других QS система будући да је доказано да експресија Агг доводи до down-регулације гена одговорних за адхезију бактерија. Тиме експресија Агг смањује адхезиони потенцијал бактерија и индиректно утиче на смањени капацитет формирања биофилма.

### Инхибиција QS система

Како се QS систем ослања на стварање и пренос малих сигналних молекула међу бактеријама, реално је очекивати да се исте молекуле (АИ) могу искористити у контроли раста и преживљавања бактерија, као и у модулацији њиховог профила вируленције. Инхибиција QS система, механизам познат као „Quorum Quenching“ (QQ), представља нову стратегију у контроли специфичних фенотипова бактерија (биолуминисценција, формирање биофилма, вирулентност, ефекат ројења). Постоји неколико могућих начина инхибиције QS система:

1. Инхибиција АХЛ синтезе,
2. Деградација АХЛ сигнала активношћу ензима (АХЛ-ацилаза и АХЛ-лактоназа)
3. Интерференција са рецепторима или блокирање комплекса АХЛ/рецептор (Lade и сар., 2014).
4. Пост-транскрипциона контрола QS ензима путем сРНК.

Природни (изоловани из различитих извора) и синтетички QS инхибитори интензивно се проучавају. Велики потенцијал показују екстракти различитог биља. Метанолни екстракт лишћа манга смањује продукцију протеазе, еластазе, пиоцијанина, као и егзополисахарида, те ефекат ројења и формирање биофилма код *Pseudomonas aeruginosa* (Husain и сар., 2017). У раду истих аутора, у екстракту лишћа манга идентификовано је више од 14 састојака, укључујући трифлуорометилкетоне и фенотијазине, са могућим

анти-QS деловањем, и то инхибицијом „*efflux*“ пумпи, мада је врло вероватно да делују на више циљних места.

Чајеви, поготово полифеноли екстраховани из лишћа чајева представљају традиционални извор природних компоненти, које се, у новије време, интензивно тестирају као могући анти-QS агенси. Епигалокатехин галат, најзаступљенији полифенолни метаболит антиоксидант из зеленог чаја показује снажни инхибиторни ефекат у односу на експресију гена (стварање биофилма, и покретљивост) регулисаних од стране QS система *E. coli* (Lee и сар., 2009). Зачини, као што су црни бибер, бели лук, ким и цимет показују обећавајуће резултате као анти-биофилм агенси.

Воће, као што су брусница, јагода и купина, садрже између осталих састојака и феноле, киноне, флавоноиде, алкалоиде, терпеноиде и полиацетилене, који су се показали успешним као анти-QS агенси, на основу интерференције са АХЛ синтезом, инхибиције продукције АИ-2 (Bezdek и сар., 2016) или down-регулације QS-повезаних гена.

Кверцетин (присутан у воћу, поврћу, орасима и житарицама) показује значајну редукцију QS-зависних фенотипова појединих патогених бактерија преносивих храном (*P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* и *K. pneumoniae*), посебно формирање биофилмова, продукцију егзополисахарида и покретљивост (Gori и сар., 2015). Поврће и житарице као што су пиринач, парадајз, соја, лук и броколи такође продукују супстанце које опонашају активност АХЛ сигнала (Jakobsen и сар., 2012).

Есенцијална уља су се показала као добри инхибитори формирања биофилма, пре свега меганизмом деградације АХЛ сигнала или инхибицијом АХЛ синтезе.

Као алтернативни извори инхибитора QS система наводе се биоактивне компоненте пореклом од бактерија, будући да је сасвим извесно да су бактерије усвојиле овај механизам како би обезбедиле компетитивну предност у нишама у којима опстају. У овом смислу посебно су интересантни чланови микробиоте земљишта, за које је потврђено да продукују ензиме (АХЛ-лактоназе и АХЛ- ацилазе) способне да разграде QS молекуле, али и многи тзв. -оцини, као што су бактериоцини, лактоцини, ентероцини и низин (Choуam и сар., 2019).

Пчелињи производи се такође препознају као значајан извор молекула са анти-QS механизмом деловања, посебно прополис (Bulman и сар., 2011) и мед (Maddocks и Jenkins, 2013).

Једно од могућих решења у „гашењу“ QS система јесте и примена параоксоназа, ензима изолованих из серума сисара, гљивица и различитих

биљака. Ови ензими блокирају QS систем на основу хидролизе лактонског прстена Н-ацил хомосерин лактона (АХЛ) (Galić и сар., 2018).

### ЗАКЉУЧАК

QS систем регулише експресију гена одговорних за кодирање многих виталних функција, које омогућавају преживљавање бактерија у неповољним условима средине. У настојању да се QS систем стави под контролу, идентификовани су бројни антагонисти сигналних молекула. Важно је да микробиолози хране имају свест о важности, али уједно и разумеју QS систем, будући да стратегије које „гасе“ механизам читавања кворума у популацији бактерија представљају ефикасно оруђе за контролу раста непожељних бактерија у храни.

### Захвалница

Рад је подржан средствима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Уговор број 451-03-68/2022-14/200143).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

### ЛИТЕРАТУРА

- Abisado R. G., Benomar S., Klaus J. R., Dandekar A. A., Chandler J. R. (2018): Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *mBio*, 9(3):e02331-17.
- Almeida F. A., Pimentel-Filho N. J., Pinto U. M., Mantovani H. C., Oliveira L. L., Vanetti M. C. (2017): Acyl homoserine lactone-based quorum sensing stimulates biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis in anaerobic conditions. *Archives of Microbiology*, 199(3):475-486.
- Ammor M. S., Michaelidis C., Nychas G. J. E. (2008): Insights into the Role of Quorum Sensing in Food Spoilage. *Journal of Food Protection*, 71(7):1510-1525.
- Bezek K., Kurincic M., Knauder E., Klancnik A., Raspor P., Bucar F., Smole Mozina S. (2016): Attenuation of adhesion, biofilm formation and quorum sensing of *Campylobacter jejuni* by *Euodia ruticarpa*. *Phytotherapy Research*, 30(9):1527-1532.
- Blana V. A., Nychas G. J. E. (2014): Presence of quorum sensing signal molecules in minced beef stored under various temperature and packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 173(3):1-8.
- Buffie C. G., Bucci V., Stein R. R., McKenney P. T., Ling L., Gobourne A., No D., Liu H., Kinnebrew M., Viale A., Littmann E., van den Brink M. R. M., Jenq R. R., Taur Y., Sander C., Cross J. R., Toussant N. C., Xavier J. B.,



- Pamer E. G. (2015): Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature*, 517(7533):205-8.
- Bulman Z., Le P., Hudson A. O., Savka M. A. (2011): A novel property of propolis (bee glue): Anti-pathogenic activity by inhibition of N-acyl-homoserine lactone mediated signaling in bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(3):788-797.
- Choyam S., Srivastava A. K., Shin J. H., Kammara R. (2019): Ocins for food safety. *Frontiers in Microbiology*, 10:1736.
- Christensen A. B., Riedel K., Eberl L., Flodgaard L. R., Molin S., Gram L., Givskov M. (2003): Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. *Microbiology*, 149(Pt 2):471-483.
- Coughlan L. M., Cotter P. D., Hill C., Alvarez-Ordóñez A. (2016): New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7:1641.
- Duanis-Assaf D., Steinberg D., Chai Y., Shemesh M. (2015): The LuxS based quorum sensing governs lactose induced biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, 6:1517.
- Fuqua W. C., Winans S. C. (1994): A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of Bacteriology*, 176:2796-2806.
- Galié S., García-Gutiérrez C., Miguélez E. M., Villar C. J., Lombó F. (2018): Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9:898.
- Giaouris E., Heir E., Desvaux M., Hebraud M., Moretro T., Langsrud S., Doulgeraki A., Nychas G. J., Kačaniova M., Czaczyk K., Olmez H., Simoes M. (2015): Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6:841.
- Gopu V., Meena C. K., Shetty P. H. (2015): Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: In-vitro and in-silico evidence. *PLoS One*, 10(8):e0134684.
- Husain F. M., Ahmad I., Al-Thubiani A. S., Abulreesh H. H., AlHazza I. M., Aqil F. (2017): Leaf extracts of *Mangifera indica* L. inhibit quorum sensing - regulated production of virulence factors and biofilm in test bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8:727.
- Jakobsen T. H., Bragason S. K., Phipps R. K., Christensen L. D., van Gennip M., Alhede M., Skindersoe M., Ostefeld Larse T., Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M. (2012): Food as a source for quorum sensing inhibitors: Iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7):2410-2421.
-

- Jamuna Bai A., Ravishankar Rai V. (2016): Effect of small chain N acyl homoserine lactone quorum sensing signals on biofilms of food-borne pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9):3609-3614.
- Jay J. M., Vilai J. P., Hughes M. E. (2003): Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5–7 degrees C. *International Journal of Food Microbiology*, 81(2):105-11.
- Lade H., Paul D., Kweon J. H. (2014): Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5):550-565.
- Lamas A., Miranda J. M., Vazquez B., Cepeda A., Franco C. M. (2016): Biofilm formation, phenotypic production of cellulose and gene expression in *Salmonella enterica* decrease under anaerobic conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 238:63-67.
- Lee K. M., Kim W. S., Lim J., Nam S., Youn M., Nam S. W., Kim Y., Kim S. H., Park W., Park S. (2009): Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 72(2):325-331.
- Li T., Mei Y., He B., Sun X., Li J. (2018): Reducing quorum sensing mediated virulence factors expression and biofilm formation in *Hafnia alvei* by using the potential quorum sensing inhibitor l-carvone. *Frontiers in Microbiology*, 9:3324.
- Liu M., Gray J. M., Griffiths M. W. (2006): Occurrence of proteolytic activity and N-acyl-homoserine lactone signals in the spoilage of aerobically chill-stored proteinaceous raw foods. *Journal of Food Protection*, 69(11):2729-2737.
- Liu M., Wang H., Griffiths M. W. (2007): Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6):2174-2184.
- Maddocks S. E., Jenkins R. E. (2013): Honey: A sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance? *Future Microbiology*, 8(11):1419-1429.
- Medina-Martinez M.S., Uyttendaele M., Demolder V., Debevere J. (2006): Influence of food system conditions on N-acyl-L-homoserine lactones production by *Aeromonas* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3):244-252.
- Pinto U. M., de Souza Viana E., Martins M. L., Vanetti M. C. D. J. F. C. (2007): Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychro-trophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control*, 18(10):1322-1327.
-

- Ravn L., Christensen A. B., Molin S., Givskov M., Gram L. (2001): Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *Journal of Microbiology Methods*, 44(3):239-251.
- Silagyi K., Kim S. H., Lo Y. M., Wei C. I. (2009): Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. *Food Microbiology*, 26(5):514-519.
- Skandamis P. N., Stopforth J. D., Ashton L. V., Geornaras I., Kendall P. A., Sofos J. N. (2009): *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. *Food Microbiology*, 26(1):112-19.
- Smith J. L., Fratamico P. M., Novak J. S. (2004): Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*, 67(5):1053-70.
- Wang X. Y., Xie J. (2020): Quorum Sensing System-Regulated Proteins Affect the Spoilage Potential of Co-cultured *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas fluorescens* From Spoiled Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) as Determined by Proteomic Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11:940.
- Yuan L., Sadiq F. A., Burmolle M., Liu T., He G. (2018): Insights into bacterial milk spoilage with particular emphasis on the roles of heat-stable enzymes, biofilms, and quorum sensing. *Journal of Food Protection*, 81(10):1651-1660.
- Zhao X., Yu Z., Ding T. (2020): Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms*, 8(3):425.

Рад примљен: 13.05.2022.

Рад прихваћен: 25.07.2022.

---

DOI 10.7251/VETJEN2201018B

UDK 006.4:[663/664:658.562

Review scientific paper

## QUORUM SENSING IN FOOD MICROBIOLOGY

Snežana BULAJIĆ, Tijana LEDINA, Jasna ĐORĐEVIĆ\*

Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Belgrade, Serbia

\*Corresponding author: Jasna Đorđević, jasna.djordjevic@vet.bg.ac.rs

### Summary

In the last few decades, our perception of bacteria and their communities has changed significantly. In the past, the prevailing opinion was that bacterial communities represent a population of cells that act individually. Today, there is a well-documented fact that the mechanism of intercellular communication, known as "*quorum sensing*", plays an important role in controlling various cellular processes of bacteria such as bioluminescence, virulence, tolerance to disinfectants, sporulation, motility, biofilm formation and antimicrobial resistance.

Understanding the intercellular communication system gives the possibility to control the growth of undesirable bacteria in the food matrix and to develop a new strategy in ensuring the food quality and safety.

**Keywords:** quorum sensing, food quality and safety.

### INTRODUCTION

„*Quorum sensing*“ (QS), term established by Fuqua and Winans (1994), represents a universal mechanism by which bacteria recognize changes in the environment. Recognizing newly established changes, the microbial world has the ability to react in a timely manner, by developing a specific defense strategy in order to adapt to unfavorable conditions in environment and during a time. In this way, by the act of socialization (association) at the moment when the population density reaches a critical level, bacteria synchronize their behavior and thereby optimize the chances of survival in competitive niches.

Numerous gram-negative and gram-positive species of bacteria are capable of adapting their activities to the social community and coordinating collective behavior within a multimicrobial community. The mechanism of combined expression involves the synthesis of low-molecular signal molecules. Bacteria ("emitter" cells) continuously generate a signal, at the beginning of growth in a

low concentration, and then, as the population density increases over time, the signal accumulates. Once, when the concentration of the signal reaches a critical level, which the bacteria perceive as a "quorum", the signal reacts with the receptor protein of the "responder" cell, and through the coordinated expression of certain genes, a unique, common response of the community is triggered in order to survive.

Processes controlled by the "*quorum sensing*" system include bioluminescence, sporulation, competence, production of antimicrobial peptides, biofilm formation, antimicrobial resistance, secretion of virulence factors, toxin production, transfer of conjugative plasmids, as well as production of enzymes whose activity is linked to food spoilage (Smith et al., 2004; Zhao et al., 2020; Wang and Xie, 2020).

### Types of signaling molecules

Basically, the "*quorum sensing*" system involves the production and reading of extracellular signals. Signals are chemicals, signal molecules, so-called autoinducers. Often, although not always, the genes responsible for the synthesis of signaling molecules and the response to them activate their own expression, which explains the name autoinducer. According to Ammor et al. (2008), the identified signaling molecules are divided into 4 categories:

1. N-acyl homoserine lactones (AHL), derivatives of fatty acids, generically called autoinducers 1 (AI-1); they are produced and used by gram-negative bacteria mainly for intraspecies communication. The intracellular accumulation of a sufficient concentration of AHL triggers the transcriptional activation of various promoters within the bacterial genome. Several factors such as temperature, pH, NaCl content, growth medium composition and growth phase can affect the amount of AHLs produced. The production of C<sub>4</sub>-homoserine lactone by *Aeromonas hydrophila* 519 depends on the growth temperature, glucose and salt concentration, as well as the pH value of the cultivation medium (Medina-Martinez et al., 2006). The same authors determine that at a basic pH value, AHLs become unstable and undergo hydrolysis. As bacteria enter the stationary phase, the amount of AHL decreases (Ravn et al., 2001). Examples of AHL-regulated phenotypes include antimicrobial peptide production, antimicrobial resistance, biofilm formation, DNA uptake competence status, cell differentiation, bioluminescence, growth, plasmid transfer, expression of virulence factors, as well as production of various extracellular enzymes.
-

2. furanosyl borate diester, known as autoinducer 2 (AI-2); they are created by gram-negative and gram-positive bacteria and thus serve as a universal signal for communication within and between species; responsible for the modulation of several phenotypic changes, such as expression of virulence factors, levels of ABC transporters in *Salmonella Typhimurium*, production of proteases, transcription of numerous genes in *Escherichia coli*, bioluminescence in *Vibrio* spp. Production of AI-2, as in the case of AI-1, is conditioned by the temperature and formulation of the growth medium, as well as changes in intracellular metabolism and the action of stressors.
  3. autoinducer 3 (AI-3) is a signal for virulence genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC); the production of this autoinducer has also been found in the intestinal microbiota of humans, which implies a possible role in communication between species.
  4. autoinduced peptides (AIP) produced and used by gram-positive bacteria. AIPs are synthesized on ribosomes as precursor peptides, transformed into an active peptide and exported outside the cell by the action of ABC transporters in an ATP-dependent process. These peptides are characterized by low molecular weight (5-26 amino acid residues), high stability, specificity and diversity. The signal of these peptides is usually read on the cell surface via the histidine kinase sensor, when the autophosphorylation of the kinase triggers the phosphorylation of the regulatory protein, which ultimately leads to the transcription of the corresponding genes. Examples of phenotypes modulated by the activity of autoinduced peptides include genetic competence and sporulation in *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae*, virulence in *Enterococcus faecalis*, as well as production of antimicrobial compounds such as nisin (*Lactococcus lactis*) and subtilisin (*Bacillus subtilis*). Nevertheless, a typical example of an AIP-mediated QS mechanism is the *agr* system in *Staphylococcus aureus* (Abisado et al., 2018) and *Listeria monocytogenes*. *Staphylococcus aureus* represents the commensal microbiota of humans, but it also exhibits pathogenic properties after penetrating the host's tissue. The pathogenicity mechanism of staphylococci implies a biphasic strategy: at low population density, staphylococci express proteins that promote adherence to mucosal surfaces and colonization, while at high population concentration, these properties are extinguished, and the secretion of toxins and proteases is initiated, which promotes the dissemination of staphylococci. This "switch" in gene expression is regulated by the *agr* QS mechanism.
-

More recently, other types of signaling molecules have been described, such as cholera autoinducer 1, diketopiperazines, 4-hydroxy-2-alkylquinoline diffusible signaling factors (Wang and Xie, 2020), various metabolic products such as indole, short-chain fatty acids, secondary bile acids (Buffie et al., 2015).

### ***Quorum sensing in the context of microbial ecology***

In most cases, previous studies of the QS mechanism were related to the study of the molecular aspect of intercellular communication, that is, how QS affects virulence, sporulation or conjugation. Less attention was given to the ecological concept at the center of which lies the main question - why do bacteria produce signal molecules in the first place, guided by the basic ecological paradigm - everything is related to everything else, but also how the determinants of the ecological niche affect communication, especially in the case when the niche is represented by complex food ecosystems. Although the production of signaling molecules (AI-1, AI-2) is associated with certain members of the food microbiota (*Pseudomonas* species, members of the *Enterobacteriaceae* family, lactic acid bacteria), very little is known about the influence of process parameters and storage conditions on quality and quantity of these signals in food. It is known that the dominance of one group of bacteria in the continuum of food production and processing is the result of a complex process of microbial succession, when a specific population, thanks to its implicit characteristics and the adoption of a specific strategy, acquires numerical superiority in a niche that is established as an interplay of the physicochemical characteristics of the food matrix and storage conditions. In most cases, the food matrix implies the association of microbial cells with a solid substrate, and these cells are immobilized and localized in certain microenvironments in high concentration, and growth is present in the form of microcolonies or biofilms. At different places within the food matrix, there are variations in the level of oxygen, water activity, nutrients and pH values. Based on the interaction of all these factors, the food matrix is presented through a series of interconnected microenvironments, some of which can favor the growth of bacteria. The growth dynamics and activity of bacteria present in food, whether they are spoilage agents, pathogenic bacteria or beneficial microbiota, is determined, to a large extent, by *in situ* intercellular ecological interactions. For this reason, an ecological approach is necessary in understanding intercellular communication in different food ecosystems. Very likely, looking at the ecological dimension of the QS mechanism would provide answers to the following important questions:

- What is the critical concentration of the QS signal required for the bacteria to recognize the quorum and initiate gene expression?
-

- Is there a concentration gradient or chemical signal degradation due to dynamic (abiotic) conditions?
- Is the spatial distribution of cells more important than population densities in the generation and reading of QS signals?
- Is it possible that other species or strains of bacteria, which coexist in the same niche, deactivate and/or produce the same autoinducer?

### ***Quorum sensing in food microbiology***

Intercellular communication attracts the attention of food microbiologists due to the evidence of the connection between QS and food spoilage (Ammor et al., 2008; Skandamis et al., 2009; Galić et al., 2018) and the fact that different signaling molecules have been isolated from the matrix of spoiled food (Blana and Nychas, 2014), but also due to the importance of QS in bacterial pathogenesis (Li et al., 2018). In addition, the role of QS in the formation of biofilm in the process environment is undeniable (Galić et al., 2018).

### ***Quorum sensing and food spoilage***

Spoilage of food of animal origin is mainly associated with the activity of gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria, mostly *Pseudomonas* spp., and genera of the *Enterobacteriaceae* family, i.e. lactic acid bacteria if the food is stored in modified atmosphere conditions. In addition, the activity of hydrolases, mainly phospholipases originating from gram-positive aerobic *Bacillus* spp., is responsible for the spoilage of milk and milk products.

*Pseudomonas* spp. represent the dominant microbiota of aerobically packaged refrigerated meat, reaching a level of  $10^9$  CFU/g in case of meat spoilage (Liu et al., 2006). Jay et al. (2003) determined the connection between QS and meat spoilage caused by the activity of *Pseudomonas* spp., *Hafnia alvei* and *Serratia* spp., as dominant psychrotrophic species of the *Enterobacteriaceae* family isolated from spoiled meat packed in vacuum and identified as significant AHL producers. A large number of AHLs is determined in refrigerated beef and poultry meat stored in aerobic conditions, in a situation where a high concentration of *Pseudomonadaceae* (108-109 CFU/g) and *Enterobacteriaceae* (103-104 CFU/g) is recorded, with significant proteolytic activity (Liu and et al., 2006).

Yuan et al. (2018) assume the role of the QS mechanism during the growth and metabolic activity of *Pseudomonas fluorescens*, a frequent cause of spoilage of milk and milk products, due to the ability of the species to synthesize AHL and extracellular proteases. Most (84.5%) strains of psychrotrophic proteolytic microbiota isolated from raw milk are characterized by AHL production (Pinto et al., 2007). Although *Pseudomonadaceae* and *Enterobacteriaceae* cannot be

---



isolated from pasteurized and sterilized milk, the determined prevalence of AHLs indicates that AHLs produced by the initial microbiota of raw milk retain their activity completely, or at least partially, after thermal treatment. The production of alkaline metalloprotease in *Pseudomonas fluorescens* strain 395, which has a pronounced proteolytic activity, is regulated by the QS system (Liu et al., 2007). The production of extracellular lipolytic and proteolytic enzymes by *Serratia proteamaculans* strain B5a is controlled by the QS system (Christensen et al., 2003).

### ***Quorum sensing and biofilm formation***

Biofilm represents a complex ecosystem of one or more types of bacteria immersed in an extracellular polymer matrix. It develops according to patterns of multicellular behavior and in its final form functions as a cooperative consortium of bacteria in a complex but coordinated manner. This sessile way of life offers numerous advantages to associated members - greater resistance to stressful environmental conditions, insensitivity to antimicrobial agents as well as sanitation and disinfection agents, which makes it impossible to eradicate biofilm from the process environment. In addition, the microbial community of the biofilm shows a primitive homeostasis, a primitive circulatory system, the exchange of genetic material and the principle of metabolic cooperation.

The first step in biofilm formation involves conditioning the surface of the material and reversibly attaching cells to the same material. Then, binding becomes irreversible and microcolonies are formed. Finally, the film acquires a three-dimensional structure and the complex ecosystem is ready for dispersion. The milk industry, due to the specificity of the raw substrate (fluid) and the variety of technological processes (different temperature profiles), provides numerous opportunities for biofilm colonization. Tanks for raw milk, pipelines, centrifuges, duplicators for cheese, flow plate heat exchangers and packaging machines are examples of the so-called surface substrates on which biofilms are ideally formed. They are of particular importance since they represent a continuous, recurring source of contamination, which in the extreme case damages the quality and microbiological integrity of the final product.

The QS system is involved in all phases of biofilm formation: regulation of population density, synchronization of metabolic activity, so that the activity corresponds to the nutritional requirements, but also to the availability of the nutrient substrate. In addition, biofilm-resident bacteria show a significantly different genome/transcriptional program compared to free-living planktonic cells. The role of the QS system in the formation of biofilms was investigated in most cases in gram-negative bacteria, where acylated homoserine lactones (AHL) act as

---

signaling molecules. In a situation when the AHL concentration reaches a critical level, AHL binds to the receptor molecule and the formed complex, in response to stressful environmental conditions, triggers the expression and secretion of virulence factors, extracellular proteases, biofilm formation, as well as other physiological functions (Li et al., 2018).

*In vitro* studies show that *Salmonella* spp. readily adhere to work surfaces and form a biofilm (Coughlan et al., 2016). *Salmonella* spp. and *E. coli* do not have the *luxI* gene that encodes AHL synthetase and therefore do not have the ability to synthesize AHL. However, these microorganisms possess a LuxR homologue, SdiA, which detects a signal produced by other bacterial species. The presence of small concentrations of AHL produced by other bacteria induces biofilm formation in *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Vibrio* spp. (Jamuna Bai and Ravishankar Rai, 2016). Silagyi et al. (2009) determined that AI2 mediates the formation of *E. coli* biofilm, where the activated QS system also participates in the regulation of chemotaxis, flagella synthesis and expression of genes responsible for motility.

The presence of C12 HSL, one of the AHL signals, affects the formation of *Salmonella* Enteritidis biofilm and promotes the expression of virulence factors in anaerobic conditions (Almeida et al., 2017). Lamas et al. (2016) establish a link between biofilm formation by *S. enterica* and the expression of QS-related genes. In *Campylobacter jejuni*, AI-2 synthesis plays a major role in biofilm formation (Bezek et al., 2016). Biofilm formation in *Vibrio* spp. depends on several key enzymes, involved in the biosynthesis of flagella, pila and polysaccharides, as well as protein regulators that control the expression of the same genes (Giaouris et al., 2015). *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* are present in contaminated food and water, especially seafood, where they form densely packed biofilms, which is a key factor in their survival in the environment (Galić et al., 2018). The QS system also controls the formation of biofilms in gram-positive foodborne pathogenic bacteria: *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens* and *B. cereus* (Coughlan et al., 2016). *L. monocytogenes* forms biofilms on abiotic surfaces in community with other bacteria, such as *Pseudomonas* spp. and *E. coli* (Giaouris et al., 2015). It was found that lactose induces biofilm formation in *B. cereus*, in a way that increases the production of AI-2 molecules (Duanis-Assaf et al., 2015). The Agr QS system in *S. aureus* differs from other QS systems since it has been proven that the expression of Agr leads to the down-regulation of genes responsible for bacterial adhesion. Thus, the expression of Agr reduces the adhesion potential of bacteria and indirectly affects the reduced capacity of biofilm formation.

---

### Inhibition of QS system

As the QS system relies on the creation and transfer of small signaling molecules between bacteria, it is realistic to expect that the same molecules (AI) can be used to control the growth and survival of bacteria, as well as to modulate their virulence profile. Inhibition of the QS system, a mechanism known as "Quorum Quenching" (QQ), represents a new strategy in the control of specific bacterial phenotypes (bioluminescence, biofilm formation, virulence, swarming effect).

There are several possible ways of inhibiting the QS system:

1. Inhibition of AHL synthesis,
2. Degradation of AHL signal by enzyme activity (AHL-acylase and AHL-lactonase)
3. Interference with receptors or blocking of the AHL/receptor complex (Lade et al., 2014).
4. Post-transcriptional control of QS enzymes via sRNA.

Natural (isolated from various sources) and synthetic QS inhibitors are intensively studied. Extracts of different herbs show great potential. Methanolic extract of mango leaves reduces the production of protease, elastase, pyocyanin, as well as exopolysaccharides, and the swarming effect and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* (Husain et al., 2017). In the study of the same authors, more than 14 ingredients, including trifluoromethylketones and phenothiazines, were identified in the extract of mango leaves, with possible anti-QS action, namely by inhibiting "efflux" pumps, although it is very likely that they act on more than one target site.

Teas, especially polyphenols extracted from tea leaves, represent a traditional source of natural components, which have recently been intensively tested as possible anti-QS agents. Epigallocatechin gallate, the most abundant polyphenolic antioxidant metabolite from green tea, shows a strong inhibitory effect in relation to the expression of genes (biofilm formation, and motility) regulated by the QS system of *E. coli* (Lee et al., 2009). Spices such as black pepper, garlic, cumin and cinnamon show promising results as anti-biofilm agents.

Fruits, such as cranberries, strawberries and blackberries, contain, among other ingredients, phenols, quinones, flavonoids, alkaloids, terpenoids and polyacetylenes, which have proven to be successful as anti-QS agents, based on interference with AHL synthesis, inhibition of the production of AI- 2 (Bezek et al., 2016) or down-regulation of QS-related genes.

Quercetin (present in fruits, vegetables, nuts and cereals) shows a significant reduction of QS-dependent phenotypes of certain pathogenic food-borne bacteria (*P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* and *K. pneumoniae*), especially biofilm formation, exopolysaccharide production and motility (Gopu et al., 2015).

---

Vegetables and grains such as rice, tomatoes, soybeans, onions and broccoli also produce substances that mimic the activity of AHL signals (Jakobsen et al., 2012). Essential oils have proven to be good inhibitors of biofilm formation, primarily through the mechanism of AHL signal degradation or inhibition of AHL synthesis.

As alternative sources of QS system inhibitors, bioactive components originating from bacteria are mentioned, since it is quite certain that bacteria have adopted this mechanism in order to provide a competitive advantage in the niches in which they exist. In this sense, the members of soil microbiota are particularly interesting, which have been confirmed to produce enzymes (AHL-lactonases and AHL-acylases) capable of breaking down QS molecules, but also many so-called -ocins, such as bacteriocins, lactocins, enterocins and nisin (Choyam et al., 2019). Bee products are also recognized as a significant source of molecules with an anti-QS mechanism of action, especially propolis (Bulman et al., 2011) and honey (Maddocks and Jenkins, 2013).

One of the possible solutions in "turning off" the QS system is the application of paraoxonases, enzymes isolated from the serum of mammals, fungi and various plants. These enzymes block the QS system based on the hydrolysis of the lactone ring of N-acyl homoserine lactone (AHL) (Galić et al., 2018).

## CONCLUSION

The QS system regulates the expression of genes responsible for coding many vital functions, which enable bacteria to survive in unfavorable environmental conditions. In an effort to bring the QS system under control, numerous antagonists of signaling molecules have been identified. It is important that food microbiologists are aware of the importance, but also understand the QS system, since strategies that "turn off" the quorum sensing mechanism in the bacterial population represent an effective tool for controlling the growth of undesirable bacteria in food.

## Acknowledgment

The study was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Contract number 451-03-68/2022-14/200143).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

---

## REFERENCES

- Abisado R. G., Benomar S., Klaus J. R., Dandekar A. A., Chandler J. R. (2018): Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *mBio*, 9(3):e02331-17.
- Almeida F. A., Pimentel-Filho N. J., Pinto U. M., Mantovani H. C., Oliveira L. L., Vanetti M. C. (2017): Acyl homoserine lactone-based quorum sensing stimulates biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis in anaerobic conditions. *Archives of Microbiology*, 199(3):475-486.
- Ammor M. S., Michaelidis C., Nychas G. J. E. (2008): Insights into the Role of Quorum Sensing in Food Spoilage. *Journal of Food Protection*, 71(7):1510-1525.
- Bezek K., Kurincic M., Knauder E., Klancnik A., Raspor P., Bucar F., Smole Mozina S. (2016): Attenuation of adhesion, biofilm formation and quorum sensing of *Campylobacter jejuni* by *Euodia ruticarpa*. *Phytotherapy Research*, 30(9):1527-1532.
- Blana V. A., Nychas G. J. E. (2014): Presence of quorum sensing signal molecules in minced beef stored under various temperature and packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 173(3):1-8.
- Buffie C. G., Bucci V., Stein R. R., McKenney P. T., Ling L., Gobourne A., No D., Liu H., Kinnebrew M., Viale A., Littmann E., van den Brink M. R. M., Jenq R. R., Taur Y., Sander C., Cross J. R., Toussant N. C., Xavier J. B., Pamer E. G. (2015): Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature*, 517(7533):205-8.
- Bulman Z., Le P., Hudson A. O., Savka M. A. (2011): A novel property of propolis (bee glue): Anti-pathogenic activity by inhibition of N-acyl-homoserine lactone mediated signaling in bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(3):788-797.
- Choyam S., Srivastava A. K., Shin J. H., Kammara R. (2019): Ocins for food safety. *Frontiers in Microbiology*, 10:1736.
- Christensen A. B., Riedel K., Eberl L., Flodgaard L. R., Molin S., Gram L., Givskov M. (2003): Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. *Microbiology*, 149(Pt 2):471-483.
- Coughlan L. M., Cotter P. D., Hill C., Alvarez-Ordóñez A. (2016): New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiology*, 7:1641.
- Duanis-Assaf D., Steinberg D., Chai Y., Shemesh M. (2015): The LuxS based quorum sensing governs lactose induced biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, 6:1517.
-

- Fuqua W. C., Winans S. C. (1994): A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of Bacteriology*, 176:2796-2806.
- Galić S., García-Gutiérrez C., Miguélez E. M., Villar C. J., Lombó F. (2018): Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9:898.
- Giaouris E., Heir E., Desvaux M., Hebraud M., Moretro T., Langsrud S., Doulgeraki A., Nychas G. J., Kačaniova M., Czaczyk K., Olmez H., Simoes M. (2015): Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6:841.
- Gopu V., Meena C. K., Shetty P. H. (2015): Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: In-vitro and in-silico evidence. *PLoS One*, 10(8):e0134684.
- Husain F. M., Ahmad I., Al-Thubiani A. S., Abulreesh H. H., AlHazza I. M., Aqil F. (2017): Leaf extracts of *Mangifera indica* L. inhibit quorum sensing - regulated production of virulence factors and biofilm in test bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8:727.
- Jakobsen T. H., Bragason S. K., Phipps R. K., Christensen L. D., van Gennip M., Alhede M., Skindersoe M., Ostefeld Larse T., Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M. (2012): Food as a source for quorum sensing inhibitors: Iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7):2410-2421.
- Jamuna Bai A., Ravishankar Rai V. (2016): Effect of small chain N acyl homoserine lactone quorum sensing signals on biofilms of food-borne pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9):3609-3614.
- Jay J. M., Vilai J. P., Hughes M. E. (2003): Profile and activity of the bacterial biota of ground beef held from freshness to spoilage at 5–7 degrees C. *International Journal of Food Microbiology*, 81(2):105-11.
- Lade H., Paul D., Kweon J. H. (2014): Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling. *International Journal of Biological Sciences*, 10(5):550-565.
- Lamas A., Miranda J. M., Vazquez B., Cepeda A., Franco C. M. (2016): Biofilm formation, phenotypic production of cellulose and gene expression in *Salmonella enterica* decrease under anaerobic conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 238:63-67.
- Lee K. M., Kim W. S., Lim J., Nam S., Youn M., Nam S. W., Kim Y., Kim S. H., Park W., Park S. (2009): Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against
-

- enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 72(2):325-331.
- Li T., Mei Y., He B., Sun X., Li J. (2018): Reducing quorum sensing mediated virulence factors expression and biofilm formation in *Hafnia alvei* by using the potential quorum sensing inhibitor l-carvone. *Frontiers in Microbiology*, 9:3324.
- Liu M., Gray J. M., Griffiths M. W. (2006): Occurrence of proteolytic activity and N-acyl-homoserine lactone signals in the spoilage of aerobically chill-stored proteinaceous raw foods. *Journal of Food Protection*, 69(11):2729-2737.
- Liu M., Wang H., Griffiths M. W. (2007): Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6):2174-2184.
- Maddocks S. E., Jenkins R. E. (2013): Honey: A sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance? *Future Microbiology*, 8(11):1419-1429.
- Medina-Martinez M.S., Uyttendaele M., Demolder V., Debevere J. (2006): Influence of food system conditions on N-acyl-Lhomoserine lactones production by *Aeromonas* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3):244-252.
- Pinto U. M., de Souza Viana E., Martins M. L., Vanetti M. C. D. J. F. C. (2007): Detection of acylated homoserine lactones in gram-negative proteolytic psychro-trophic bacteria isolated from cooled raw milk. *Food Control*, 18(10):1322-1327.
- Ravn L., Christensen A. B., Molin S., Givskov M., Gram L. (2001): Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *Journal of Microbiology Methods*, 44(3):239-251.
- Silagyi K., Kim S. H., Lo Y. M., Wei C. I. (2009): Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. *Food Microbiology*, 26(5):514-519.
- Skandamis P. N., Stopforth J. D., Ashton L. V., Geornaras I., Kendall P. A., Sofos J. N. (2009): *Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions. *Food Microbiology*, 26(1):112-19.
- Smith J. L., Fratamico P. M., Novak J. S. (2004): Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection*, 67(5):1053-70.
- Wang X. Y., Xie J. (2020): Quorum Sensing System-Regulated Proteins Affect the Spoilage Potential of Co-cultured *Acinetobacter johnsonii* and
-

*Pseudomonas fluorescens* From Spoiled Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) as Determined by Proteomic Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11:940.

Yuan L., Sadiq F. A., Burmolle M., Liu T., He G. (2018): Insights into bacterial milk spoilage with particular emphasis on the roles of heat-stable enzymes, biofilms, and quorum sensing. *Journal of Food Protection*, 81(10):1651-1660.

Zhao X., Yu Z., Ding T. (2020): Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms*, 8(3):425.

Paper received: 13.05.2022.

Paper accepted: 25.07.2022.

---



DOI 10.7251/VETJSR2201031J

UDK 637.5.05/.06:614.31

## Оригинални научни рад

### ДЕКЛАРИСАЊЕ МЕСА – МИШЉЕЊЕ И ПОВЕРЕЊЕ ПОТРОШАЧА

Јелена ЈАЊИЋ<sup>1\*</sup>, Милан Ж. БАЛТИЋ<sup>1</sup>, Мирјана ЛОВРЕНОВИЋ<sup>2</sup>,  
Славен ГРБИЋ<sup>3</sup>, Драго НЕДИЋ<sup>1</sup>, Споменка ЂУРИЋ<sup>1</sup>, Бранислав  
ВЕЈНОВИЋ<sup>1</sup>, Лазо ПЕНДОВСКИ<sup>4</sup>, Милорад МИРИЛОВИЋ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд,  
Србија

<sup>2</sup> Инспекторат Републике Српске, Бања Лука, Босна и Херцеговина

<sup>3</sup> Паневропски универзитет Апеирон, Факултет здравствених наука, Бања  
Лука, Босна и Херцеговина

<sup>4</sup> Универзитет „Св. Кирил и Методиј” во Скопје, Факултет за ветеринарна  
медицина, Скопје, Република Северна Македонија

\*Коресподентни аутор: Јелена Јањић, jekonbg@gmail.com

#### Сажетак

Један од главних циљева мера безбедности хране је повећање поверења потрошача у храну уопште, а месо нарочито, те се стога потрошачу путем декларисања пружају информације о квалитету и безбедности меса. Поверење потрошача и безбедност хране постали су централно питање у ланцу исхране. Недавни развоји у области обележавања, следљивости и шема осигурања квалитета нуде широке токове информација доступних потрошачу. Декларисање је данас један од најпоузданијих начина информисања потрошача о квалитету хране. За потребе овог истраживања подаци су прикупљени анкетирањем 1.000 потрошача са подручја Бања Луке и Градишке. Резултати овог испитивања показују да највећи део потрошача (98,1%) сматра да месо треба да има декларацију и статистички најважнија ( $p < 0,05$ ) информација на декларацији јесте рок трајања (75,8% одговора) у односу на остале информације (хранљивост, начин производње, земља порекла). За потрошаче је, такође, значајан и начин паковања меса (45,3% одговора). Такође, утврђене су статистичке значајности разлика ( $p < 0,05$ ) у одговорима о поверењу у информације о безбедности/квалитету меса добијених на различите начине (месар, продавац, рођак, познаник, кулинар). Испитани потрошачи највише верују информацијама о безбедности/квалитету меса добијених од лекара/нутриционисте (53,1%), а најчешће неутралан однос имају према информацијама добијеним од

удружења за заштиту потрошача (41,9%). Није довољно разјашњено који тип информација потрошачи највише траже на декларацијама, нарочито када је питању месо и производи од меса, због чега је оправдано континуирано испитивање потрошача, укључујући социолошке и економске факторе, шта их мотивише да купују, које карактеристике квалитета захтевају и којим изворима информисања највише верују.

**Кључне речи:** безбедност и квалитет меса, обележавање меса, порекло информација.

### УВОД

Објективне информације у вези са прехранбним производима не гарантују поверење потрошача у исте. Један од главних циљева мера безбедности хране је повећање поверења потрошача у храну и смањење неизвесности, те се стога потрошачу пружају информације о квалитету и безбедности меса. Поверење потрошача и безбедност хране постали су централно питање у ланцу исхране (Grunert, 2005; Röhr и сар., 2005; Verbeke, 2005).

Као крајњи корисници у ланцу производње меса, потрошачи заузимају кључну позицију будући да се налазе на крају овог ланца, међутим са аспекта инспирације за организацију ланца вођену потрошачима или оријентације планирања тржишта, потрошачи се могу наћи на првом месту „ланца вођеног потрошачима и оријентације планирања тржишта“. Ова друга позиција чини потражњу потрошача за безбедном и здравом храном уопште, и месом посебно, највећом покретачком снагом за увођење различитих информационих система као што су брендирање, следљивост и шеме осигурања квалитета (Gellynck и Verbeke, 2001).

У контексту система исхране, поверење је уско повезано са ризиком. Интересантна је повезаност између поверења и ризика јер поверење не препознаје присуство ризика. У случају поверења, ризик се не примећује. Истовремено, количина поверења у храну може се дефинисати као супротна количини ризика од хране (Grunert, 2005). Штавише, однос између ризика у храни и поверења је обрнуто пропорционалан јер ће људи који имају већи ниво поверења у систем исхране бити мање забринути за ризике и обрнуто (Knight и Varland, 2005). Дихотомија између поверења и ризика је повезана са пружањем информација, јер се поверење може схватити као индивидуални и субјективни одговор на објективни и прилично апстрактни појам ризика (Berg, 2004). На тај начин комуникацијске стратегије морају узети у обзир трансформацију објективног ризика у субјективни одговор у смислу поверења.

Недавни развоји у области обележавања, следљивости и шема осигурања квалитета нуде широке токове информација доступних потрошачу. У погледу перцепције потрошача, међутим, то није тако једноставно. Објективна информација се не рефлектује аутоматски у перцепцији, јер ово последње не зависи само од количине објављених информација, већ и од емоционалног садржаја поруке (Rosa и сар., 2006). Објективни садржај поруке ће различито доживљавати различити потрошачки сегменти (Bernués и сар., 2003; Frewer и сар., 2005; Miles и Frewer, 2001; Verbeke и Vackier, 2004). Такође, постоји реална потенцијална опасност од преоптерећења потрошача информацијама. Повећане количине информација, на пример на етикети производа, могу преоптеретити етикету или паковање и отежати издвајање дате и жељене количине информација, или једноставно довести до тога да појединци који немају времена или способности да обрађују информације то игноришу, а самим тим произвођачима опада зарада због смањене заинтересованости за производ (Salaün и Flores, 2001). Такође, дата информација може изазвати досаду и нестрпљење, као и губитак самопоуздања код потрошача због неразумевања ознака на декларацији производа.

Означавање хране је све важнији пут за достављање порука потрошачима о безбедности и исправности хране. Дуго се, међутим, сматрало да није толико битно оно што потрошачи желе и да ли адекватно разумеју и користе информације дате на декларацији. Показало се да и потрошачи често погрешно разумеју или погрешно тумаче информације, нпр. оне које се односе на квалитет или порекло, што доводи до формирања очекивања оног квалитета који можда неће бити потврђен стварним перформансама производа након потрошње (Grunert, 2005).

Декларисање је данас један од најпоузданијих начина информисања потрошача о квалитету хране. До пре нешто више од десет година нису ни постојали посебни прописи о декларисању хране, већ је декларисање било саставни део прописа о квалитету појединих врста хране, нпр. Правилник о квалитету производа од меса (Пропис, 1974). На просторима Републике Српске законски оквир којим се дефинише декларисање хране дат је кроз Закон о храни (Пропис, 2017) и Правилник о пружању информација потрошачима о храни (Пропис, 2018). Циљ ових прописа је да се заштити здравље потрошача, да потрошач на основу података из декларације изврши избор хране коју жели, затим дефинисање правила којима би се спречила техничка препрека у промету хране и да се применом ових прописа управља ризиком у случају опасности о штетном деловању хране на здравље потрошача. За информације о упакованим прехранбеним производима

одговоран је субјекат у пословању храном под чијим се називом, односно пословним именом храна ставља у промет, а за информације о неупакованој храни одговоран је субјекат у пословању храном који пакује храну на месту продаје крајњем потрошачу. Текст декларације за храну треба да садржи следеће податке: назив под којим се храна ставља на тржиште, списак састојака, количину одређених састојака или категорије састојака, нето количину, рок трајања, услове складиштења или услове употребе, назив и адресу субјекта у пословању храном под чијим се називом, односно пословним именом, месо и производи од меса стављају у промет, земљу порекла, упутство за употребу ако се може очекивати да храна не би могла бити исправно припремљена и употребљена без таквог упутства и податке о храњивој вредности који треба да садрже енергетску вредност и количину масти, засићених масних киселина, угљених хидрата, протеина и соли. Законом о храни дефинисани су општи услови за безбедност хране и хране за животиње, обавезе и одговорности субјеката у пословању храном и храном за животиње, укључујући и традиционалне производе, као и друга питања од значаја за безбедност хране и хране за животиње, ради заштите живота и здравља људи, животне средине, потрошача и ефикасност функционисања на тржишту.

Циљ рада био је да се провери да ли поједине информације на декларацији успевају да створе додатно поверење код потрошача у безбедност и исправност меса.

## МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

За потребе овог истраживања, као средство којим ће се испитивати ставови потрошача о квалитету и безбедности меса коришћен је квантитативни упитник.

Анкета је реализована у току 2017. и 2018. године, а анкетом је обухваћено становништво са подручја града Бање Луке и Градишке (урбана средина). Подаци су прикупљани све до момента док није прикупљено 1.000 валидно попуњених образаца анкете, што значи да анкете које нису биле попуњене, односно где нису дати одговори на поједина питања, нису узимане у поступак обраде података.

Демографски подаци о учесницима односе се на: старост, образовање и пол. Учесници анкете били су различите старости од 20 до преко 60 година, на основу чега су подељени у пет група (интервали од десет година). У односу на образовање, најбројнија група у истраживању били су они са средњим образовањем (53,10%), затим испитаници са високим образовањем (38,9%) и

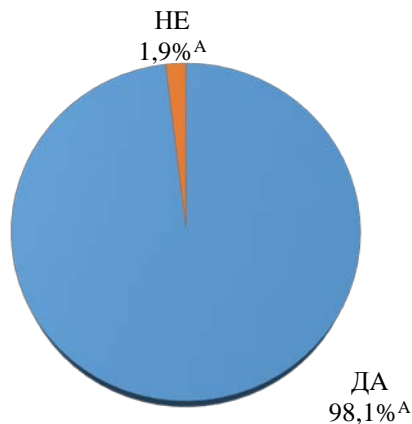
групе са најнижим образовањем. Испитаници су били 45,80% жена и 54,25% мушкараца.

Хи-квадрат тест коришћен је за поређење учесталости непараметријских обележја. Анализом тренда и степеном детерминације приказани су степени слагања испитаника на одређену тврдњу.

Значајност разлика утврђена је на нивоима значајности од 5%. Статистичка анализа добијених резултата урађена је у статистичком пакету PrismaPad 8.00 (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Добијени резултати приказани су табеларно и графички.

### РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

О квалитету меса потрошачи се информишу на различите начине. Један од њих је декларација на производу. Данас се у већини земаља ради на заштити потрошача, па су и њихова права и законски заштићена. Њихова права штите и државне организације за заштиту потрошача, па и невладине непрофитабилне организације (друштва). У Републици Српској декларисање хране је обавезно и највећи део потрошача је упознат са тим. О томе говори податак да 98,1% анкетираних потрошача сматра да месо треба да има декларацију на основу које би се стекле одређене информације о њему (Слика 1).



Легенда: Исто слово <sup>А</sup> –  $p < 0,05$ .

**Слика 1** Декларација на месо – „Мислим да би месо које купујем требало да има декларацију са информацијама о њему“ (n=1000)

На питање које се односи на квалитет и безбедност меса које купују, 56,3% испитаника сматра да декларација даје информације о квалитету и безбедности меса које купују, што је статистички значајно веће ( $p < 0,05$ ) од учесталости одговора да такве информације не могу да добију на декларацији (11,5% одговора). Близу једне трећине испитаника није сигурна да декларација даје информације о квалитету и безбедности меса које купују. Статистичка значајност разлика између три понуђена одговора приказана је у Табели 1. Ово може да се објасни лошим искуством потрошача са декларисањем и стварним квалитетом хране.

**Табела 1** Шта за испитанике представљају информације на декларацији ( $n=1000$ )

Да ли Вам те информације говоре о квалитету и безбедности меса које купујете?	Одговор (%)
Да	56,3 <sup>A,B</sup>
Не	11,5 <sup>A,C</sup>
Нисам сигуран/на	32,2 <sup>B,C</sup>

Легенда: Исто слово <sup>A,B,C</sup> –  $p < 0,05$ .

Према подацима које даје EFSA (2019), за Европску Унију и Србију порекло хране је важно за 53% анкетираних у ЕУ, а 41% анкетираних у Србији. У Србији је далеко важнија цена хране (61% одговора) него у ЕУ (51% одговора). Приближно једнака је важност безбедности хране везане за ризике конзумирања хране испитаника у ЕУ (50%) и Србији (52%), као што је приближно једнака и важност укуса хране при куповини (ЕУ 49%, Србија 52% испитаника). За анкетиране у ЕУ хранљиви састојци хране (витамини, протеини, шећер, масти) далеко су значајнији (44% испитаника) него у Србији (31% испитаника). Такође, за учеснике у анкети из ЕУ етички ставови и уверења (вера, добробит животиња, заштита животне средине) су при куповини хране важнији (19% испитаника) него у Србији (10% испитаника) (Балтић и сар., 2015).

За потрошача је најважнија информација о месу она која се односи на рок трајања (75,8% одговора) и она је статистички значајно већа ( $p < 0,05$ ) од осталих информација (хранљивост, начин производње, земља порекла). Од испитаника њих 30,3% сматра значајним начин производње, што се, кад је у питању свеже месо, односи на хигијену у току клања, обраде трупа, хлађење и расецање меса. Потрошачи придају значај и земљи поријекла меса (за 23,4% испитаника је ово значајно). Из овог одговора не може се стећи сазнање да ли потрошач више верује домаћим прозвођачима него месу које је увезено из неке друге земље. Једна петина (20,5%) потрошача сматра да

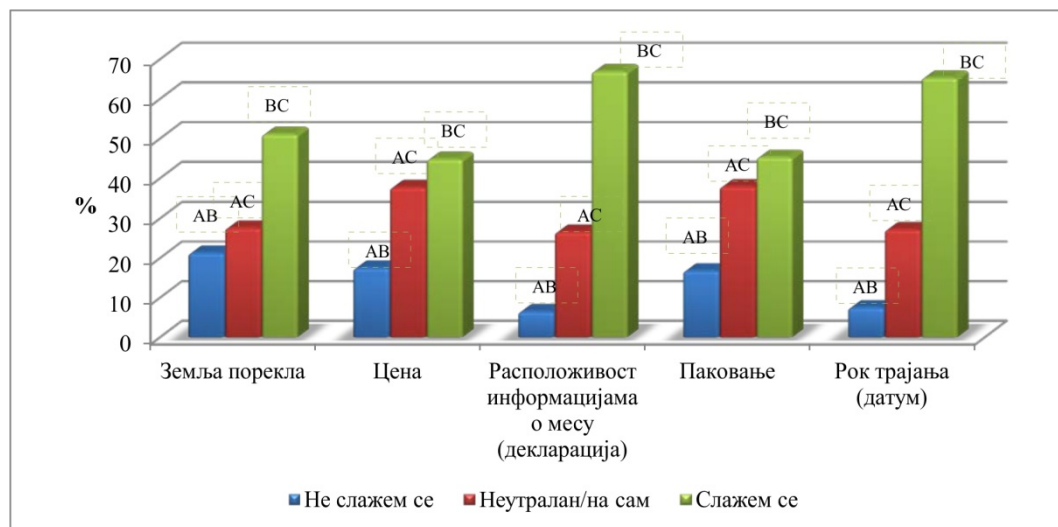
би декларација требала да садржи податке о хранљивој вредности меса, јер је то за њих важна информација. Статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) утврђена је између одговора „Начин производње“ и одговора које се односе на „Хранљивост“, односно „Земљу порекла“ (Табела 2). Једна петина (20,5%) потрошача сматра да би декларација требала да садржи податке о хранљивој вредности меса, јер је то за њих важна информација (Табела 2). Између сва три понуђена одговора о вези између безбедности/квалитета меса и земље порекла утврђена је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ). Статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) утврђена је и између везе безбедност/квалитет меса и цене, затим осталих расположивих информација, рока трајања и начина паковања.

**Табела 2** Најважнија информација на декларацији ( $n=1000$ )

Најважнија информација на декларацији по мом мишљењу је:	Одговор (%)
Хранљивост	20,5 <sup>A,B</sup>
Начин производње	30,3 <sup>A,C,D</sup>
Земља порекла	23,4 <sup>C,E</sup>
Рок трајања	75,8 <sup>B,D,E</sup>

Легенда: Иста слова <sup>A,B,C,D,E</sup> –  $p < 0,05$ ; Укупан збир је већи од 100% због могућности давања више од једног одговора на постављено питање.

О безбедности и квалитету меса потрошачи се информишу и на основу информација на паковању (декларација). Декларација садржи податак о земљи порекла, цену и друге податке о месу који могу да буду од значаја за информисаност потрошача о безбедности/квалитету меса. За потрошаче је, такође, значајан и начин паковања меса (45,3% одговора). Значајан део испитаника, односно преко једне половине (51,1%) сматра, односно даје значај пореклу меса, неутралан став има 26,7%, а преко једне петине (21,3%) сматра да за безбедност/квалитет меса земља порекла није значајна. Између сва три понуђена одговора о вези између безбедности/квалитета меса и земље порекла утврђена је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ). Статистички значајна разлика утврђена је и између везе безбедност/квалитет меса и цене, затим осталих расположивих информација, рока трајања и начина паковања. Статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) утврђена је између степена слагања одговора „Начин производње“ и одговора које се односе на „Хранљивост“, односно „Земљу порекла“ (Слика 2). Да су информације које упућују на квалитет/безбедност меса важне потрошачу говори податак да је степен слагања са наведеним информацијама од 44,8% (цена) до 66,9% (расположивост информацијама).

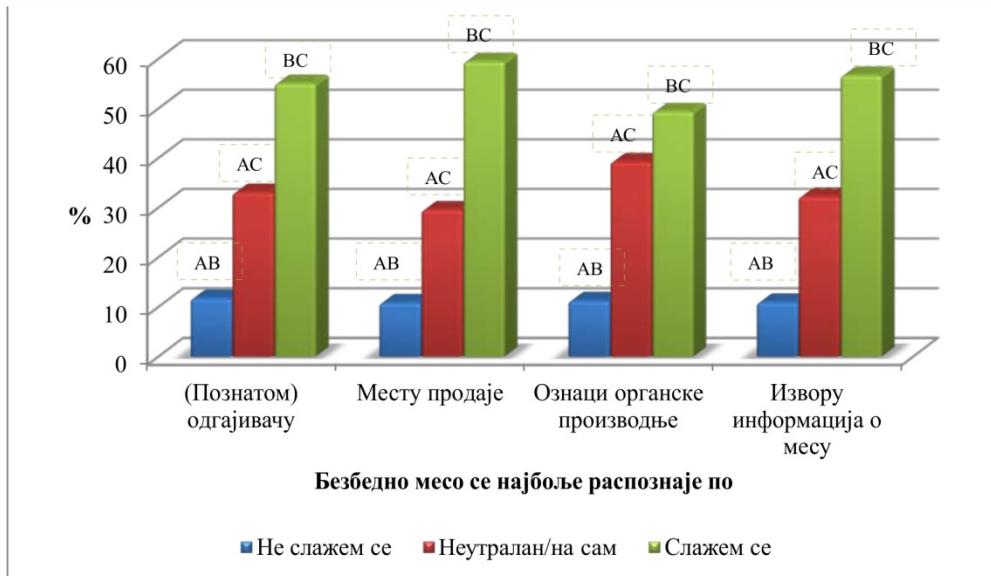


Легенда: Иста слова <sup>A,B,C</sup> –  $p < 0,05$ ; поређени су степени слагања.

**Слика 2** Које информације смарате важним за распознавање безбедности/квалитета меса?

Поред личног искуства и знања која се односе на опредељење приликом куповине меса, као и на основу увида у декларацију и сазнање из текста декларације, потрошачи се о квалитету меса информишу и из других извора. Тако потрошачи у већини случајева безбедност/квалитет меса препознају ако имају податке о одгајивачу, ако те податке добију на месту продаје, ознаци органске производње и извора информација о месу. Између свих понуђених степена слагања утврђена је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) између учесталости одговора (Слика 3).

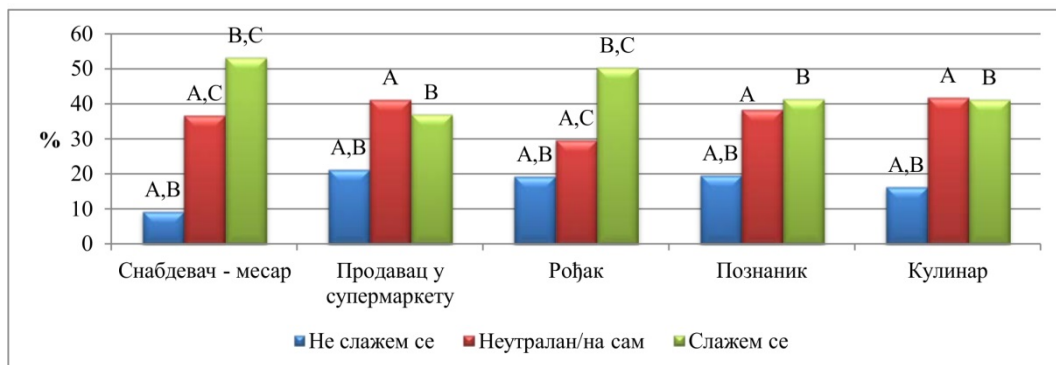




Легенда: Иста слова <sup>A,B,C</sup> –  $p < 0,05$ ; поређени су степени слагања.

**Слика 3** Распознавање безбедности/квалитета меса на основу различитих параметара

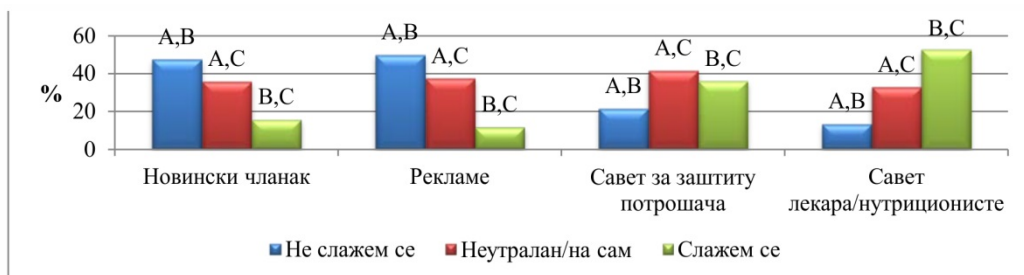
О квалитету/безбедности меса потрошачи се информишу од снабдевача месом, рођака, познаника, кулинера (Слика 4). Мање поверења о особинама меса имају када потичу од продавца у супермаркету, него када о особинама меса добију информацију у месарама. Очигледно је да потрошачи имају више могућности да комуницирају са продавцем у месарама него у супермаркетима. Половина испитаника (50,2%) има поверење у информације добијене од рођака, 41,6% од познаника, 41,4% од савета кулинера. Статистичке значајности разлика о поверењу у инфомације о безбедности/квалитету меса (месар, продавац, рођак, познаник, кулинар) приказане су Сликом 4. У свим случајевима поређења статистички значајно мањи ( $p < 0,05$ ) је увек одговор „Не слажем се“.



Легенда: Иста слова <sup>A,B,C</sup> –  $p < 0,05$ ; поређени су степени слагања.

**Слика 4** Највише поверења у порекло информације о квалитету/безбедности меса имате?

Потрошачи се данас о безбедности/квалитету хране информису и из других извора (средствима јавног информисања, удружења за заштиту потрошача, савет лекара/нутриционисте). Према учесталости одговора „Не слажем се“ потрошачи имају најмање поверења о информацијама које се односе на безбедност/квалитет меса које добијају из реклама (50,2% испитаника), а затим из новинских чланака (47,8% испитаника). Потрошачи највише верују информацијама о безбедности/квалитету меса добијених од лекара/нутриционисте (53,1%), а најчешће неутралан однос имају према информацијама добијеним од удружења за заштиту потрошача (41,9%) (Слика 5). Статистичка значајност разлика између понуђених одговора о поверењу потрошача у информације из средстава јавног информисања, удружења за заштиту потрошача и савета лекара/нутрициониста приказани су Сликаом 5.



Легенда: Иста слова <sup>A,B,C</sup> –  $p < 0,05$ ; поређени су степени слагања.

**Слика 5** Порекло информације о квалитету и безбедности меса - медији, јавно информисање

У Европској Унији (ЕУ 28) према анкети EFSA (2019) потрошачи највише поверења имају у следеће изворе дате по опадајућем низу: научници (82% одговора) > организације потрошача (79%) > пољопривредници (69%) > државне институције (60%) > институције ЕУ (58%) > невладине организације (56%) > новинари (50%) > супермаркети и ресторани (43%) > прехранбена индустрија (36%) > славне личности и особе од утицаја (19%). Овај низ за Србију има нешто другачији редослед: научници (81% одговора) > пољопривредници (70%) > организације потрошача (68%) > државне институције (56%) > прехранбена индустрија (55%) > супермаркети и ресторани (51%) > институције ЕУ (49%) > невладине организације (40%) > новинари (36%) > славне личности и особе од утицаја (32%) (Балтић и сар., 2015).

Потрошачи јасно разликују информационе ознаке у погледу важности и корисности и изгледају много спремније да користе ознаке квалитета претраге него ознаке квалитета веродостојности када доносе одлуке о куповини меса. Овај налаз је у складу са претходним студијама које су објавиле да су потрошачи отворенији за коришћење лако разумљивих и познатих ознака квалитета (Grunert, 2005; Gellynck и сар., 2006). Специфичне информације о следљивости су ниско рангиране у смислу опажене важности и корисности (Hobbs и сар., 2005).

### ЗАКЉУЧАК

Поверење потрошача може се изградити путем осигурања производа и учесника у систему хране. Осигурање производа путем декларација на амбалажи хране које информишу о особинама хране, земљи или региону порекла и следљивост хране је важан скуп опипљивих знакова и извора информација којима потрошачи верују када процењују безбедност и квалитет хране у време куповине. Међутим, нашим испитивањем није довољно разјашњено који тип информација потрошачи највише траже на декларацијама, нарочито када је питању месо и производи од меса, због чега је оправдано континуирано испитивање потрошача, укључујући социолошке и економске факторе, шта их мотивише да купују, које карактеристике квалитета захтевају и којим изворима информисања највише верују.

Будућа истраживања би се могла фокусирати на спремност песимиста да плате за системе следљивости или додатне информације о следљивости, које су проширене информацијама о процесу производње и на прецизнију карактеризацију овог тржишног сегмента (нпр. место куповине, тренутак потрошње меса).

## Захвалница

Ову студију подржало је Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у складу са одредбама Уговора о финансирању истраживања 2021. године (бр. 451-03-68/2022-14/200143).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

## ЛИТЕРАТУРА

- Балтић М. З., Глишић М., Јањић Ј., Марковић Р., Бошковић М., Докмановић М., Ђорђевић Ј. (2015): Значај информисања потрошача при избору намирница. *Ветеринарски Журнал Републике Српске*, 15(1).
- Berg L. (2004): Trust in food in the age of mad cow disease: a comparative study of consumers' evaluation of food safety in Belgium, Britain and Norway. *Appetite*, 42(1):21-32.
- Bernués A., Olaizola A., Corcoran K. (2003): Labelling information demanded by European consumers and relationships with purchasing motives, quality and safety of meat. *Meat science*, 65(3):1095-1106.
- EFSA. (2019): Scientific opinion on the public health hazard to be covered by inspection of meat (swine), European Food Safety Authority, EFSA Journal, 9(10):198.
- Frewer L., Fischer A., Scholderer J., Verbeke W. (2005): Food safety and consumer behaviour. In Innovation in agri-food systems, product quality and consumer acceptance. Wageningen Academic Publishers, 125-145.
- Gellynck X., Verbeke W. (2001): Consumer perception of traceability in the meat chain. *German Journal of Agricultural Economics*, 50(670-2016-45573):368-374.
- Gellynck X., Verbeke W., Vermeire B. (2006): Pathways to increase consumer trust in meat as a safe and wholesome food. *Meat Science*, 74(1):161-171.
- Grunert K. G. (2005): Food quality and safety: consumer perception and demand. *European review of agricultural economics*, 32(3):369-391.
- Hobbs J. E., Bailey D., Dickinson D. L., Haghiri M. (2005): Traceability in the Canadian red meat sector: do consumers care? *Canadian Journal of Agricultural Economics/Revue canadienne d'agroeconomie*, 53(1):47-65.
- Knight A. J., Warland R. (2005): Determinants of food safety risks: A multi - disciplinary approach. *Rural Sociology*, 70(2):253-275.
- Miles S., Frewer L. J. (2001): Investigating specific concerns about different food hazards. *Food quality and preference*, 12(1):47-61.
- Пропис, (2017): Закон о храни. Службени гласник Републике Српске, 19/17.
- Пропис, (1974): Правилник о квалитету производа од меса. Службени лист СФРЈ, 29/74.

- Пропис, (2018): Правилник о пружању информација потрошачима о храни. Службени гласник Републике Српске, 9/18.
- Röhr A., Lüddecke K., Drusch S., Müller M. J., Alvensleben R. V. (2005): Food quality and safety-consumer perception and public health concern. *Food control*, 16(8):649-655.
- Rosa F., Sanchez M., Barrena R. (2006): Confidence in consumer–retailer relations and quality label as a compensation of the inefficiency of beef meat markets: a compared analysis among Canada, Italy and Spain. In 99th European Seminar of the EAAE on ‘Trust and risk in business networks, Proceedings, 235-250.
- Salaün Y., Flores K. (2001): Information quality: meeting the needs of the consumer. *International journal of information management*, 21(1):21-37.
- Verbeke W. (2005): Agriculture and the food industry in the information age. *European review of agricultural economics*, 32(3):347-368.
- Verbeke W., Vackier I. (2004): Profile and effects of consumer involvement in fresh meat. *Meat science*, 67(1):159-168.

Рад примљен: 11.05.2022.

Рад прихваћен: 25.07.2022.

---

DOI 10.7251/VETJEN2201044J

UDK 637.5.05/.06:614.31

**Original Scientific Paper****MEAT DECLARATION – CONSUMER OPINION AND CONFIDENCE****Jelena JANJIĆ<sup>1\*</sup>, Milan Ž. BALTIC<sup>1</sup>, Mirjana LOVRENOVIĆ<sup>2</sup>, Slaven GRBIĆ<sup>3</sup>, Drago NEDIĆ<sup>1</sup>, Spomenka ĐURIC<sup>1</sup>, Branislav VEJNOVIĆ<sup>1</sup>, Lazo PENDOVSKI<sup>4</sup>, Milorad MIRILOVIĆ<sup>1</sup>**<sup>1</sup> University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia<sup>2</sup> Republic of Srpska Inspectorate, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina<sup>3</sup> Pan-European University Apeiron, Faculty of Health Sciences, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina<sup>4</sup> Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Veterinary Medicine – Skopje, Republic of North Macedonia

\*Corresponding author: Jelena Janjić, jeckonbg@gmail.com

**Summary**

One of the main goals of food safety measures is to increase consumer confidence in food in general, and meat in particular, and therefore consumers are provided with information about the quality and safety of meat through declaration. Consumer confidence and food safety have become central issues in the food chain. Recent developments in labelling, traceability and quality assurance schemes offer a large amount of information available to the consumer. Declaring is today one of the most reliable ways of informing consumers about food quality. For the purposes of this study, data were collected by surveying 1,000 consumers from the Banja Luka and Gradiška areas. The results of this survey show that the majority of consumers (98.1%) believe that meat should have a declaration and that the statistically most important ( $p < 0.05$ ) information on the declaration is the expiration date (75.8% of responses) compared to other information (nutritional value, method of production, country of origin). The way the meat is packaged is also important for consumers (45.3% of responses). Also, the statistical significantly different answers ( $p < 0.05$ ) were given related to the trust in information about the safety/quality of meat obtained in different ways (butcher, seller, relative, friend, cook). The consumers showed that they mostly believe to information about the safety/quality of meat received from doctors/nutritionists (53.1%), and most often have a neutral attitude towards information received from consumer protection associations (41.9%). It is not sufficiently clarified what type of information consumers are most looking for on declarations, especially when it

comes to meat and meat products. Because of that, continuous examination of consumers is needed, including sociological and economic factors, what motivates them to buy, what quality characteristics they require and what sources of information they believe the most.

**Keywords:** meat safety and quality, meat labeling, origin of information.

## INTRODUCTION

Objective information regarding food products does not guarantee consumer confidence in them. One of the main goals of food safety measures is to increase consumer confidence in food and reduce uncertainty, and therefore provide consumers with information about the quality and safety of meat. Consumer confidence and food safety have become a central issue in the food chain (Grunert, 2005; Röhr et al., 2005; Verbeke, 2005).

As end-users in the meat production chain, consumers occupy a key position since they are at the end of this chain, however from the aspect of inspiration for a consumer-driven chain organization or market planning orientation, consumers can be found in the first place of a "consumer-driven chain and market planning orientation". The latter makes consumer demand for safe and healthy food in general, and meat in particular, the biggest driving force for the introduction of various information systems such as branding, traceability and quality assurance schemes (Gellynck and Verbeke, 2001).

In the context of food systems, confidence is closely related to risk. The connection between confidence and risk is interesting because confidence does not recognize the presence of risk. In the case of confidence, the risk is not noticed. At the same time, the amount of confidence in food can be defined as the opposite of the amount of food risk (Grunert, 2005). Moreover, the relationship between food risk and confidence is inversely proportional because people who have a higher level of confidence in the food system will be less concerned about risks and vice versa (Knight and Varland, 2005). The dichotomy between confidence and risk is related to the provision of information, because confidence can be understood as an individual and subjective response to an objective and rather unrealistic concept of risk (Berg, 2004). In this way, communication strategies must take into account the transformation of objective risk into a subjective response in terms of confidence.

Recent developments in labelling, traceability and quality assurance schemes offer a large amount of information available to the consumer. In terms of consumer perception, however, it is not so simple. Objective information is not automatically reflected in perception, because the latter does not depend only on

---

the amount of published information, but also on the emotional content of the message (Rosa et al., 2006). The objective content of the message will be perceived differently by different consumer segments (Bernués et al., 2003; Frewer et al., 2005; Miles and Frewer, 2001; Verbeke and Vackier, 2004). Also, there is a real potential danger of consumer information overload. Increased amounts of information, for example on a product label, can overload the label or package and make it difficult to extract the given and desired amount of information, or simply lead to individuals who do not have the time or ability to process the information ignoring it, and thus producers' profits decrease due to reduced interest in the product (Salaün and Flores, 2001). Also, the given information can cause boredom and impatience, as well as loss of self-confidence among consumers due to misunderstanding of the labels on the product declaration.

Food labeling is an increasingly important way to deliver messages to consumers about the safety and integrity of food. For a long time, however, it was considered that it is not so important what consumers want and whether they adequately understand and use the information given on the declaration. It has been shown that consumers also often misunderstand or misinterpret information, e.g. those related to quality or origin, which leads to the formation of expectations of that quality that may not be confirmed by the actual performance of the product after consumption (Grunert, 2005).

Declaring is today one of the most reliable ways of informing consumers about food quality. Until a little more than ten years ago, there were no special regulations on food declaration, but declaration was an integral part of regulations on the quality of certain types of food, e.g. Rulebook on the quality of meat products (Regulation, 1974). In the territory of the Republika Srpska, the legal framework defining the declaration of food is given through the Food Law (Regulation, 2017) and the Rulebook on providing information to consumers about food (Regulation, 2018). The aim of these regulations is to protect the health of the consumer, for the consumer to choose the food he wants based on the information from the declaration, then to define the rules that would prevent technical obstacles in the food trade, and to manage the risk in the case of a risk of harmful effects of food by applying these regulations on consumer health. The entity in the food business under whose business name the food is placed on the market is responsible for information on packaged food products, and the entity in the food business that packages the food at the point of sale to the final consumer is responsible for information on unpackaged food. The text of the food declaration should contain the following information: the name under which the food is placed on the market, list of ingredients, quantity of certain ingredients or

---



categories of ingredients, net quantity, shelf life, storage conditions or conditions of use, name and address of the entity in the food business under which the meat and meat products are placed on the market, country of origin, instructions for use if it can be expected that the food could not be properly prepared and used without such instructions, and information on the nutritional value, which should contain the energy value and the amount of fat, saturated fatty acids, carbohydrates, proteins and salt. The Food Law defines the general conditions for food and animal feed safety, the obligations and responsibilities of subjects in the food and animal feed business, including traditional products, as well as other issues of importance for food and animal feed safety, in order to protect life and health of people, the environment, consumers and the efficiency of functioning on the market.

The goal of the study was to determine whether certain information on the declaration manages to create additional confidence among consumers in the safety and quality of the meat.

## MATERIALS AND METHODS

For the purposes of this study, a quantitative questionnaire was used as a tool for examining consumers' attitudes about the quality and safety of meat.

The survey was conducted in 2017 and 2018, and the survey included the population from the area of the cities of Banja Luka and Gradiška (urban areas). Data were collected until 1,000 validly filled survey forms were collected, which means that surveys that were not filled in, that is, where answers to certain questions were not given, were not included in the data processing procedure.

Demographic data on the participants refer to: age, education and gender. The survey participants were of different ages, from 20 to over 60 years old, on the basis of which they were divided into five groups (intervals of ten years). In relation to education, the most numerous group in the study were those with secondary education (53.10%), followed by respondents with higher education (38.9%) and groups with the lowest education. Respondents were 45.80% women and 54.25% men.

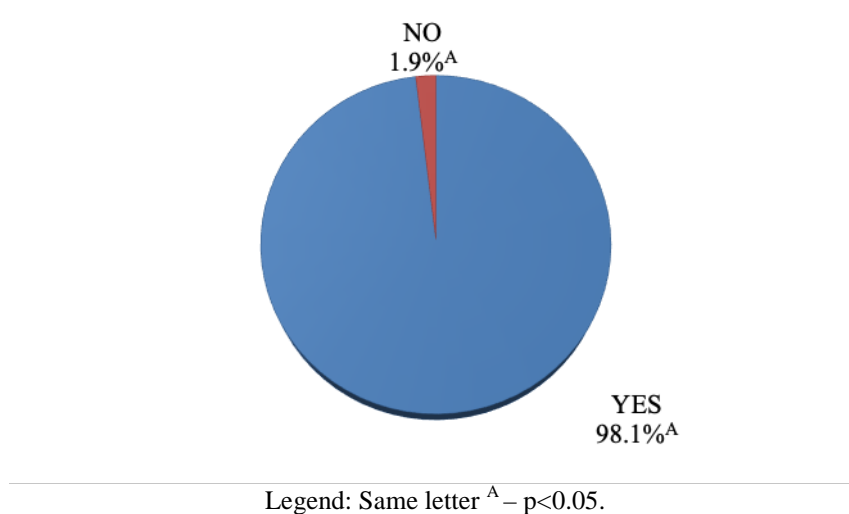
The chi-square test was used to compare the frequency of non-parametric features. Trend analysis and the degree of determination show the degree of agreement of respondents to a certain statement.

The significance of the differences was determined at significance levels of 5%. The statistical analysis of the obtained results was done in the statistical package PrismaPad 8.00 (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). The obtained results are presented tabularly and graphically.

---

## RESULTS AND DISCUSSION

Consumers are informed about the quality of meat in different ways. One of them is the declaration on the product. Today, in most countries, efforts are being made to protect consumers, so their rights are also legally protected. Their rights are protected by state organizations for consumer protection, as well as non-governmental non-profit organizations (companies). In the Republic of Srpska, food declaration is mandatory and most consumers are familiar with it. This is indicated by the fact that 98.1% of surveyed consumers believe that meat should have a declaration on the basis of which certain information about it would be obtained (Figure 1).



**Figure 1** Declaration on meat - "I think the meat I buy should have a declaration with information about it" (n=1000)

When asked about the quality and safety of the meat they buy, 56.3% of respondents believe that the declaration provides information about the quality and safety of the meat they buy, which is statistically significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the frequency of responses that such information is not they can gain from the declaration (11.5% of responses). Close to one third of respondents are not sure that the declaration provides information about the quality and safety of the meat they buy. The statistical significance of the differences between the three offered answers is shown in Table 1. This can be explained by the bad experience of consumers with the declaration and the actual quality of the food.

**Table 1** What does the information on the declaration represent for respondents (n=1000)

Does this information tell you about the quality and safety of the meat you buy?	Answer (%)
Yes	56.3 <sup>A,B</sup>
No	11.5 <sup>A,C</sup>
Not sure	32.2 <sup>B,C</sup>

Legend: Same letters <sup>A,B,C</sup> –  $p < 0.05$ .

According to data provided by EFSA (2019), for the European Union and Serbia, the origin of food is important for 53% of those surveyed in the EU, and 41% of those surveyed in Serbia. In Serbia, the price of food is far more important (61% of responses) than in the EU (51% of responses). The importance of food safety related to the risks of food consumption is approximately equal for respondents in the EU (50%) and Serbia (52%), as is the importance of the taste of food when shopping (EU 49%, Serbia 52% of respondents). For respondents in the EU, the nutrients in food (vitamins, proteins, sugar, fats) are far more important (44% of respondents) than in Serbia (31% of respondents). Also, for survey participants from the EU, ethical attitudes and beliefs (religion, animal welfare, environmental protection) are more important when buying food (19% of respondents) than in Serbia (10% of respondents) (Baltić et al., 2015).

For the consumer, the most important information about meat is the one related to the expiration date (75.8% of responses) and it is statistically significantly higher ( $p < 0.05$ ) than other information (nutritional value, method of production, country of origin). Of the respondents, 30.3% consider the method of production to be important, which, when it comes to fresh meat, refers to hygiene during slaughtering, processing the carcass, cooling and cutting the meat. Consumers also emphasize importance to the country of origin of the meat (for 23.4% of respondents, this is significant). From this answer, it is not possible to understand whether the consumer trusts domestic producers more than meat imported from another country. One-fifth (20.5%) of consumers believe that the declaration should contain data on the nutritional value of meat, as this is important information for them. A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) was found between the answer "Method of production" and the answers related to "Nutritional value", i.e. "Country of origin" (Table 2). One-fifth (20.5%) of consumers believe that the declaration should contain data on the nutritional value of meat, as this is important information for them (Table 2). A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) was found between all three offered answers regarding the relationship between meat safety/quality and the country of origin. A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) was also found among the

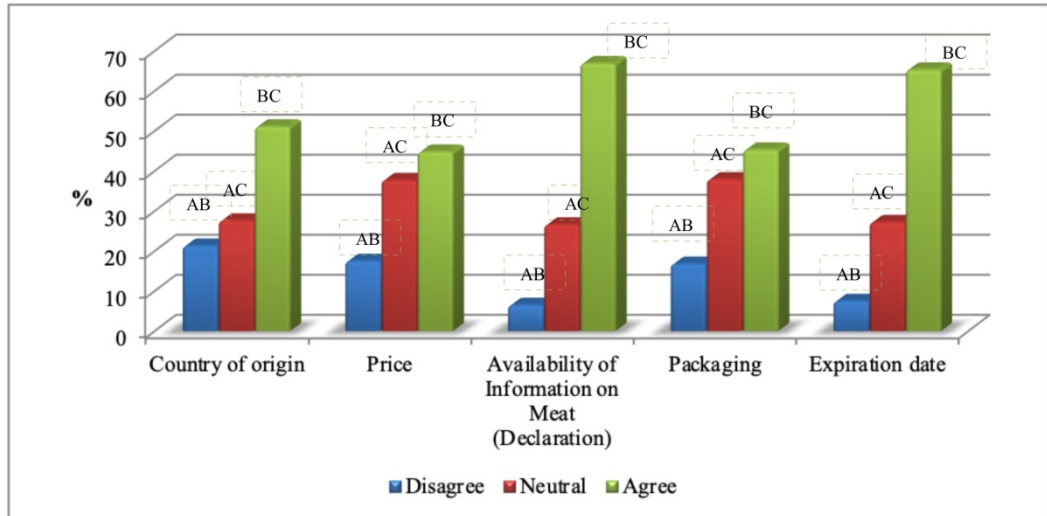
connection between safety/meat quality and price, followed by other available information, shelf life and packaging method.

**Table 2** The most important information on the declaration (n=1000)

<b>In my opinion, the most important information on the declaration is:</b>	<b>Answer (%)</b>
Nutritional value	20.5 <sup>A,B</sup>
Method of production	30.3 <sup>A,C,D</sup>
Country of origin	23.4 <sup>C,E</sup>
Expiration date	75.8 <sup>B,D,E</sup>

Legend: Same letters <sup>A,B,C,D,E</sup> –  $p < 0.05$ ; The total sum is greater than 100% due to the possibility of giving more than one answer to the question.

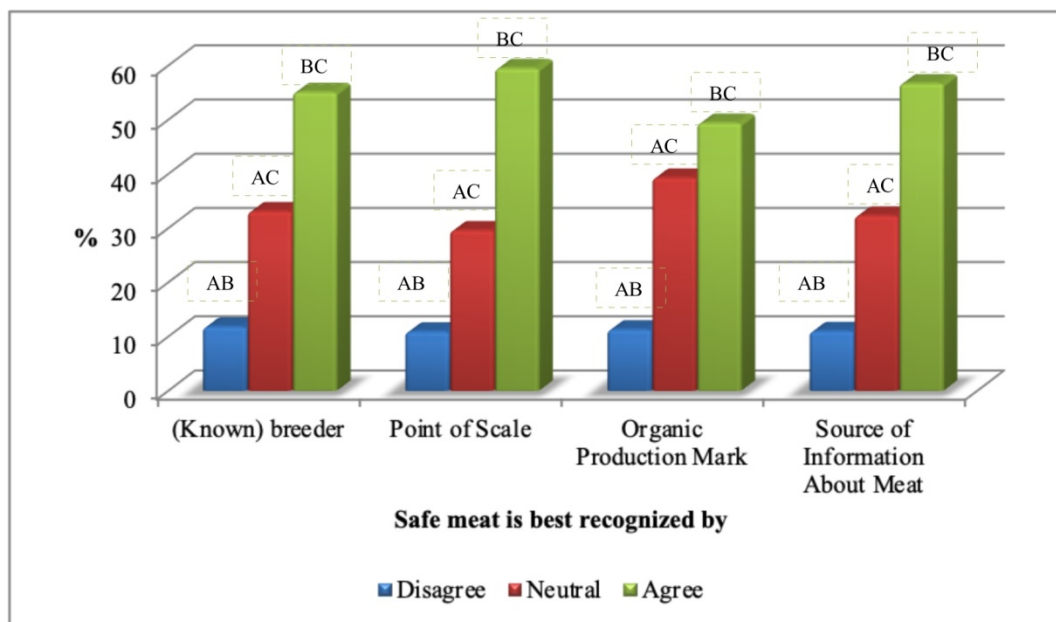
Consumers are also informed about the safety and quality of meat based on the information on the packaging (declaration). The declaration contains information about the country of origin, price and other information about the meat that may be important for informing consumers about the safety/quality of the meat. The way the meat is packaged is also important for consumers (45.3% of responses). A significant part of the respondents, i.e. over half (51.1%) consider or give importance to the origin of the meat, 26.7% have a neutral attitude, and over a fifth (21.3%) believe that the country of origin is not important for the safety/quality of the meat significant. A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) was found between all three offered answers regarding the relationship between meat safety/quality and the country of origin. A statistically significant difference was also found among the connection between safety/meat quality and price, followed by other available information, shelf life and packaging method. A statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) was found between the degree of agreement between the answer "Method of production" and the answers related to "Nutritional value", i.e. "Country of origin" (Figure 2). The fact that the degree of agreement with the mentioned information is from 44.8% (price) to 66.9% (availability of information) shows that the information referring to the quality/safety of meat is important to the consumer.



Legend: Same letters<sup>A,B,C</sup> –  $p < 0.05$ ; degrees of agreement were compared.

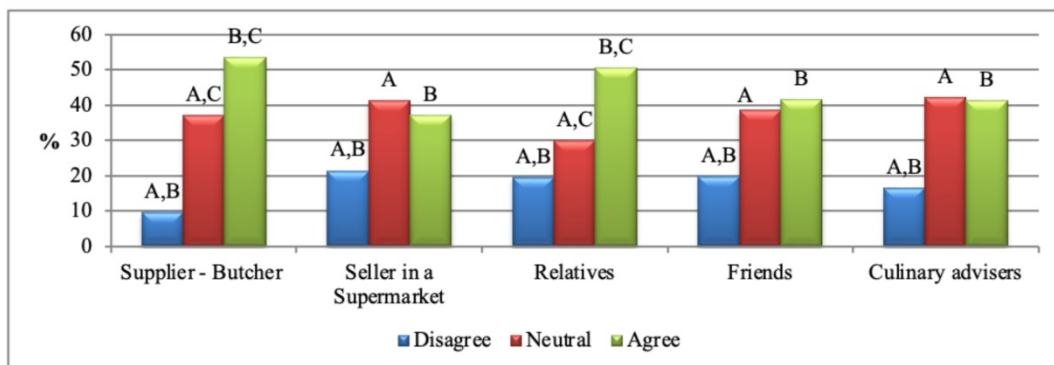
**Figure 2** What information do you consider important for establishing meat safety/quality?

In addition to personal experience and knowledge related to the determination when buying meat, as well as based on insight into the declaration and knowledge from the text of the declaration, consumers are also informed about the quality of meat from other sources. Thus, in most cases, consumers recognize the safety/quality of meat if they have information about the breeder, if they get this information at the point of sale, the mark of organic production and the source of information about the meat. Between all offered degrees of agreement, a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) was found between the frequency of responses.



**Figure 3** Recognizing the safety/quality of meat based on different parameters

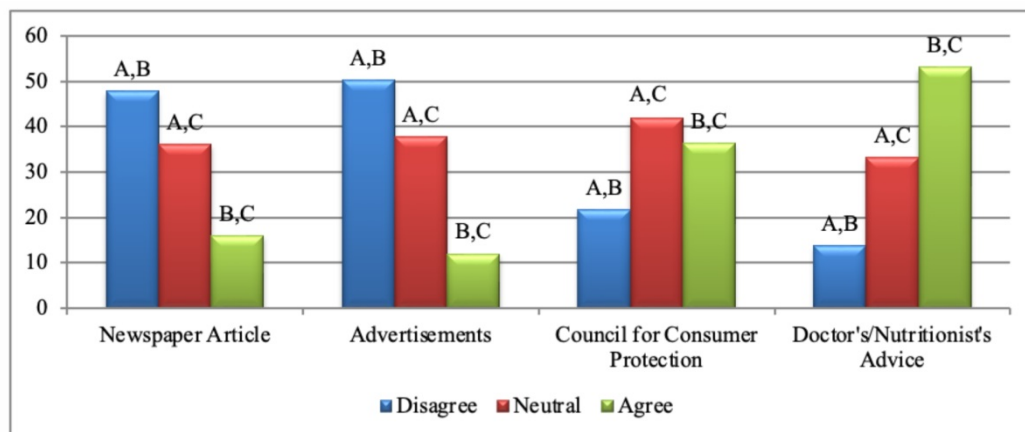
Consumers are informed about the quality/safety of meat from meat suppliers, relatives, friends, and cooks (Figure 4). They have less confidence about the characteristics of meat when they get it from a seller in a supermarket, than when they get information about the characteristics of meat from butchers. It is obvious that consumers have more opportunities to communicate with the seller in butchers than in supermarkets. Half of the respondents (50.2%) have confidence in information received from relatives, 41.6% from friends, 41.4% from cooks culinary advisers. The statistical significance of the differences in confidence in information on the safety/quality of meat (butcher, seller, relative, friend, cook) is shown in Figure 4. In all cases of comparison, the answer "I disagree" is always statistically significantly lower ( $p < 0.05$ ).



Legend: Same letters <sup>A,B,C</sup> –  $p < 0.05$ ; degrees of agreement were compared.

**Figure 4** From whom you have the most confidence in the origin of information about the quality/safety of meat?

Today, consumers are also informed about food safety/quality from other sources (public information media, consumer protection associations, advice of doctors/nutritionists). According to the frequency of the answer "I do not agree", consumers have the least confidence in the information related to the safety/quality of meat that they get from advertisements (50.2% of respondents), followed by newspaper articles (47.8% of respondents). Consumers most trust information about the safety/quality of meat obtained from doctors/nutritionists (53.1%), and most often have a neutral attitude towards information obtained from consumer protection associations (41.9%) (Figure 5). The statistical significance of the differences between the offered answers about consumer trust in information from public media, consumer protection associations and doctor/nutritionist councils are shown in Figure 5.



Legend: Same letters <sup>A,B,C</sup> –  $p < 0.05$ ; degrees of agreement were compared.

**Figure 5** Source of information on meat quality and safety - media, public information

In the European Union (EU 28), according to the EFSA survey (2019), consumers have the most trust in the following sources, given in descending order: scientists (82% of responses) > consumer organizations (79%) > farmers (69%) > state institutions (60%) > EU institutions (58%) > non-governmental organizations (56%) > journalists (50%) > supermarkets and restaurants (43%) > food industry (36%) > celebrities and influential people (19%). This series has a slightly different order for Serbia: scientists (81% of responses) > farmers (70%) > consumer organizations (68%) > state institutions (56%) > food industry (55%) > supermarkets and restaurants (51%) > EU institutions (49%) > non-governmental organizations (40%) > journalists (36%) > celebrities and influential people (32%) (Baltić et al., 2015).

Consumers clearly make difference regarding to information labels in terms of importance and usefulness and appear much more willing to use *search quality* labels than *credibility quality* labels when making meat purchasing decisions. This finding is consistent with previous studies which reported that consumers are more open to using easy-to-understand and familiar quality labels (Grunert, 2005; Gellynck et al., 2006). Specific traceability information is ranked low in terms of perceived importance and usefulness (Hobbs et al., 2005).



## CONCLUSION

Consumer confidence can be built by securing products and participants in the food system. Product assurance through declarations on food packaging that inform about food characteristics, country or region of origin and food traceability is an important set of signs and sources of information that consumers trust when evaluating the safety and quality of food at the time of purchase. However, our survey did not sufficiently clarify what type of information consumers are most looking for on declarations, especially when it comes to meat and meat products, which is why a continuous survey of consumers is justified, including sociological and economic factors, what motivates them to buy, what quality characteristics they require and which sources of information they trust the most.

Future research could focus on pessimists' willingness to pay for traceability systems or additional traceability information, which is augmented by information on the production process and on a more precise characterization of this market segment (e.g. place of purchase, moment of meat consumption).

## Acknowledgment

This study is supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, in accordance with the provisions of the 2021 Research Funding Agreement (No. 451-03-68/2022-14/200143).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

## REFERENCES

- Baltić M.Z., Glišić M., Janjić J., Marković R., Bošković M., Dokmanović M., Đorđević J. (2015): Značaj informisanosti potrošača pri izboru namirnica. *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 15(1).
- Berg L. (2004): Trust in food in the age of mad cow disease: a comparative study of consumers' evaluation of food safety in Belgium, Britain and Norway. *Appetite*, 42(1):21-32.
- Bernués A., Olaizola A., Corcoran K. (2003): Labelling information demanded by European consumers and relationships with purchasing motives, quality and safety of meat. *Meat science*, 65(3):1095-1106.
- EFSA. (2019): Scientific opinion on the public health hazard to be covered by inspection of meat (swine), European Food Safety Authority, EFSA Journal, 9(10):198.
- Frewer L., Fischer A., Scholderer J., Verbeke W. (2005): Food safety and consumer behaviour. In *Innovation in agri-food systems, product quality and consumer acceptance*. Wageningen Academic Publishers, 125-145.
-

- Gellynck X., Verbeke W. (2001): Consumer perception of traceability in the meat chain. *German Journal of Agricultural Economics*, 50(670-2016-45573):368-374.
- Gellynck X., Verbeke W., Vermeire B. (2006): Pathways to increase consumer trust in meat as a safe and wholesome food. *Meat Science*, 74(1):161-171.
- Grunert K. G. (2005): Food quality and safety: consumer perception and demand. *European review of agricultural economics*, 32(3):369-391.
- Hobbs J. E., Bailey D., Dickinson D. L., Haghiri M. (2005): Traceability in the Canadian red meat sector: do consumers care? *Canadian Journal of Agricultural Economics/Revue canadienne d'agroéconomie*, 53(1):47-65.
- Knight A. J., Warland R. (2005): Determinants of food safety risks: A multi-disciplinary approach. *Rural Sociology*, 70(2):253-275.
- Miles S., Frewer L. J. (2001): Investigating specific concerns about different food hazards. *Food quality and preference*, 12(1):47-61.
- Propis, (2017): Zakon o hrani. Službeni glasnik Republike Srpske, 19/17.
- Propis, (1974): Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mesa. Službeni list SFRJ, 29/74.
- Propis, (2018): Pravilnik o pružanju informacija potrošačima o hrani. Službeni glasnik Republike Srpske, 9/18.
- Röhr A., Lüddecke K., Drusch S., Müller M. J., Alvensleben R. V. (2005): Food quality and safety-consumer perception and public health concern. *Food control*, 16(8):649-655.
- Rosa F., Sanchez M., Barrena R. (2006): Confidence in consumer–retailer relations and quality label as a compensation of the inefficiency of beef meat markets: a compared analysis among Canada, Italy and Spain. In 99th European Seminar of the EAAE on ‘Trust and risk in business networks, Proceedings, 235-250.
- Salaün Y., Flores K. (2001): Information quality: meeting the needs of the consumer. *International journal of information management*, 21(1):21-37.
- Verbeke W. (2005): Agriculture and the food industry in the information age. *European review of agricultural economics*, 32(3):347-368.
- Verbeke W., Vackier I. (2004): Profile and effects of consumer involvement in fresh meat. *Meat science*, 67(1):159-168.

Paper received: 11.05.2022.

Paper accepted: 25.07.2022.

---

DOI 10.7251/VETJSR2201057S

UDK 637.354<sup>63:579.67</sup>

## Originalni naučni rad

# MIKROBIOLOŠKA ISPRAVNOST I FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI KVALITETA KOZJIH I OVČIJIH SIREVA IZ HERCEGOVINE

Ana SESAR<sup>1</sup>, Maja DRMAĆ<sup>1</sup>, Viktor LANDEKA<sup>2</sup>, Bojan GOLIC<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> Federalni agromediteranski zavod, Mostar, Bosna i Hercegovina

<sup>2</sup> Federalni zavod za poljoprivredu, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

<sup>3</sup> Javna ustanova Veterinarski Institut Republike Srpske „Dr Vaso Butozan“ Banja  
Luka, Bosna i Hercegovina

\*Korespondentni autor: Bojan Golić, bojan.golic@virs-vb.com

## Sažetak

Sir je polutvrđi ili tvrdi proizvod mlijeka, dobiven zgrušavanjem mlijeka i odvajanjem grušča od sirutke. Ispitivanje je obuhvatilo 46 uzoraka sira proizvedenih na poljoprivrednim gospodarstvima i malim mini-siranama na području Hercegovine, s naglaskom da najveći dio uzoraka potiče iz južne submediteranske i mediteranske regije Hercegovine. Cilj istraživanja je bio utvrditi mikrobiološku исправност i физикално-хемијске параметре квалитета сирева који се стављају на тржиште као козји свјежи сир, козји полутврди сир те овчији и козји сир из мјећа. Од укупног броја анализираних узорака 49,22% није задовољило захтеве физикално-хемијских и микробиолошких параметара испитивања, при чему 36,22% није задовољило физикално-хемијску квалитету, а 13% микробиолошку због повећаног броја  $\beta$  глукуронидаза позитивне *Escherichia coli*. Присутство  $\beta$  глукуронидаза позитивне *Escherichia coli* у узорцима сира указује на недovoljну хигијену приликом самог технолошког процеса производње сира. Патогени микроорганизми *Salmonella spp* и *Listeria monocytogenes* нису изолирани, а број коагулаза позитивних стафилокока и *Staphylococcus aureus* био је у дозвољеним границама. Ово истраживање указује да је неопходно уједначити физикално-хемијске параметре у производњи сира, као и коришћење искључиво аутохтоне сировине у производњи код индивидуалних малих произвођача и у мини сиранима које се баве овом производњом, као што је то случај с индустријском производњом ових производа у том подручју.

**Кључне ријечи:** сир, микробиолошка исправност, физикално-хемијска параметри, Херцеговина.

## UVOD

Mlijeko je osnovni sastojak za proizvodnju sira, te kao esencijalni izvor hrane za mladunčad značajno se razlikuje ovisno o vrsti životinje od koje se dobija. U ljudskoj prehrani svježe mlijeko i prerađevine predstavljaju važan izvor bjelančevina, masti i energije. Sir je hrana koja pripada skupini gotovih proizvoda i konzumira se najčešće svjež. To je visoko vrijedna namirnica koja se kao delikatesa provlači kroz većinu svjetskih kuhinja. To je polutvrđi ili tvrdi proizvod mlijeka, dobiven zgrušavanjem mlijeka i odvajanjem grušča od sirutke. Što se više sirutke odvoji, dobije se tvrdi sir. Proces proizvodnje sira jako je kompleksan, za koji je značajan odabir mlijeka i hlađenje na 4°C da bi završila bakteriocidna faza. Nakon hlađenja, mlijeko je potrebno toplinski obraditi i dva su moguća načina za to, termizacija i pasterizacija. Sir se može proizvoditi od nepasteriziranog i pasteriziranog mlijeka, što ovisi o tehnici i tradiciji spravljanja i vrlo je slična na prostorima jugoistočne Europe, slijedeći autohtone tradicije izrade, uz specifičnosti proizvodnje za pojedine regije i države ovog dijela Europe.

Sir iz mjeha je autohtoni tvrdi proizvod od mlijeka iz južnog dijela Bosne i Hercegovine (BiH) odnosno submediteranskog dijela regije Hercegovine. Njegova je glavna karakteristika anaerobno zrenje unutar vreće izrađene od jagnjeće kože (mješine) po kojoj je sir i dobio ime. Tradicionalnim tehnikama sirarstva proizvodi se od nepasteriziranog ovčijeg mlijeka bez dodatka starterkultura, a odlikuje se dugim zrenjem što mu u konačnici daje specifična senzorna svojstva. Lipoliza je dominantna te je biokemijskim procesima tokom zrenja sira u vreći životinjske kože odgovorna za okus i miris, a proteoliza je također uključena u stvaranje željene arome sira. U usporedbi sa sirevima dozrelim u prirodnoj kori, sirevi dozrijevani u vreći imaju jedinstveno jak i pikantni okus. Ova vrsta sira zastupljena je u Hrvatskoj, BiH, Crnoj Gori i Turskoj, uz određene razlike u tehnološkom procesu proizvodnje (Tudor Kalit i sur., 2010; Kiš i sur., 2018; Rako i sur., 2019). Optimalno vrijeme zrenja za sir iz mjeha je 45 dana, no zbog povećane potražnje za ovim sirom na domaćem tržištu, vrijeme sazrijevanja je vrlo često 30 dana (Tudor Kalit i sur., 2014; Rako i sur., 2019).

Meki sirevi proizvedeni su od svježeg mlijeka, a fermentacija se zasniva na autohtonom mikrobioti, koju čine bakterije mliječne kiseline (EC, 2003). Međutim, zbog problema higijene, većina sireva se danas proizvodi termizacijom (65-68°C/5-15 sekundi) ili pasterizacijom (72°C/15 sekundi) mlijeka, uz korištenje odabranih starter kultura (Meyrand i Vernozy-Rozand, 1999).

Lodi i sur. (1994) su, na osnovu bakterija mliječne kiseline, svrstali 32 vrste svježeg sira u 3 kategorije: sirevi sa visokim brojem bakterija mliječne kiseline, sirevi sa odsustvom bakterija mliječne kiseline i malim brojem prirodne mikrobiote i sirevi sa odsustvom bakterija mliječne kiseline, ali sa visokim

---

сдржајем природне микробиоте. Аутори су закључили да се у првој категорији број патогених бактерија нагло смањује током обраде, док у другој и трећој категорији патогене бактерије преживљавају неколико тједана.

С аспекта хигијене хране сир може да изазове оболjenja преносива храном. Млијеко и млијечни производи су намирнице које су често довођене у сvezу са тровањем храном enterотоксинима стафилокока (Delbes и sur., 2006). Међутим, enterотоксини стафилокока нису увјек утврђени у финалном производу, иако популација *Staphylococcus aureus* достиже вриједност преко  $10^5$  cfu/g сира, јер сви сојеви стафилокока нису enterотоксићни (Delbes и sur., 2006; Aoyama и sur., 2008). У свјетској литератури све више се покланја пажња контаминацији сира salmonелами и *Listeria monocytogenes*. Preваленија ових патогених бактерија у сиру варира од same студије, тако да за *Listeria monocytogenes* prevalence износи од 2,1 до 4,8% код сирева у Италији након пакирања (Manfreda и sur., 2005). Ова бактерија доспјева у сир у процесу производње, тако да неки подаци говоре да се присуство бактерије може инхибирати додавањем млијечно киселинских бактерија (Ennahar и sur., 1998). Такође, сматра се да се listерије чеће могу наћи код меким младим сирева, за разлику од тврдих сирева гдје су рјеђе. Патогене enterобактерије, посебно род бактерија *Salmonella* и *Escherichia coli* (O157:H7) детектиране су у свјежим сиревима у многим студијама (Colak и sur., 2007).

Најважније компоненте у сухој твари млијека су млијечна маст, протеини, лактоза, минералне твари и витамини. Одређивање воде има велики значај обзиром да она утјеће на физикална, хемијска и nutritивна својства производа. Остатак представља удио сухе твари. Један од основних и веома значајних поступака у аналитичкој храни и прехранбених производа представља одређивање воде. У односу на удио воде у безмасној материји сира, конзистенцију и грађу тјеста, сиреви се производе и стављају на тржиште БиХ под називима екстра тврди сир, тврди сир, полутврди сир, меким сир, свјежи сир (Propis, 2011). Млијечна маст је претежно грађена од триацилглицерола, а квантитативно након њих сlijеде стероли, највише холестерол и фосfolипиди (Chow, 2008).

Циљ истраживања је био утврдити микробиолошку исправност и физикално-хемијске параметре квалитете сирева са Херцеговачке регије, који се стављају на тржиште као козји свјежи сир, козји полутврди сир те овчјии и козји сир из мјећа.

## MATERIJALI I METODE

Узорци сира произведени су на пољопривредним господарствима и малим минисиранима на подручју Херцеговине (БиХ), са нагласком да је највећи дио узорака потекао из јужне субмедитеранске и медитеранске регије Херцеговине. Карактеристике овог подручја су најчеће екстензивни начин држања животиња (овца и коза) те траве и медитеранско билје са крашких поља, које животине једу при

производnji mlijeka. To autohtono mlijeko služi kao sirovina u proizvodnji sireva ovog područja. Istraživanjem je analizirano 46 uzoraka kozjeg svježeg sira, kozjeg polutvrdog sira te ovčijeg i kozjeg sira iz mjeha, uzorkovanih tokom tri godine (2019-2021), a ispitivanje je vršeno u akreditiranom laboratoriju Federalni agromediteranski zavod Mostar, BiH.

Mikrobiološko ispitivanje uzoraka sira provedeno je prema važećim propisima u BiH, Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima za hranu (Propis, 2013), te Smjernicama za mikrobiološke kriterijume za hranu (ASH BiH, 2013), standardnim metodama i to:

- BAS EN ISO 6579-1 za detekciju *Salmonella spp.* (ISBIH, 2018a),
- BAS EN ISO 11290-1 za detekciju *Listeria monocytogenes* (ISBIH, 2018b),
- BAS EN ISO 6888-1 za brojanje koagulaza pozitivnih stafilocoka i *Staphylococcus aureus* (ISBIH, 2005),
- BAS EN ISO 16649-2 za brojanje  $\beta$  glukuronidaza pozitivne *Escherichia coli* (ISBIH, 2008).

Fizikalno-kemijska ispitivanja uzoraka sira vršena su standardnim metodama i to:

- BAS EN ISO 5534 (ISBIH, 2006) za utvrđivanje udjela vode/suhe tvari,
- AOAC (1996) za utvrđivanje udjela mliječne masti u siru.

Udio mliječne masti u suhoj tvari i sadržaj vode u nemasnoj tvari sira dobiven je računski (Šlanovec, 1982).

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Do sada su dobro poznati i opisani slučajevi kontaminacije sireva sa mnogim patogenim bakterijama koje mogu da budu uzrok infekcija za čovjeka: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* i *Escherichia coli* (Kousta i sur., 2010). Kontaminacija sira najčešće nastaje u fazi procesa pripreme, transporta i čuvanja, tako da je važan aktivan nadzor u procesu proizvodnje i u prometu, radi sigurnosti ove namirnice za konzumaciju. U našem istraživanju, mikrobiološkim ispitivanjem uzoraka sira utvrđen je nezadovoljavajući broj  $\beta$  glukuronidaza pozitivne *Escherichia coli* u 13% uzoraka, i to isključivo u uzorcima svježeg i polutvrdog kozjeg sira ( $>10^3$ CFU/g do  $>10^9$ CFU/g), u 6,50% uzoraka sira utvrđen je prihvatljiv broj ( $>10^2$ CFU/g do  $<10^3$ CFU/g), dok je 80,50% uzoraka bilo zadovoljavajuće ( $<10$ CFU/g). Vrijednosti koagulaza pozitivnih stafilocoka i *Staphylococcus aureus* bile su u propisanim granicama. Patogeni mikroorganizmi *Salmonella spp.* i *Listeria monocytogenes* nisu izolirani ni u jednom ispitivanom uzorku. Dobiveni rezultati su u korelaciji s istraživanjem koje je proveo niz istraživača širom Europe. Tako u uzorcima autohtonog sira iz mjeha iz regije Hercegovine (BiH) proizvedenog od sirovog ovčijeg te miješanog

овчијег и кравлјег млијека нису изолирани *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* и *Staphylococcus aureus*, 40% узорака садржавало је повећан број *Escherichia coli*, а у 60% узорака утврђене су ентеробактерије (Киш и сур., 2018). Добijени резултати по питању *Salmonella spp.* и *Listeria monocytogenes* у складу су с резултатима Голић и сур. (2014). Исти аутори су испитивањем бијелог овчијег сира утврдили у 36,40% узорака повећан број  $\beta$  глукуронидаза позитивне *Escherichia coli*, а код 18,10% узорака повећан број коагулаза позитивних стафилокока. Налаз колонија  $\beta$  глукуронидаза позитивне *Escherichia coli* у нашем случају показатељ је лоше хигијене процеса производње. Испитивањем Влашићког сира поријеклом из БиХ, узетих из домаћинстава која се баве традиционалном производњом овог сира од сировог овчијег и кравлјег млијека, уз додавак соли, утврђено је присуство коагулаза позитивних стафилокока у 76% узорака (Голић и сур., 2015). Влашички сир подржава раст стафилокока јер се производи од сировог млијека, којима погодује температура производње овог сира (22-30°C), додавак соли и период зрња од најмање 60 дана, па све до 180 дана. Ови резултати се разликују од наших из разлога што услови зрња Влашићког сира, због механизма сирење коагулације, када не долази до значајног пада pH вриједности и развоја бактерија млијечне киселине, фаворизују раст стафилокока, којима додатно, индиректно погодује присуство соли, која онемогучава раст конкурентских бактерија тј. бактерија млијечне киселине. Испитивањем Сјеничког аутоhtonог сира у саламури у југозападној Србији произведеног од сировог овчијег млијека, током праћеног периода производње сира, број коагулаза позитивних стафилокока није достигао вриједност од  $10^5$  cfu/g (Булajiћ и сур., 2015), што се подудара с резултатима наших истраживања. Такође, Zarate и сур. (1997) испитивали су *Staphylococcus aureus* у козјем сиру са Тенерифа (Шпанија), произведеног од сировог млијека, без додавања startera, који се конзумира свјеж (у року 2-3 дана) или након зрња од 60 дана. Примijeчено је повећање *Staphylococcus aureus* за 2-3 log CFU/g у сиру старом два дана, али је након тога забилјежен брз пад.

Вода је један од главних састојака који утиче на квалитету намирница током складиштења, транспорта, прераде и сл. Последично томе, одређивање садржаја воде и сухе твари је једна од најважнијих метода код анализе хране. У Таблици 1 приказани су резултати физикално-кemiјских параметара сира.

**Таблица 1** Резултати физикално-хемијских параметара сира

Врста сира	Број узорака	Просјечна вриједност и стандардна девијација				
		ST %	SV %	SV % <sub>NT</sub>	SM %	SM % <sub>STV</sub>
Полутврди козји сир	22	54,20±5,97	45,80±5,97	57,85±7,22	38,24±10,79	20,70±6,14
Свјежи сир козји	11	44,07±4,47	55,93±4,47	70,45±5,00	46,56±7,15	20,48±3,56
Сир из мјеха овчји	7	60,21±3,75	39,79±3,75	56,46±3,58	48,90±6,28	29,53±5,00
Сир из мјеха козји	6	63,74±4,35	36,26±4,35	51,80±4,69	47,25±3,02	30,14±3,08

ST % - % сухе твари; SV % - % воде; SV %<sub>NT</sub> - % вода у немасној твари; SM % - % маст; SM %<sub>STV</sub> - % масти у сухој твари;

Просјечна количина воде са стандардном девијацијом у анализираним узорцима износила је за полутврди козји сир  $45,80 \pm 5,97\%$ , за свјежи сир козји  $55,93 \pm 4,47\%$ , за овчји сир из мјеха  $39,79 \pm 3,75\%$ , те за козји сир из мјеха  $36,26 \pm 4,35\%$ . Ако се посматра по годинама и категорији сира, тај омјер просјечне вриједности се креће од  $38,88\%$  за полутврди сир до  $57,18\%$  за свјежи козји сир. Ваћну улогу код формирања текстуре тјеста и унутарњи изглед конзумно зрелих сирева има количина присутне воде. Активна вода утиче на смјер биохемијских збивања, на обим хемијско-физикалних промјена тјеста, на постојаност сира па и на његов рандман. Тип сира треба усмјеравати правилним избором одговарајуће сировине, правилном припремом млијека као и одговарајућим технолошким процесом. Само у том случају моће се очекивати, уз одговарајућу количину воде у немасној твари сира, да ће се ферментацијски процеси нормално одвијати, наравно уз претпоставку да су нормални и сви остали мјеродавни фактори (Славонец, 1982). Суха твар која заостаје након уклањања воде заправо су укупне круте твари у некој намирници (Nielsen, 2010). Просјечна количина сухе твари са стандардном девијацијом у анализираним узорцима износила је за полутрајни козји сир  $54,20 \pm 5,97\%$ , за свјежи козји сир  $44,07 \pm 4,47\%$ , за овчји сир из мјеха  $60,21 \pm 3,75\%$ , те за козји сир из мјеха  $63,74 \pm 4,35\%$ . Ако се посматра по годинама и категорији сира, тај омјер се креће од  $46,26\%$  за свјежи козји сир до  $29,53\%$  за овчји сир из мјеха. Млијећна маст је масени удио (m/m) млијећне масти у млијеку, прећезно граћена од триаилглицерола, квантитативно након њих слиједи стероли (највише холестерол) и фосфолипиди. Сматра се како млијећна маст, односно удио млијећне масти, утјеће на окус самог млијека. Просјечна количина млијећне масти са стандардном девијацијом у овом истраживању износила је за полутврди козји сир  $38,24 \pm 10,79\%$ , за свјежи козји сир  $46,56 \pm 7,15\%$ , за овчји сир из мјеха  $48,90 \pm 6,28\%$ , те за козји сир из мјеха  $47,25 \pm 3,02\%$ . Ако се посматра по годинама и категорији сира, тај омјер се креће од  $19,20\%$  за свјежи козји сир до  $61,64\%$  за козји сир из мјеха. Удио воде у немасној твари сира један је од параметара према којем се сиреви могу подијелити на различите врсте. Удио воде утјеће на сазријевање сира тј. код веће количине воде долази до



bržih kemijskih promjena i bržeg kvarenja, između ostalog uslijed pojačane aktivnosti bakterija i enzima u vlažnom okruženju (Nielsen, 2010). Prosječan udio vode u nemasnoj tvari sira sa standardnom devijacijom u ovom istraživanju iznosio je za polutvrđi kozji sir  $57,85 \pm 7,22\%$ , za svježi kozji sir  $70,45 \pm 5,00\%$ , za ovčiji sir iz mjeha  $56,46 \pm 3,58\%$ , te za kozji sir iz mjeha  $51,80 \pm 4,69\%$ . Ako se posmatra po godinama i kategoriji sira, taj omjer se kreće od  $52,70\%$  za kozji sir iz mjeha do  $73,15\%$  za svježi kozji sir. S obzirom na udio mliječne masti, odnosno udio mliječne masti u suhoj tvari sira, sirevi se prema nacionalnoj i međunarodnoj regulativi dijele na ekstra masne, punomasne, masne, polumasne i posne. Prosječna količina mliječne masti u suhoj tvari sa standardnom devijacijom ovom istraživanju iznosila je za polutvrđi kozji sir  $20,70 \pm 6,14\%$ , za svježi kozji sir  $20,48 \pm 3,56\%$ , za ovčiji sir iz mjeha  $29,53 \pm 5,00\%$ , te za kozji sir iz mjeha  $30,14 \pm 3,08\%$ . Ako se posmatra po godinama i kategoriji sira, taj omjer se kreće od  $16,78\%$  za polutvrđi sir kozji do  $52,00\%$  za kozji sir iz mjeha. Statistički gledano, izraženi preko srednje vrijenosti i standardne devijacije, svi podaci po kategorijama sira su u skladu s Pravilnikom o proizvodima od mlijeka i starter kulturama (Propis, 2011) dok nisu svi specifično pojedinačni podaci usklađeni po parametrima ispitivanja za pojedine kategorije sira. Prosječne srednje vrijednosti bez standardne devijacije za kategorije polutvrđi kozji sir, svježi kozji sir i ovčiji sir iz mjeha su u skladu s odredbama pravilnika (Propis, 2011). Kategorija koziji sir iz mjeha na nivou ispitivanja sa prosječnom vrijednosti i standardnom devijacijom (Tablica 1) zadovoljava odredbe pravilnika (Propis, 2011). Od ukupno ispitanih uzoraka, ako uzmemo pojedinačne rezultate, najveći broj nezadovoljavajućih uzoraka u svim kategorijama sireva je bio za parametar sadržaj vode u nemasnoj tvari  $34,07\%$ , što ispod ili iznad propisane vrijednosti za pojedinačnu kategoriju sira. Od ispitanih uzoraka,  $2,13\%$  uzoraka polutvrdog masnog kozijeg sira imalo je sadržaj mliječne masti u suhoj tvari  $16,78\%$ , što je ispod propisane vrijednosti od minimum  $25\%$  (Propis, 2011). Mali proizvođači sira su gotovo svi ispravno deklarirali svoje proizvode, zadovoljivši odredbe pravilnika (Propis, 2011). Razmatrajući kvalitetu analiziranih uzoraka svih kategorija sira,  $36,22\%$  uzoraka nisu zadovoljili zahtjeve za parametar sadržaj vode u nemasnoj tvari i sadržaj masti u suhoj tvari. Dobijeni rezultati za fizikalno-kemijska istraživanja su slična istraživanjima drugih autora. Rezultati istraživanja sira kod malih individualnih proizvođača, provedenog na području centralne i zapadne BiH, za tradicionalne ovčije sireve (livanjski i travnički) uporedivi su s našim rezultatima. Prema rezultatima Hrković i sar. (2011), prosječni udio suhe tvari za livanjski sir bio je  $62,88\%$ , sadržaj vode iznosio je  $37,11\%$ , a udio mliječne masti iznosio je  $31,93\%$ . Rezultat prosječnog udjela za travnički sir za mliječnu mast iznosio je  $27,08\%$ , a prosječni udio vode odnosno suhe tvari u

travničkom siru bio je 54,66% odnosno 45,34%. Rezultati naših ispitivanja su u skladu s ovim rezultatima, ali se dijelom razlikuju u dobijenim vrijednostima ispitivanja. Mirecki i sur. (2015) objavili su rezultate istraživanja fizikalno-kemijskih svojstava Njeguškog sira, tradicionalnog ovčijeg sira iz Crne Gore, pri čemu su dobili rezultate sadržaja mliječne masti u ovčijem mlijeku od 4,92%, a suhe tvari bez masti 9,46%. Sirevi pripadaju punomasnim polutvrdim sirevima, jer imaju sadržaj masti 29,97%, masti u suhoj tvari 51,73%, vode u nemasnoj tvari 60,07%, a sadržaja suhe tvari 57,93%. Ovo istraživanje je u korelaciji s našim istaživanjem. Rezultati istraživanja koje je proveo Drozd (2001) u regiji Tatra na jugu Poljske, na tradicionalnom siru Oscypek, dimljenom opečenom tvrdom siru koji se proizvodi od sirovog ovčijeg mlijeka, sa sadržajem vode prosječno 27,50%, sadržajem masti od 22,50% i sadržajem mliječne masti u suhoj tvari prosječno od 31,30%, razlikuju se od rezultata našeg istraživanja za sir od ovčijeg mlijeka sa sadržajem vode od 39,79% i sadržajem masti od 48,90%, koji je znatno veći za ove parametre ispitivanja. Istraživanjem fizikalno-kemijskih svojstava punomasnog, polumasnog i posnog ovčijeg sira u Španiji (Sanchez-Marcias i sur., 2010), zaključeno je da se sirevi općenito razlikuju zbog fizikalnih i kemijskih promjena koje se javljaju tokom zrenja, a na to prvenstveno utječe kemijski sastav mlijeka korištenog za proizvodnju sira. Nakon četrnaest dana zrenja utvrđeno je da punomasni sir sadrži 25% mliječne masti, polumasni sir 12,17% mliječne masti, a posni sir 4,43% mliječne masti. Udio vode nakon četrnaest dana kod punomasnog sira iznosio je 44,12%, polumasni sir sadržavao je 50,98% vode, a posni sir 55,15%. Prema rezultatima dobivenima u ovom istraživanju može se zaključiti da su vrijednosti fizikalno-kemijskog istraživanja sira približno iste.

## ZAKLJUČAK

Rezultati mikrobiološkog ispitivanja ukazuju na potrebu poboljšanja nivoa higijene procesa proizvodnje, s obzirom na utvrđeni broj *Escherichia coli* u siru, pri čemu se mora voditi posebna pažnja prilikom manipulacije mlijekom. Autohtoni hercegovački sir iz mjeha i svježi sir se proizvode najčešće iz toplinski neobrađenog mlijeka, te je neophodna primjena dobre higijenske prakse, posebno preventivnih postupaka, u svrhu smanjenja javnozdravstvenog rizika za široku populaciju stanovništva. Rizik od *Escherichia coli* se prvenstveno odražava na senzorne karakteristike sira, što može ugroziti sam tehnološki proces proizvodnje i uticati na fizikalno-kemijske parametre kvaliteta. Sa fizikalno-kemijskog aspekta, dobiveni analitički podaci mogu predstavljati doprinos utvrđivanju zahtjeva kvalitete i standardizacije proizvodnje autohtonih sireva u regiji Hercegovine. Ovo istraživanje ukazuje da je neophodno ujednačiti fizikalno-kemijske parametre u proizvodnji sira, kao i korištenje isključivo autohtone sirovine u proizvodnji kod

individualnih malih proizvođača i u mini siranama koje se bave ovom proizvodnjom, kao što je to slučaj s industrijskom proizvodnjom ovih proizvoda u tom području. Time bi i potrošači bili sigurni u proizvod koji kupuju, te bi se stekli uvjeti za registraciju oznake kvalitete geografskog podrijetla (sir iz mjeha) na nacionalnom nivou, a vremenom i na nivou EU.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

## LITERATURA

- AOAC. (1996): 933.05 Official Method Fat in Cheese. Association of Official Agricultural Chemists, 33.7.17.
- Aoyama K., Takahashi C., Yamauchi Y., Sakai F., Igarashi F., Yanahira S., Konishi H. (2008): Examination of *Staphylococcus aureus* survival and growth during cheese-making process. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 49:116-123.
- ASH BiH (2013): Smjernice za mikrobiološke kriterije za hranu. Agencija za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine.
- Bulajić S., Mijačević Z., Ledina T., Golić B. (2015): Safety evaluation of sjenica cheese with regard to coagulase-positive staphylococci and antibiotic resistance of lactic acid bacteria and staphylococci. *Acta Veterinaria, Beograd*, 65(4),518-537.
- Chow C. K. (2008): Fatty acids in food and their health implications, 3<sup>rd</sup> edition, CRC Press, 109-127.
- Colak H., Hampyikian H., Bingol E. B., Ulusoy E. (2007): Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella spp.* in Tulum cheese. *Food Control*, 18:576-579.
- Delbes C., Alomar J., Chougui N., Martin J. F., Montel M. C. (2006): *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows raw milk. *Journal of Food Protection*, 69:2161-2167.
- Drozd A. (2001): Quality of the Polish traditional mountain sheep cheese "oscypek". In Production systems and product quality in sheep and goats. Rubino R. (ed.), Morand-Fehr P. (ed.), Zaragoza CIHEAM, 111-114.
- EC. (2003). Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. European Commission, Health&Consumer Protection Directorate-General, 26-27.
- Ennahar S, Assobhel O, Hasselmann C. (1998): Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J Food Protect*, 61:186-191.
-

- Gantner V., Mijić P., Baban M., Škrtić Z., Turalija A. (2015): The overall and fat composition of milk of various species, *Mljekarstvo*, 65(4):223-231.
- Golić B., Mijačević Z., Bulajić S., Velebit B., Nedić D. (2015): Detection of coagulase-positive staphylococci in Vlasic cheese. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 15(1):14-21.
- Golić B., Nedić D., Pećanac B., Dojčinović S., Stojiljković M., Nedić S. (2014): Quality of white sheep cheese from Stara planina. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 14(2):224-233.
- Hrković A., Hodžić A., Sarić Z., Hamamdžić M., Vegara M., Šaljić E., Juhas-Pašić E. (2011): Utjecaj kemijskog sastava ovčjeg mlijeka na kemijski sastav Livanjskog i Travničkog sira. *Mljekarstvo*, 61(2):175-181.
- ISBIH (2006): Određivanje sadržaja ukupne suhe tvari – sir i topljeni sirevi (referentna metoda). Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine, BAS EN ISO 5534.
- ISBIH (2018a): Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za detekciju i serotipizaciju *Salmonella* spp. – Dio 1: Detekcija. Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine, BAS EN ISO 6579-1.
- ISBIH (2018b): Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za detekciju i brojanje *Listeria monocytogenes*, Dio 1: Detekcija. Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine, BAS EN ISO 11290-1.
- ISBIH. (2005): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za brojanje koagulasa pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) – Dio 1: Tehnika korištenja Baird-Parker agar medija. Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine, BAS EN ISO 6888-1.
- ISBIH. (2008): Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za za brojanje <beta>glukuronidaza pozitivne *Escherichia coli* - Dio 2: Tehnika brojanja kolonija na 44° C koristeći i 5-bromo-4-hloro-3-indolil<beta>-D-glukuronid. Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine, BAS EN ISO 16649-2.
- Kiš M., Grbavac J., Mašek T., Starčević K., Džaja P., Zdolec N. (2018): Mikrobiološka kvaliteta i masnokiselinski sastav autohtonog sira iz mišine. *Hrvatski Veterinarski Vjesnik*, 26(7-8):58-63.
- Kousta M., Mataragas M., Skandamis P. N., Drosinos E. H. (2010): Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21:805-815.
- Lodi R., Malaspina P., Brasca M. (1994): Lactic acid bacteria: a quality parameter for fresh cheese. *Industria del latte*, 30:3-16.
-

- Manfreda G., de Cesare A., Stella S., Cozzi M., Cantoni C. (2005): Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, 102:287-293.
- Meyrand A., Vernozy-Rozand C. (1999): Croissance et enterotoxinogenese de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. *Revue Med. Vet.*, 150:601-616.
- Mirecki S., Popović N., Antunac N., Mikulec N., Plavlјanić D. (2015): Production technology and some quality parameters of Nјeguši cheese. *Mlјekarstvo*, 65(4):280-286.
- Nielsen S.S. (2010): Food Analysis, Part II: Compositional Analysis of Foods. 4<sup>th</sup> edition, Springer Science Business Media, LLC, 85-215.
- Propis, (2011): Pravilnik o proizvodima od mlijeka i starter kulturama. Službeni glasnik Bosne i Hercegovine, 21/11, 25/12, 17/19.
- Propis, (2013): Pravilnik o mikrobiološkim kriterijumima za hranu. Službeni glasnik Bosne i Hercegovine, 11/13, 79/16, 64/18.
- Rako A., Tudor Kalit M., Rako Z., Petrović D., Kalit S. (2019): Textural characteristics of Croatian cheese ripen in a lamb skin sack (Sir iz mišine). *Mlјekarstvo*, 69(1):21-29.
- Sanchez-Macias D., Fresno M., Moreno-Indias I., Castro N., Morales-de la Nuez A., Alvarez S., Argüello A. (2010): Physicochemical analysis of full-fat, reduced-fat and low fat artisan-style goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 93:3950-3956.
- Slanovec T. (1982): Sirarstvo. ČZP Kmečki glas.
- Tudor Kalit M., Kalit S., Delaš I., Kelava N., Karolyi D., Kaić D., Vrdoljak M., Havranek J. (2014): Changes in the composition and sensory properties of Croatian cheese in a lamb skin sack (Sir iz mišine) during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 67:255-264.
- Tudor Kalit M., Kalit S., Havranek J. (2010): An overview of researches on cheeses ripening in animal skin. *Mlјekarstvo*, 60:149-155.
- Zarate V., Belda F., Perez C., Cardell E. (1997): Changes in the microbial flora of Tenerife goats milk cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, 7:635-641.

Rad primljen: 03.06.2022.

Rad prihvaćen: 28.07.2022.

---

DOI 10.7251/VETJEN2201058S

UDK 637.354 63:579.67

**Original Scientific Paper****MICROBIOLOGICAL SAFETY AND PHYSICOCHEMICAL QUALITY  
PARAMETERS OF GOAT AND SHEEP CHEESE FROM  
HERZEGOVINA****Ana SESAR<sup>1</sup>, Maja DRMAĆ<sup>1</sup>, Viktor LANDEKA<sup>2</sup>, Bojan GOLIC<sup>3\*</sup>**<sup>1</sup> Federal Agro-Mediterranean Institute, Mostar, Bosnia and Herzegovina<sup>2</sup> Federal Institute for Agriculture, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina<sup>3</sup> PI Veterinary Institute of the Republic of Srpska „Dr. Vaso Butozan“ Banja  
Luka, Bosnia and Herzegovina

\*Corresponding author: Bojan Golić, bojan.golic@virs-vb.com

**Summary**

Cheese is a semi-solid or solid milk product, obtained by curdling milk and separating the curds from the whey. The examination included 46 samples of cheese produced on agriculture farms and small mini-dairies in the territory of Herzegovina, with the emphasis that most of the samples originate from the southern sub-Mediterranean and Mediterranean regions of Herzegovina. The goal of the study was to determine the microbiological safety and physicochemical quality parameters of cheeses that are marketed as fresh goat cheese, semi-solid goat cheese, and sheep and goat bellows cheese. Of the total number of analyzed samples, 49.22% did not meet the requirements of the physicochemical and microbiological parameters of the quality, where 36.22% did not meet the physicochemical quality, and 13% did not meet the microbiological quality due to an increased number of  $\beta$  glucuronidase positive *Escherichia coli*. The presence of  $\beta$  glucuronidase positive *Escherichia coli* in cheese samples indicates insufficient hygiene during the technological process of cheese production itself. Pathogenic microorganisms *Salmonella spp* and *Listeria monocytogenes* were not isolated, and the number of coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* was within the permitted limits. This study indicates that it is necessary to standardize the physicochemical parameters in the production of cheese, as well as the use of exclusively autochthonous raw materials in the production of individual small producers and in mini-dairies engaged in this production, as is the case with the industrial production of these products in that area.

---

**Keywords:** cheese, microbiological safety, physicochemical parameters, Herzegovina

## INTRODUCTION

Milk is the basic ingredient for the production of cheese, and as an essential source of food for the young, it differs significantly depending on the animal species from which it is obtained. In the human diet, fresh milk and milk products are an important source of proteins, fats and energy. Cheese is a food that belongs to the group of finished products and is most often consumed fresh. It is a highly valuable food that is used as a delicacy in most of the world's cuisines. It is a semi-solid or solid milk product, obtained by curdling milk and separating curds from whey. The more whey is separated, the more solid the cheese is. The cheese production process is very complex, for which the selection of milk and cooling to 4°C to complete the bactericidal phase is important. After cooling, the milk needs to be heat-treated and there are two possible ways to do this, thermalization and pasteurization. Cheese can be produced from unpasteurized or pasteurized milk, which depends on the technique and tradition of making it and is very similar in Southeastern Europe, following autochthonous production traditions, with the specifics of production for individual regions and countries of this part of Europe. Bellows cheese is an autochthonous solid milk product from the southern part of Bosnia and Herzegovina, i.e. the sub-Mediterranean part of the Herzegovina region. Its main characteristic is anaerobic ripening inside a bag made of lamb skin (bellow), which is how the cheese got its name. It is produced using traditional cheesemaking techniques from unpasteurized sheep's milk without the addition of a starter culture, and is characterized by a long ripening process, which ultimately gives it specific sensory properties. Lipolysis is dominant and is responsible for taste and smell through biochemical processes during cheese ripening in the animal skin bag, and proteolysis is also involved in the creation of the desired cheese aroma. Compared to cheeses ripened in the natural rind, cheeses ripened in a bag have a uniquely strong and spicy taste. This type of cheese is present in Croatia, Bosnia and Herzegovina, Montenegro and Turkey, with certain differences in the technological production process (Tudor Kalit et al., 2010; Kiš et al., 2018; Rako et al., 2019). The optimal ripening time for cheese from the bag is 45 days, but due to the increased demand for this cheese on the domestic market, the ripening time is very often 30 days (Tudor Kalit et al., 2014; Rako et al., 2019).

Soft cheeses are produced from fresh milk, and fermentation is based on autochthonous microbiota, which consists of lactic acid bacteria (EC, 2003). However, due to hygiene problems, most cheeses today are produced by

---

thermalization (65-68°C/5-15 seconds) or pasteurization (72°C/15 seconds) of milk, with the use of selected starter cultures (Meyrand and Vernozy-Rozand, 1999).

Lodi et al. (1994), on the basis of lactic acid bacteria, classified 32 types of fresh cheese into 3 categories: cheeses with a high number of lactic acid bacteria, cheeses with the absence of lactic acid bacteria and a small number of natural microbiota, and cheeses with the absence of lactic acid bacteria, but with a high content of natural microbiota. The authors concluded that in the first category the number of pathogenic bacteria decreases sharply during processing, while in the second and third categories pathogenic bacteria survive for several weeks.

From the aspect of food hygiene, cheese can cause foodborne diseases. Milk and milk products are foods that are often associated with staphylococcal enterotoxin food poisoning (Delbes et al., 2006). However, staphylococcal enterotoxins are not always detected in the final product, although the population of *Staphylococcus aureus* reaches a value over 10<sup>5</sup> cfu/g of cheese, because not all staphylococcal strains are enterotoxic (Delbes et al., 2006; Aoyama et al., 2008). In literature, more and more attention is paid to the contamination of cheese with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. The prevalence of these pathogenic bacteria in cheese varies from study to study, so that for *Listeria monocytogenes* the prevalence is from 2.1 to 4.8% in cheeses in Italy after packaging (Manfreda et al., 2005). This bacterium gets into the cheese during the production process, so some data suggest that the presence of the bacterium can be inhibited by adding lactic acid bacteria (Ennahar et al., 1998). Also, it is believed that listeria can be found more often in soft cheeses, in contrast to solid cheeses where they are less common. Pathogenic enterobacteria, especially the genus *Salmonella* and *Escherichia coli* (O157:H7) have been detected in fresh cheeses in many studies (Colak et al., 2007).

The most important components in milk solids are milk fat, proteins, lactose, minerals and vitamins. Determination of water is of great importance since it affects the physical, chemical and nutritional properties of the product. The rest represents the proportion of dry matter. One of the basic and very important procedures in the analysis of food and food products is the determination of water. In relation to the proportion of water in the fat-free matter of the cheese, the consistency and structure of the dough, cheeses are produced and placed on the Bosnia and Herzegovina market under the names of extra solid cheese, solid cheese, semi-solid cheese, soft cheese, fresh cheese (Propis, 2011). Milk fat is predominantly composed of triacylglycerols, quantitatively followed by sterols, mostly cholesterol and phospholipids (Chow, 2008).

---



The goal of the study was to determine the microbiological safety and physicochemical quality parameters of cheeses from the Herzegovina region, which are marketed as fresh goat cheese, semi-solid goat cheese, and sheep and goat bellows cheese.

## MATERIALS AND METHODS

The cheese samples were produced on agricultural farms and small mini-dairies in the territory of Herzegovina (Bosnia and Herzegovina), with the emphasis that the largest part of the samples originated from the southern sub-Mediterranean and Mediterranean regions of Herzegovina. The characteristics of this area are mostly the extensive way of keeping animals (sheep and goats) and the grass and Mediterranean plants from the karst fields, which the animals eat during milk production. This autochthonous milk serves as a raw material in the production of cheeses from this area. In this study 46 samples of fresh goat's cheese, semi-solid goat's cheese and sheep's and goat's bellows cheese, sampled during three years (2019-2021) were analyzed. The analyses were obtained in the accredited laboratory of the Federal Agro-Mediterranean Institute in Mostar, Bosnia and Herzegovina.

Microbiological examination of cheese samples was carried out according to the current regulations in Bosnia and Herzegovina, the Rulebook on Microbiological Criteria for Food (Regulation, 2013), and the Guidelines for Microbiological Criteria for Food (ASH BiH, 2013), using standard methods, namely:

- BAS EN ISO 6579-1 for the detection of *Salmonella spp.* (ISBIH, 2018a),
- BAS EN ISO 11290-1 for the detection of *Listeria monocytogenes* (ISBIH, 2018b),
- BAS EN ISO 6888-1 for counting coagulase positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* (ISBIH, 2005),
- BAS EN ISO 16649-2 for counting  $\beta$  glucuronidase positive *Escherichia coli* (ISBIH, 2008).

Physicochemical examinations of cheese samples were performed using standard methods, namely:

- BAS EN ISO 5534 (ISBIH, 2006) for determining the proportion of water/dry matter,
- AOAC (1996) for determination of milk fat content in cheese.

The proportion of milk fat in the dry matter and the water content in the non-fat matter of the cheese were calculated (Slanovec, 1982).

---

## RESULTS AND DISCUSSION

Until these days, cases of cheese contamination with many pathogenic bacteria that can cause human infections are well known and described: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* and *Escherichia coli* (Kousta et al., 2010). Contamination of cheese most often occurs during the stage of the preparation, transport and storage process, so active monitoring in the production process and in traffic is important for the safety of this food for consumption. In our study, the microbiological examination of cheese samples revealed an unsatisfactory number of  $\beta$  glucuronidase positive *Escherichia coli* in 13% of the samples, exclusively in fresh and semi-solid goat cheese samples ( $>103\text{CFU/g}$  to  $>109\text{CFU/g}$ ), in 6.50% of the samples of cheese, an acceptable number was determined ( $>102\text{CFU/g}$  to  $<103\text{CFU/g}$ ), while 80.50% of the samples were satisfactory ( $<10\text{CFU/g}$ ). The values of coagulase positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* were within the prescribed limits. Pathogenic microorganisms *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* were not isolated in any of the tested samples. The obtained results are in correlation with research conducted by a number of researchers across Europe. Thus, in the samples of autochthonous bellows cheese from the region of Herzegovina (Bosnia and Herzegovina) produced from raw sheep's and mixed sheep's and cow's milk, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* were not isolated, 40% of the samples contained an increased number of *Escherichia coli*, and Enterobacteriaceae were found in 60 % of the samples (Kiš et al., 2018).

The obtained results regarding *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* are in accordance with the results of Golić et al. (2014). The same authors, by examining white sheep's cheese, found an increased number of  $\beta$  glucuronidase positive *Escherichia coli* in 36.40% of the samples, and an increased number of coagulase positive staphylococci in 18.10% of the samples. The finding of colonies of  $\beta$  glucuronidase positive *Escherichia coli* in our case is an indicator of poor hygiene in the production process. Examination of Vlašić cheese originating from Bosnia and Herzegovina, taken from households engaged in the traditional production of this cheese from raw sheep's and cow's milk, with the addition of salt, revealed the presence of coagulase-positive staphylococci in 76% of the samples (Golić et al., 2015). Vlašić cheese supports the growth of staphylococci because it is made from raw milk, which is favored by the production temperature of this cheese (22-30°C), the addition of salt and a ripening period of at least 60 days and up to 180 days. These results differ from ours for the reason that the ripening conditions of Vlašić cheese, due to the mechanism of rennet coagulation, when there is no significant drop in the pH value and the development of lactic acid bacteria, favor

---

the growth of staphylococci, which are additionally, indirectly favored by the presence of salt, which prevents the growth of competing bacteria i.e. lactic acid bacteria. When examining Sjenica autochthonous cheese in brine in southwestern Serbia, produced from raw sheep's milk, during the monitored period of cheese production, the number of coagulase-positive staphylococci did not reach the value of 105 CFU/g (Bulajić et al., 2015), which coincides with the results of our study. Also, Zarate et al. (1997) investigated *Staphylococcus aureus* in goat cheese from Tenerife (Spain), produced from raw milk, without the addition of starter, consumed fresh (within 2-3 days) or after ripening for 60 days. A 2-3 log CFU/g increase in *Staphylococcus aureus* was observed in two-day-old cheese, but a rapid decline was noted thereafter.

Water is one of the main ingredients that affects the quality of food during storage, transportation, processing, etc. Consequently, determining the content of water and dry matter is one of the most important methods in food analysis. Table 1 shows the results of the physicochemical parameters of the cheese.

**Table 1** Results of physicochemical parameters of cheese

A type of cheese	Number of samples	Average value and standard deviation				
		DM %	W %	W % <sub>NF</sub>	F %	F % <sub>DM</sub>
Semi-solid goat cheese	22	54.20±5.97	45.80±5.97	57.85±7.22	38.24±10.79	20.70±6.14
Fresh goat cheese	11	44.07±4.47	55.93±4.47	70.45±5.00	46.56±7.15	20.48±3.56
Sheep bellow cheese	7	60.21±3.75	39.79±3.75	56.46±3.58	48.90±6.28	29.53±5.00
Goat bellow cheese	6	63.74±4.35	36.26±4.35	51.80±4.69	47.25±3.02	30.14±3.08

DM % - % dry matter; W % - % water; W %<sub>NF</sub> - % water in non-fat dry matter; F % - % fat; F %<sub>DM</sub> - % fat in dry matter;

The average amount of water with standard deviation in the analyzed samples was  $45.80 \pm 5.97\%$ , for semi-solid goat cheese,  $55.93 \pm 4.47\%$  for fresh goat cheese,  $39.79 \pm 3.75\%$  for sheep's bellow cheese, and  $36.26 \pm 4.35\%$  for goat bellow cheese. If it is observed by years and category of cheese, this ratio of the average value ranges from 38.88% for semi-solid cheese to 57.18% for fresh goat cheese. The amount of water plays an important role in the formation of the texture of the dough and the internal appearance of mature cheeses. Active water affects the direction of biochemical events, the extent of chemical and physical changes in the dough, the stability of the cheese and its performance. The type of cheese

should be guided by the correct choice of the appropriate raw material, the correct preparation of milk as well as the appropriate technological process. Only in this case can it be expected, with an adequate amount of water in the non-fat content of the cheese, that fermentation processes will take place normally, assuming that all other relevant factors are also normal (Slavonec, 1982). The dry matter that remains after the removal of water is actually the total solids in a food (Nielsen, 2010). The average amount of dry matter with standard deviation in the analyzed samples was  $54.20 \pm 5.97\%$  for semi-solid goat cheese,  $44.07 \pm 4.47\%$  for fresh goat cheese,  $60.21 \pm 3.75\%$  for sheep's bellow cheese, and  $63.74 \pm 4.35\%$  for goat bellow cheese. If it is observed by years and category of cheese, this ratio ranges from 46.26% for fresh goat cheese to 29.53% for sheep's bellow cheese. Milk fat is the mass fraction (m/m) of milk fat in milk, mainly composed of triacylglycerols, quantitatively followed by sterols (mostly cholesterol) and phospholipids. It is believed that milk fat, or the proportion of milk fat, affects the taste of the milk itself. The average amount of milk fat with standard deviation in this study was  $38.24 \pm 10.79\%$ , for semi-solid goat cheese,  $46.56 \pm 7.15\%$  for fresh goat cheese,  $48.90 \pm 6.28\%$  for sheep's bellow cheese, and  $47.25 \pm 3.02\%$  for goat bellow cheese. If it is observed by years and category of cheese, this ratio ranges from 19.20% for fresh goat cheese to 61.64% for goat bellow cheese. The proportion of water in the non-fat content of cheese is one of the parameters according to which cheeses can be divided into different types. The proportion of water affects the ripening of cheese, i.e. with a larger amount of water, rapid chemical changes and faster spoilage occur, due to, among other things, the increased activity of bacteria and enzymes in a moist environment (Nielsen, 2010). The average ratio of water in the non-fat content of cheese with the standard deviation in this study was  $57.85 \pm 7.22\%$  for semi-solid goat cheese,  $70.45 \pm 5.00\%$  for fresh goat cheese,  $56.46 \pm 3.58\%$  for sheep's bellow cheese, and  $51.80 \pm 4.69\%$  for goat bellow cheese. If it is observed by years and category of cheese, this ratio ranges from 52.70% for goat bellow cheese to 73.15% for fresh goat cheese. According to national and international regulations, cheeses are divided into extra-fat, full-fat, fat, semi-fat and low-fat according to the milk fat content, i.e. the milk fat content in the dry matter of the cheese. The average amount of milk fat in dry matter with standard deviation in this study was  $20.70 \pm 6.14\%$  for semi-solid goat cheese,  $20.48 \pm 3.56\%$  for fresh goat cheese,  $29.53 \pm 5.00\%$  for sheep bellow cheese, and  $30.14 \pm 3.08\%$  for goat bellow cheese. If observed by age and category of cheese, this ratio ranges from 16.78% for semi-solid goat cheese to 52.00% for goat bellow cheese. Statistically, expressed through the mean value and standard deviation, all data by cheese category are in accordance with the Ordinance on milk products and starter cultures (Propis,

---

2011), while not all specific individual data are aligned with the test parameters for individual cheese categories. Average mean values without standard deviations for the categories of semi-solid goat cheese, fresh goat cheese and sheep's bellow cheese are in accordance with the provisions of the regulations (Propis, 2011). The category of goat bellow cheese at the test level with the average value and standard deviation (Table 1) meets the provisions of the regulations (Propis, 2011). Of the total tested samples, if we take the individual results, the largest number of unsatisfactory samples in all categories of cheese was for the parameter water content in non-fat dry matter 34.07%, which is below or above the prescribed values for the individual category of cheese. Of the tested samples, 2.13% of semi-solid fat goat cheese samples had a milk fat content in dry matter of 16.78%, which is below the prescribed value of a minimum of 25% (Propis, 2011). Almost all small cheese producers correctly declared their products, meeting the provisions of the ordinance (Propis, 2011). Considering the quality of the analyzed samples of all categories of cheese, 36.22% of the samples did not meet the requirements for the parameter water content in non-fat dry matter and fat content in dry matter. The obtained results for physicochemical parameters are similar to the results of other authors. The results of the studies related to cheese among small individual producers, conducted in the area of central and western Bosnia and Herzegovina, for traditional sheep's cheeses (Livanjski and Travnik) are comparable to our results. According to the results of Hrković et al. (2011), the average proportion of dry matter for Livanjski cheese was 62.88%, the water content was 37.11%, and the proportion of milk fat was 31.93%. The result of the average ratio of milk fat for Travnik cheese was 27.08%, and the average ratio of water and dry matter in Travnik cheese was 54.66% and 45.34%, respectively. The results of our tests are consistent with these results, but differ in part in the obtained test values. Mirecki et al. (2015) published the results of study of the physicochemical properties of Njeguški cheese, a traditional sheep's cheese from Montenegro, where they obtained results of milk fat content in sheep's milk of 4.92%, and dry matter without fat of 9.46%. The cheeses belong to full-fat semi-solid cheeses, because they have a fat content of 29.97%, fat in dry matter 51.73%, water in non-fat dry matter 60.07%, and dry matter content 57.93%. This research is in accordance with our study. The results of research conducted by Drozd (2001) in the Tatra region of southern Poland, on the traditional Oscypek cheese, a smoked baked solid cheese produced from raw sheep's milk, with an average water content of 27.50%, a fat content of 22.50% and with an average milk fat content of 31.30%, differ from the results of our study for sheep's milk cheese with a water content of 39.79% and a fat content of 48.90%, which is significantly higher for these test parameters. By

---

investigating the physicochemical properties of full-fat, semi-fat and low-fat sheep's cheese in Spain (Sanchez-Marcias et al., 2010), it was concluded that cheeses generally differ due to physical and chemical changes that occur during ripening, and this is primarily influenced by the chemical composition of milk used for cheese production. After fourteen days of ripening, it was determined that full-fat cheese contains 25% milk fat, semi-fat cheese 12.17% milk fat, and lean cheese 4.43% milk fat. The proportion of water after fourteen days in full-fat cheese was 44.12%, semi-fat cheese contained 50.98% water, and lean cheese 55.15%. According to the results obtained in this study, it can be concluded that the values of physical and chemical parameters of cheese are approximately the same.

### CONCLUSION

The results of the microbiological examination indicate the need to improve the hygiene level of the production process, considering the determined number of *Escherichia coli* in the cheese, where special care must be taken when manipulating the milk. Autochthonous Herzegovinian bellow cheese and fresh cheese are usually produced from unheated milk, and it is necessary to apply good hygiene practices, especially preventive procedures, in order to reduce the public health risk for the general population. The risk of *Escherichia coli* is primarily reflected in the sensory characteristics of the cheese, which can endanger the technological production process itself and affect the physicochemical quality parameters. From the physicochemical aspect, the obtained analytical data can represent a contribution to determining the quality requirements and standardization of the production of autochthonous cheeses in the region of Herzegovina. This study indicates that it is necessary to standardize the physicochemical parameters in the production of cheese, as well as the use of exclusively autochthonous raw materials in the production of individual small producers and in mini cheese factories engaged in this production, as is the case with the industrial production of these products in that area. Thus, consumers would be sure of the product they are buying, and the conditions would be met for registration of the quality mark of geographical origin (bellow cheese) at the national level, and eventually at the EU level.

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

### REFERENCES

- AOAC. (1996): 933.05 Official Method Fat in Cheese. Association of Official Agricultural Chemists, 33.7.17.
-

- Aoyama K., Takahashi C., Yamauchi Y., Sakai F., Igarashi F., Yanahira S., Konishi H. (2008): Examination of *Staphylococcus aureus* survival and growth during cheese-making process. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 49:116-123.
- ASH BiH (2013): Smjernice za mikrobiološke kriterije za hranu. Agencija za sigurnost hrane Bosne i Hercegovine.
- Bulajić S., Mijačević Z., Ledina T., Golić B. (2015): Safety evaluation of sjenica cheese with regard to coagulase-positive staphylococci and antibiotic resistance of lactic acid bacteria and staphylococci. *Acta Veterinaria, Beograd*, 65(4),518-537.
- Chow C. K. (2008): Fatty acids in food and their health implications, 3<sup>rd</sup> edition, CRC Press, 109-127.
- Colak H., Hampyikian H., Bingol E. B., Ulusoy E. (2007): Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella spp.* in Tulum cheese. *Food Control*, 18:576-579.
- Delbes C., Alomar J., Chougui N., Martin J. F., Montel M. C. (2006): *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows raw milk. *Journal of Food Protection*, 69:2161-2167.
- Drozd A. (2001): Quality of the Polish traditional mountain sheep cheese "oscypek". In Production systems and product quality in sheep and goats. Rubino R. (ed.), Morand-Fehr P. (ed.), Zaragoza CIHEAM, 111-114.
- EC. (2003). Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particularly cheeses. European Commission, Health&Consumer Protection Directorate-General, 26-27.
- Ennahar S, Assobhel O, Hasselmann C. (1998): Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J Food Protect*, 61:186-191.
- Gantner V., Mijić P., Baban M., Škrtić Z., Turalija A. (2015): The overall and fat composition of milk of various species, *Mljekarstvo*, 65(4):223-231.
- Golić B., Mijačević Z., Bulajić S., Velebit B., Nedić D. (2015): Detection of coagulase-positive staphylococci in Vlasic cheese. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 15(1):14-21.
- Golić B., Nedić D., Pećanac B., Dojčinović S., Stojiljković M., Nedić S. (2014): Quality of white sheep cheese from Stara planina. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 14(2):224-233.
-

- Hrković A., Hodžić A., Sarić Z., Hamamdžić M., Vegara M., Šaljić E., Juhas-Pašić E. (2011): Utjecaj kemijskog sastava ovčjeg mlijeka na kemijski sastav Livanjskog i Travničkog sira. *Mljekarstvo*, 61(2):175-181.
- ISBIH (2006): Određivanje sadržaja ukupne suhe tvari – sir i topljeni sirevi (referentna metoda). Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine, BAS EN ISO 5534.
- ISBIH (2018a): Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za detekciju i serotipizaciju *Salmonella* spp. – Dio 1: Detekcija. Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine, BAS EN ISO 6579-1.
- ISBIH (2018b): Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za detekciju i brojanje *Listeria monocytogenes*, Dio 1: Detekcija. Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine, BAS EN ISO 11290-1.
- ISBIH. (2005): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za brojanje koagulasa pozitivnih stafilocoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) – Dio 1: Tehnika korištenja Baird-Parker agar medija. Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine, BAS EN ISO 6888-1.
- ISBIH. (2008): Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za za brojanje <math>\beta</math>-glukuronidaza pozitivne *Escherichia coli* - Dio 2: Tehnika brojanja kolonija na 44° C koristeći i 5-bromo-4-hloro-3-indolil<math>\beta</math>-D-glukuronid. Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovine, BAS EN ISO 16649-2.
- Kiš M., Grbavac J., Mašek T., Starčević K., Džaja P., Zdolec N. (2018): Mikrobiološka kvaliteta i masnokiselinski sastav autohtonog sira iz mišine. *Hrvatski Veterinarski Vjesnik*, 26(7-8):58-63.
- Kousta M., Mataragas M., Skandamis P. N., Drosinos E. H. (2010): Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21:805-815.
- Lodi R., Malaspina P., Brasca M. (1994): Lactic acid bacteria: a quality parameter for fresh cheese. *Industria del latte*, 30:3-16.
- Manfreda G., de Cesare A., Stella S., Cozzi M., Cantoni C. (2005): Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, 102:287-293.
- Meyrand A., Vernozy-Rozand C. (1999): Croissance et enterotoxinogenese de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. *Revue Med. Vet.*, 150:601-616.
- Mirecki S., Popović N., Antunac N., Mikulec N., Plavljančić D. (2015): Production technology and some quality parameters of Njeguši cheese. *Mljekarstvo*, 65(4):280-286.
-



- Nielsen S.S. (2010): Food Analysis, Part II: Compositional Analysis of Foods. 4<sup>th</sup> edition, Springer Science Business Media, LLC, 85-215.
- Propis, (2011): Pravilnik o proizvodima od mlijeka i starter kulturama. Službeni glasnik Bosne i Hercegovine, 21/11, 25/12, 17/19.
- Propis, (2013): Pravilnik o mikrobiološkim kriterijumima za hranu. Službeni glasnik Bosne i Hercegovine, 11/13, 79/16, 64/18.
- Rako A., Tudor Kalit M., Rako Z., Petrović D., Kalit S. (2019): Textural characteristics of Croatian cheese ripen in a lamb skin sack (Sir iz mišine). *Mljekarstvo*, 69(1):21-29.
- Sanchez-Macias D., Fresno M., Moreno-Indias I., Castro N., Morales-de la Nuez A., Alvarez S., Argüello A. (2010): Physicochemical analysis of full-fat, reduced-fat and low fat artisan-style goat cheese. *Journal of Dairy Science*, 93:3950-3956.
- Slanovec T. (1982): Sirarstvo. ČZP Kmečki glas.
- Tudor Kalit M., Kalit S., Delaš I., Kelava N., Karolyi D., Kaić D., Vrdoljak M., Havranek J. (2014): Changes in the composition and sensory properties of Croatian cheese in a lamb skin sack (Sir iz mišine) during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 67:255-264.
- Tudor Kalit M., Kalit S., Havranek J. (2010): An overview of researches on cheeses ripening in animal skin. *Mljekarstvo*, 60:149-155.
- Zarate V., Belda F., Perez C., Cardell E. (1997): Changes in the microbial flora of Tenerife goats milk cheese during ripening. *Int. Dairy J.*, 7:635-641.

Paper received: 03.06.2022.

Paper accepted: 28.07.2022.

---

DOI 10.7251/VETJSR2201080V

UDK 636.2.082.454.2:591.463.1

**Originalni naučni rad****ANALIZA KVALITETA SEKSIRANOG SEMENA BIKOVA  
KOMPJUTERSKI ASISTIRANOM ANALIZOM SEMENA-CASA****Slobodanka VAKANJAC<sup>1\*</sup>, Goran PANTIĆ<sup>2</sup>, Ljubomir JOVANOVIĆ<sup>1</sup>,  
Vladimir MAGAŠ<sup>1</sup>, Danijela KIROVSKI<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Republika  
Srbija<sup>2</sup> Privatna veterinarska ambulanta Radičević, Kragujevac, Republika Srbija

\* Korespondentni autor: Slobodanka Vakanjac, vakanjac@vet.bg.ac.rs

**Sažetak**

Kvalitet ejakulata određuje se ispitivanjem makroskopskih (volumen, gustina, boja, miris) i mikroskopskih svojstava sperme (koncentracija spermatozoida u 1 ml i ukupan broj spermatozoida u ejakulatu, morfologija, vitalnost, pokretljivost spermatozoida i integritet akrozomalne membrane). Kompjuterizovana analiza sperme (CASA - computer assisted semen analysis) je automatizovani sistem kojim se mere pokretljivost, kinetika i koncentracija spermatozoida. Neki sistemi imaju modifikacije za procenu morfoloških karakteristika spermatozoida. Procena morfoloških osobina spermatozoida se može izvršiti mikroskopskim pregledom (zastupljenost normalnih i patoloških spermatozoida, integritet ćelijske membrane spermatozoida i abnormalnosti akrozoma). Metodom po Blomu se određuje vitalnost semena, a ono predstavlja bojenje razmaza sperme eozinom i nigrozinom. U savremenom govedarstvu se sve više koristi seksirano seme bikova (seme iz koga će se najverovatnije proizvesti muško ili žensko tele). Analiza seksiranog semena a posebno poređenje njegovog kvaliteta sa konvencionalnim semena je sve češći zahtev na tržištu govedarske proizvodnje. Cilj rada bio je da se ispita kvalitet 15 uzoraka seksiranog semena bikova, poreklom iz uvoza. Ispitivanja su obuhvatila utvrđivanje koncentracije i kinetike CASA sistemom, kao i procenu vitalnosti i morfoloških osobina bojenjem po Blomu. Prosečna koncentracija spermatozoida u 15 uzoraka bila je  $19,61 \times 10^6$ /ml ejakulata. Ukupna pokretljivost iznosila je 39,42%, dok je nepokretnih spermatozoida u uzorcima bilo 60,58%. Broj morfološki normalnih spermatozoida je varirao od  $2,91 \times 10^6$  do  $6,11 \times 10^6$ , a procenat patoloških spermatozoida od 8% do 28%. Uzimajući u obzir dobijene rezultata i odsustvo standarda vezanih za seksirano seme u trenutno važećem Pravilniku o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o

---

производnji sperme, kao i uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta (Službeni glasnik Republike Srbije, 38/14), neophodno je češće sprovođenje analiza seksiranog semena CASA metodom a da bi se dobili normativi koji bi postali sastavni deo Pravilnika i time olakšali manipulaciju seksiranim semenom na tržištu.

**Ključne reči:** seksirana sperma bikova, CASA, kvalitet sperme.

## UVOD

Jedan od ključnih ciljeva govedarske proizvodnje jeste poboljšanje reproduktivnih parametara stada i postizanje maksimalne eksploatacije reproduktivnih kapaciteta. Ključno u ostvarivanju ovih ciljeva jeste implementacija savremenih biotehnoških procedura, ali i metoda za kontrolu i obezbeđenje kvaliteta semena.

Kompjuterizovana analiza sperme (CASA - computer assisted semen analysis) je metod analize semena, koji se stalno razvija i poboljšava, omogućava uvid u svojstva kvaliteta ejakulata, značajnih za njihovu fertilnu sposobnost, kako konvencionalog, tako i seksiranog semena. CASA je metoda koja se smatra objektivnom i pouzdanom, ali relativno skupom, pa se najčešće koristi u velikim centrima za veštačko osemenjavanje, odnosno pri proizvodnji inseminacionih doza od genetski superiornih bikova (Maes i sar., 2011). CASA koristi analizu slike, na osnovu koje određuje broj, odnosno koncentraciju spermatozoida. Tačnost ovog sistema zavisi od optičkih svojstava i podešenosti instrumenata i softvera, ali isključuje greške nastale kao posledica subjektivnosti analitičara (Amann i Waberski, 2014; Finelli i sar., 2021).

Morfološki nepromenjenih spermatozoida, u ejakulatima bikova koji se koriste za veštačko osemenjavanje, treba da bude najmanje 70% (Menon i sar., 2011). Sperma sa lošom morfologijom spermatozoida daje slabije rezultate veštačkog osemenjavanja, kao posledica smanjene oplodne sposobnosti sperme sa povećanim brojem abnormalnih spermatozoida. Različite anomalije morfologije spermatozoida, ćelijske membrane i akrozoma mogu se ustanoviti histološkim metodama bojenja. Najčešće je u upotrebi metoda bojenja po Blom-u (eozin-nigrozín bojenje), na osnovu kojeg se mogu odrediti živi i mrtvi, odnosno morfološki promenjeni spermatozoidi (WHO, 2010). Integritet akrozomalne membrane koja pokriva 2/3 glave spermatozoida i sadrži enzime potrebne za penetraciju kroz oocit tokom procesa oplodnje, značajan je pokazatelj oplodne sposobnosti spermatozoida. Zbog toga, dobri ejakulati moraju imati više od 51% spermatozoida sa normalnim akrozomom (Vincent i sar., 2012). Anomalije građe akrozoma se mogu ispitivati primenom različitih metoda bojenja i pregledom

takvih preparata fazno-contrastnom mikroskopijom (Maes i sar., 2011) ili protočnom citometrijom (Vincent i sar., 2012). Duboko zamrzavanje može značajno da poveća broj živih spermatozoida sa oštećenim akrozomom (Ugur i sar., 2019).

Prosečna brzina spermatozoida bika iznosi oko 100  $\mu\text{m}$  u sekundi, odnosno 4-7 mm u 1 minutu. Ovom brzinom kretanja spermatozoid u jajovod krave stiže za dva sata. Kretanje se odvija rotacijom oko produžene ose s leva na desno, frekvencijom od 3 do 15 rotacija u sekundi i sa 9 udara repom u vidu talasa. Rotacija glave i repa se odvija u tri dimenzije uz istovremeno kretanje spermatozoida unapred – progresivno kretanje (Miljković i Veselinović, 2005).

Pod seksiranim semenom se podrazumeva ejakulat koji je izdvojen tako da sadrži spermatozoide koji će najverovatnije proizvesti željeni pol potomstva (Seidel, 2014; Dragin i sar., 2016). Ograničavajući faktori za primenu seksiranog semena je manji broj spermatozoida u dozi kojih u seksiranom semenu ima prosečno 2 miliona u odnosu na 20 miliona koliko ih ima u konvencionalnom semenu. Neki autori beleže smanjenje stope koncepcije primenom seksiranog semena, kao posledicu niskog broja spermatozoida u dozi, ali i potencijalnih fizičkih oštećenja, kao i grešaka u radu prilikom sortiranja (Frijters i sar., 2009).

Osim navedenog, nedostaci upotrebe seksiranog semena su i visoki troškovi nabavke i održavanja opreme, neophodna kvalifikovana radna snaga, spor proces u kome se dobija mali broj spermatozoida u dozi i manji broj doza u jedinici vremena (7-10 doza / sat), visok udeo sperme sa neodređenim polom (samo 30% sperme je pravilno seksirano) i na kraju veća cena seksiranog semena (Frijters i sar., 2009; Seidel, 2014).

Prednosti primene seksiranog semena su pre svega postizanje željenog pola jedinice u visokom procentu. Navodi se da je odnos polova kod mlečnih rasa goveda 85-90% ženske naspram 10-15% muške teladi. Značajni su potencijali za poboljšanje genetskog trenda u stadu, odabirom roditelja najboljih proizvodnih potencijala i dobijanje ženske teladi od najboljih krava u stadu. Takođe, zabeleženo je i smanjenje pojave teških teljenja i pratećih reproduktivnih problema (Seidel, 2014).

Steele i sar. (2020) su opisali analizu seksiranog semena CASA metodom ( $n = 5$  bikova) koja je pokazala značajno smanjene procenta progresivne pokretljivosti brzih i sporih spermatozoida u poređenju sa konvencionalnim semenom (25,6% i 4,3% u odnosu na 60,8% i 13,3%, pojedinačno). Isti autor navodi da je procenat nepokretnih spermatozoida značajno povećan kod seksiranog semena i iznosi 64,3% u odnosu na 18,4% iste klase spermatozoida kod konvencionalnog.

Utvrđeni broj spermatozoida po dozi seksiranog semena iznosi  $2,1 \times 10^6$ . Ova količina je značajno niža od broja spermatozoida u konvencionalnoj dozi semena

---

bikova koja iznosi u proseku oko  $20 \times 10^6$ . Junice, kao i krave rase holštajn rase imaju isti procenat začeća kada su osemenjene seksiranim semenom od  $2 \times 10^6$  ili konvencionalnim semenom od  $3,5 \times 10^6$  spermatozoida po dozi, međutim, ne samo kod junica već i kod krava, postoji povećan procenat začeća kada se osemene sa konvencionalnim semenom u dozi od  $15 \times 10^6$  spermatozoida (Macedo i sar., 2013).

Procenat nepokretnih spermatozoida kod seksiranog semena 3 bika holštajn rase i jednog angusa odmah posle otapanja kretala se 33%, 30%, 47% i 50% ispitano CASA metodom, da bi posle tri sata procenat nepokretnih spermatozoida bio 53%, 71%, 77% kod holštajn rase bikova i 82% kod angusa (Brogliatti i sar., 2003). Isti autor navodi da je procenat progresivno pokretnih spermatozoida odmah posle otapanja iznosio  $23,1 \pm 4,9\%$  a posle tri sat procenat je smanjen na  $3,7 \pm 3,2\%$ .

Minimalne uslove u pogledu kvaliteta semena bikova propisuje član 5. Pravilnika o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta (Propis, 2014). Navedeni propis ne reguliše pojam seksiranog semena i ne propisuje uslove dobijanja, kao ni zahteve kvaliteta koje mora da ispuni seksirano seme u prometu. Zahtevi savremenog tržišta, na kome je seksirano seme komercijalno dostupno nameću potrebu za zakonskom regulativom koja će definisati proizvodnju, promet, kao i uslove kvaliteta i bezbednosti ovog proizvoda.

Cilj ovog rada jeste da se ispita kvalitet seksiranog semena bikova iz uvoza kompjuterski asistiranom analizom semena CASA.

## MATERIJALI I METODE

### **Analiza uzoraka seksiranog semena CASA metodom i bojenje uzoraka po Blomu**

Ispitano je 15 uzoraka seksiranog semena, poreklom iz uvoza. Ispitivanja su izvršena na Katedri za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

Koncentracija spermatozoida, njihova pokretljivost i brzina utvrđeni su CASA (Computer Assisted Semen Analysis) sistemom. Za potrebe CASA korišćen je poduzorak od 5  $\mu$ l koji se nanosi na leje-komorice (Proiser D4C20, Valensija, Španija), duboke 20  $\mu$ m, postavljene na grejnoj ploči mikroskopa. Nakon prestanka pasivnog kretanja spermatozoida, izvršeno je slikanje na svih 7 definisanih polja komorice. Broj analiziranih spermatozoida po uzorku iznosio je od 1500-5000, odnosno 150-250 spermatozoida po snimku. Program je podešen na analizu

25 slika u sekundi, sa ekspozicijom snimka od 2 sekunde (ukupno 50 slika). Nakon obrade slike dobijeni su sledeći parametri:

- koncentracija spermatozoida ( $\times 10^6$  u ml i u dozi);
- procentualnu zastupljenost pojedinih klasa spermatozoida prema pokretljivosti (progresivno pokretni, neprogresivno pokretni i nepokretni), kao i prema brzini (brzi, srednje brzi, spori i statični spermatozoidi).

Morfološke analize semena su sprovedene u cilju utvrđivanja odnosa živih i mrtvih spermatozoida, nalaza intaktnih i oštećenih akrozoma, protoplazmatskih kapljica, kao i primarnih, sekundarnih i ukupno patoloških formi spermatozoida specifičnim supravitalnim bojenjem po Blomu.

### Određivanje ukupnog broja živih aerobnih mikroorganizama u duboko zamrznutom semenu bikova

Ukupan broj živih aerobnih mikroorganizama određivan je standardnom metodom ISO/TR 8607 (ISO, 1991).

### Statistička obrada podataka

Normalna raspodela podataka je testirana koristeći D'Agostino & Pearson test normalnosti. Pošto su podaci bili normalno distribuisani ( $p > 0,05$ ) za poređenje statistički značajnih razlika između dve grupe korišćen je *t*-test za nezavisne uzorke. Statistička obrada eksperimentalnih podataka je izvršena pomoću softvera GraphPad Prism verzija 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

## REZULTATI

Rezultati ispitivanja koncentracije i pokretljivosti ispitanih uzoraka semena utvrđeni CASA metodom prikazani su Tabeli 1.

**Tabela 1** Parametri koncentracije i pokretljivosti semena utvrđeni CASA metodom

Broj uzorka	Con ( $\times 10^6$ /ml)	Con D ( $\times 10^6$ /dozi)	UP (%)	PP (%)	BS (%)	SS (%)	LP (%)	N (%)	C (%)
1	15,43	3,85	34,47	28,14	18,50	9,51	6,34	65,53	0,13
2	16,72	4,18	36,14	30,41	10,76	19,65	5,73	63,86	0,00
3	17,81	4,45	40,40	34,80	24,70	10,10	5,60	59,60	0,00
4	21,72	5,43	31,41	22,59	13,14	9,45	8,82	68,59	0,00
5	12,90	3,22	34,85	31,82	24,24	7,58	3,03	65,15	0,00
6	19,75	4,93	45,54	42,57	21,78	20,79	2,97	54,46	0,00
7	15,40	3,85	44,44	38,10	23,17	14,92	6,35	55,56	0,00
8	19,65	4,91	45,51	42,47	21,58	20,59	2,91	54,36	0,00
9	17,30	4,32	41,13	36,27	28,81	7,46	4,86	58,87	0,00
10	20,61	5,15	56,52	52,73	39,29	13,36	3,79	43,48	0,08
11	24,28	6,08	42,42	35,03	18,39	16,51	7,38	57,58	0,13

12	23,46	5,86	35,00	27,02	13,33	13,57	7,98	65,00	0,12
13	21,06	5,25	33,70	25,53	15,97	9,29	8,17	66,30	0,28
14	28,44	7,11	44,23	37,66	22,31	15,13	6,57	55,77	0,23
15	19,59	4,89	25,55	19,36	12,28	7,09	6,19	74,45	0,00

Legenda: Con – koncentracija spermatozoida u mL; Con D – koncentracija spermatozoida u dozi; UP – ukupna pokretljivost; PP – progresivna pokretljivost; BS – brzi spermatozoidi; SS – spori spermatozoidi; LP – lokalno pokretljivi spermatozoidi; N – nepokretni; C – cirkularni ili spermatozoidi koji se kreću u krug;

Nakon statističke analize gore navedenih uzoraka seksiranog semena dobijeni su sledeći rezultati: ispitivanjem koncentracije spermatozoida u 15 uzoraka seksiranog semena utvrđena je prosečna koncentracija od  $19,61 \pm 3,958 \times 10^6$ /ml ejakulata (Tabela 2). Najniža utvrđena koncentracija bila je  $12,9 \times 10^6$ /ml, a najviša  $28,44 \times 10^6$ /ml. Najniža koncentracija spermatozoida u dozi iznosila je  $3,22 \times 10^6$ /doza, a najveća  $6,08 \times 10^6$ /doza.

**Tabela 2** Deskriptivne statističke vrednosti analize parametara seksiranog semena - koncentracija spermatozoida u mL [ $10^6$ /ml]

Koncentracija semena	n	$\bar{x}$	SD	SE	X min	X max	CV (%)
	15	19,61	3,958	1,022	12,9	28,44	20,18

Ispitivanjem pokretljivosti spermatozoida u 15 uzoraka seksiranog semena, utvrđena je ukupna pokretljivost od  $39,42 \pm 7,528\%$ , a procenat spermatozoida koji su bili nepokretni u uzorcima je bio  $60,58 \pm 7,528\%$  (Tabela 3).

**Tabela 3** Deskriptivne statističke vrednosti analize parametara seksiranog semena [%]

Parametar	n	$\bar{x}$	SD	SE	X min	X max	CV (%)
Ukupna pokretljivost	15	39,42	7,528	1,944	25,55	56,52	19,10
Progresivna pokretljivost	15	33,64	8,659	2,236	19,36	52,73	25,74
Brzi spermatozoidi	15	20,56	7,389	1,908	16,47	24,66	35,93
Spori spermatozoidi	15	13,01	4,844	1,251	7,09	20,79	37,23
Lokalna pokretljivost	15	5,783	1,927	0,4975	2,97	8,82	33,32
Nepokretni	15	60,58	7,528	1,944	43,48	74,45	12,43
kružna pokretljivost	15	0,065	0,094	0,0242	0,00	0,28	145,05

Progresivna pokretljivost je varirala od 19,36% do 52,73%, a prosečne vrednosti su iznosile  $33,64 \pm 8,659\%$ , procenat brzih spermatozoida u uzorku u proseku se kretao  $20,56 \pm 7,389\%$  (od 10,75% do 39,29%), a procenat sporih spermatozoida u proseku je bio  $13,01 \pm 4,844\%$  (od 7,09% do 20,79%). Prosečan procenat spermatozoida koji se kreću u krug ispitanih uzoraka iznosio je  $0,065 \pm 0,094\%$ , a

lokalno pokretljivih spermatozoida odnosno titranje u mestu bilo je u proseku  $5,783 \pm 1,927\%$ .

Procenat živih spermatozoida kretao se kod ispitivanih uzoraka seksiranog semena od 34% do 60%. Procenat promena na glavi i repu spermatozoida kretao se od 2% do 12%, a promena na srednjem delu spermatozoida bilo je manje i iznosio je od 2% do 6%. Broj morfološki normalnih spermatozoida u uzocima seksiranog semena je varirao od  $2,91 \times 10^6$  do  $6,11 \times 10^6$ , a procenat patoloških spermatozoida od 8% do 28% (Tabela 4).

**Tabela 4** Vrednosti citomorfoloških parametara semena, metodom po Blomu

Broj uzorka	Živi/mrtvi %	Promene na glavi %	Promene na srednjem delu %	Promene na repu %	Ukupan broj patoloških formi %	Broj morfološki normalnih spermatozoida u dozi ( $\times 10^6$ )
1	44 / 56	4	/	4	8	3,55
2	40/60	4	4	8	16	3,51
3	48/52	4	2	8	14	3,83
4	60/40	8	/	4	12	4,78
5	52/48	2	2	6	10	2,91
6	58/42	/	/	12	12	4,35
7	52/48	2	/	6	8	3,39
8	58/42	/	/	12	12	4,32
9	56/44	4	2	8	14	3,73
10	60/40	8	/	12	20	3,50
11	44/56	8	6	8	22	4,61
12	48/52	8	2	6	16	3,55
13	40/60	6	2	2	10	4,73
14	52/48	6	2	6	14	6,11
15	34/66	12	4	12	28	3,53

## DISKUSIJA

Utvrđeni broj spermatozoida po dozi seksiranog semena u našem radu iznosi u proseku  $4,9 \times 10^6$ , što je za 57% više nego što opisuju u svom radu Macedo i sar. (2013) gde ona iznosi  $2,1 \times 10^6$ . Brogliatti i sar. (2003) navode da je procenat progresivno pokretljivih spermatozoida odmah posle otapanja iznosio  $23,1 \pm 4,9\%$ , a posle tri sata procenat je smanjen na  $3,7 \pm 3,2\%$  dok smo mi u našim istraživanjima dobili progresivnu pokretljivost odmah nakon otapanja uzorka  $33,64 \pm 8,659\%$ . Seidel i sar. (1997) su ustanovili radom na terenu sa seksiranim semenom da doze za osemenjavanje junica u rasponu od  $1 \times 10^6$  do  $2,5 \times 10^6$  spermatozoida daju zadovoljavajuću stopu začeca koja iznosi od 35% do 48%.

Steele i sar. (2020) su utvrdili da je procenat progresivno pokretljivih brzih i sporih spermatozoida iznosio 25,6% i 4,3%, dok smo mi u našem radu utvrdili da je procenat brzih spermatozoida iznosio  $20,56 \pm 7,389\%$  i sporih spermatozoida  $13,01\% \pm 4,844\%$ . Dakle, u našem radu je bio mnogo veći procenat sporih



spermatozoida nego što je utvrdio gore navedeni autor. Isti autor navodi da je procenat nepokretnih spermatozoida kod seksiranog semena iznosio 64,3%, što je slično našim rezultatima ovog parametra kvaliteta semena ( $60,58 \pm 7,528$ ). Za razliku od naših rezultata dobili su mnogo manji procenat nepokretnih spermatozoida kod seksiranog semena i on je iznosio 33%, 30% i 47% kod tri bika rase holštajn i 50% kod bika rase angus.

Na osnovu Pravilnika o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta (Propis, 2014), koji propisuje oplodnu sposobnost semena bikova nakon odmrzavanja, progresivna pokretljivost spermatozoida treba da bude najmanje 50%, što ne ispunjava četrnaest uzoraka seksiranog semena u našem radu, tako da se procenat progresivne pokretljivosti kod uzoraka kretao u proseku  $33,64 \pm 8,659$ . Samo je jedan uzorak imao progresivnu pokretljivost veću od 50% (52,73%). Stav 2. Pravilnika propisuje da procenat morfološki promenjenih spermatozoida treba da bude do 30%, što svi uzorci u našem radu ispunjavaju i on iznosi manje od 28%. Stav 4. Pravilnika propisuje da broj progresivno pokretnih i morfološki normalnih spermatozoida u dozi posle odmrzavanja treba da bude najmanje 10 miliona, što nije moguće ispuniti kod seksiranog semena, jer njihova koncentracija u dozi iznosi od 3,22 do  $7,11 \times 10^6$ , dok je broj morfološki normalnih spermatozoida u uzorcima seksiranog semena varirao od  $2,91 \times 10^6$  do  $6,11 \times 10^6$ . Svi uzorci semena su bili bakteriološki i mikološki negativni, što je u skladu stavom 5. istog Pravilnika koji propisuje da ukupan broj bakterija u uzorku mora da bude do 500 CFU/ml.

## ZAKLJUČAK

Važeći Pravilnik o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta (Službeni glasnik Republike Srbije, 38/14) ne propisuje parametre kvaliteta seksiranog semena. Uzimajući u obzir trend povećane upotrebe seksiranog semena od strane farmera neophodno je češće sprovođenje analiza seksiranog semena CASA metodom a u cilju dobijanja normativa koji bi postali sastavni deo Pravilnika. Time bi se olakšala manipulacija seksiranim semenom na tržištu i utvrdili standardi za procenu kvaliteta seksiranog semena.

## Zahvalnica

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2022-14/200143).

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

## LITERATURA

- Amann R., Waberski D. (2014): Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81:5-17.
- Brogliatti G. M., Barreiro G., Larraburu G., Laborde A. (2003): 10 CASA evaluation of sexed and non-sexed frozen bull semen. *Reproduction Fertility and Development*, 16(2):127-128
- Dragin S., Stančić I., Jotanović S. (2016): Biotehnologija u reprodukciji životinja. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Finelli R., Leisegang K., Tumallapalli S., Henkel R., Agarwal A. (2021): The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Translational Andrology and Urology*, 10(7):3069-3079.
- Frijters A. C, Mullaart E., Roelofs R. M., van Hoorne R. P., Moreno J. F., Moreno O., Merton J. S. (2009): What affects fertility of sexed bull sperm more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology*, 71:64-67.
- ISO. (1991): Artificial insemination of animals – Frozen semen of breeding bulls – Enumeration of living aerobic micro-organisms. International organisation for standardisation, ISO/TR 8607.
- Macedo G. G., de Sá Filho M. F., Sala R. V., Mendanha M. F., de Campos Filho E. P., Baruselli P. S. (2013): The Use Of Sex-Sorted Sperm For Reproductive Programs In cattle. In Success in Artificial Insemination – Quality of semen and Diagnostics Employed. Ed. A. Lemma, InTechOpen.
- Maes D., Lopez Rodriguez A., Rijsselaere T., Vyt P., Van Soom A. (2011): Artificial insemination in pigs. In Artificial insemination in farm animals. Ed. M. Manafi, In-TechOpen.
- Menon A. G., Thundathil J. C., Wilde R., Kastelic J. P., Barkema H. W. (2011): Validating the assessment of bull sperm morphology by veterinary practitioners: brief communications. *Canadian Veterinary Journal*, 52:407-408.
- Miljković V., Veselinović S. (2005): Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje domaćih životinja, VI dopunjeno izdanje. Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
-

- Propis, (2014): Pravilnik o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta. Službeni glasnik Republike Srbije, 38/14.
- Seidel G. E. A. C., Allen H., John L. A., Holland M. D., Brink Z., Welch G. R., Graham J. K., Cattell M. B. (1997): Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 48:1255-1264.
- Seidel Jr G. E. (2014): Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, 1:160-4.
- Steele H., Makri D., Maalouf W. E., Reese S., Kölle S. (2020): Bovine Sperm Sexing Alters Sperm Morphokinetics and Subsequent Early Embryonic Development. *Scientific Reports*, 10(1):6255.
- Thomas J., Locke J., Vishwanath R., Hall J., Ellersieck M., Smith M., Patterson D. (2017): Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology* 98:88-93.
- Ugur M. R., Abdelrahman A. S., Evans H. C., Gilmore A. A., Hitit M., Arifiantini R. I., Purwantara B., Kaya A., Memili E. (2019): Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Sciences*, 6:268.
- Vincent P., Underwood S. L., Dolbec C., Bouchard N., Kroetsch T., Blondin P. (2012): Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Animal Reproduction*, 9(3):153-165.
- WHO. (2010): WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5<sup>th</sup> edition, World Health organisation, WHO Press.

Rad primljen: 14.05.2022.

Rad prihvaćen: 24.08.2022.

---

DOI 10.7251/VETJEN2201090V

UDK 636.2.082.454.2:591.463.1

**Original Scientific Paper****ANALYSIS OF THE QUALITY OF SEXED BULL SEMEN BY  
COMPUTER-ASSISTED SEMEN ANALYSIS-CASA****Slobodanka VAKANJAC<sup>1\*</sup>, Goran PANTIĆ<sup>2</sup>, Ljubomir JOVANOVIĆ<sup>1</sup>,  
Vladimir MAGAŠ<sup>1</sup>, Danijela KIROVSKI<sup>1</sup>**<sup>1</sup> University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Republic of  
Serbia<sup>2</sup> Private Veterinary Clinic Radičević, Kragujevac, Republic of Serbia

\* Corresponding author: Slobodanka Vakanjac, vakanjac@vet.bg.ac.rs

**Summary**

The quality of the ejaculate is determined by examination of the macroscopic (volume, density, color, smell) and microscopic properties of the sperm (concentration of spermatozoa in 1 ml and the total number of spermatozoa in the ejaculate, morphology, vitality, mobility of spermatozoa and integrity of the acrosomal membrane). Computer assisted semen analysis (CASA) is an automated system that measures sperm motility, kinetics and concentration. Some systems have modifications for evaluating the morphological characteristics of spermatozoa. The assessment of morphological characteristics of spermatozoa can be performed by microscopic examination (presence of normal and pathological spermatozoa, integrity of sperm cell membrane and acrosome abnormalities). The Blom method, as the method of the staining of the sperm smear with eosin and nigrosine, determines the vitality of the semen. In modern cattle breeding, sexed bull semen (semen from which desired gender of calf will be delivered) is used more and more. The analysis of sexed semen, and especially the comparison of its quality with conventional semen, is an increasingly common requirement on the cattle production market. The aim of the work was to examine the quality of 15 samples of sexed bull semen, originating from imports. The tests included determination of concentration and kinetics using the CASA system, as well as assessment of vitality and morphological characteristics by Blom staining. The average sperm concentration in 15 samples was  $19.61 \times 10^6$ /ml of ejaculate. The total motility was 39.42%, while the number of immobile spermatozoa in the samples was 60.58%. The number of morphologically normal spermatozoa varied from  $2.91 \times 10^6$  to  $6.11 \times 10^6$ , and the percentage of pathological spermatozoa from 8% to 28%. Taking into account the results obtained and the absence of standards

---

related to sexed semen in the currently valid Regulation on the manner of marking of sperm, the manner of keeping records on sperm production, as well as on the conditions that must be met by animal sperm in terms of quality (Official Gazette of the Republic of Serbia, 38/14), it is necessary to carry out more frequent analyzes of sexed semen using the CASA method in order to obtain values that would become an integral part of the Regulation and thereby facilitate the manipulation of sexed semen on the market.

**Keywords:** sexed bull semen, CASA, sperm quality.

## INTRODUCTION

One of the key goals of cattle production is to improve the reproductive parameters of the herd and achieve the maximum exploitation of reproductive capacities. The way to achieve these goals is the implementation of modern biotechnological procedures, as well as methods for controlling and ensuring semen quality.

Computer assisted semen analysis (CASA) is a method of semen analysis that is constantly being developed and improved. It enables an insight into the characteristics of ejaculate quality, important for their fertility, both conventional and sexed semen. CASA is a method that is considered objective and reliable, but relatively expensive, so it is most often used in large centers for artificial insemination, i.e. when producing insemination doses from genetically superior bulls (Maes et al., 2011). CASA uses image analysis, on the basis of which it determines the number and concentration of spermatozoa. The accuracy of this system depends on the optical properties and settings of the instruments and software, but it excludes errors caused by the analyst's subjectivity (Amann and Waberski, 2014; Finelli et al., 2021).

Morphologically intact spermatozoa in the ejaculates of bulls used for artificial insemination should be at least 70% (Menon et al., 2011). Sperm with poor morphology of spermatozoa provide poorer results of artificial insemination, as a result of reduced fertilizing ability of sperm with an increased number of abnormal spermatozoa. Different anomalies of the morphology of spermatozoa, cell membrane and acrosome can be established by histological staining methods. The Blom staining method (eosin-nigrosin staining) is most often used, on the basis of which live and dead, or morphologically changed spermatozoa can be determined (WHO, 2010). The integrity of the acrosomal membrane, which covers 2/3 of the head of the spermatozoa and contains the enzymes necessary for penetration through the oocyte during the fertilization process, is a significant indicator of the fertilizing ability of the spermatozoa. Therefore, good ejaculates

must have more than 51% spermatozoa with a normal acrosome (Vincent et al., 2012). Abnormalities of the acrosome structure can be examined by applying different staining methods and by examining with phase-contrast microscopy (Maes et al., 2011) or flow cytometry (Vincent et al., 2012). Deep freezing can significantly increase the number of live spermatozoa with damaged acrosome (Ugur et al., 2019).

The average speed of bull sperm is about 100  $\mu\text{m}$  per second, or 4-7 mm in 1 minute. At this speed, the sperm reaches the cow's oviducts in two hours. The movement takes place by rotation around the extended axis from left to right, with a frequency of 3 to 15 rotations per second and with 9 tail strikes in the form of waves. The rotation of the head and tail takes place in three dimensions with the simultaneous movement of spermatozoa forward - progressive movement (Miljković and Veselinović, 2005).

Sexed semen means ejaculate that has been separated in a way that it contains spermatozoa that will most likely produce the desired sex of the offspring (Seidel, 2014; Dragin et al., 2016). Limiting factors for the use of sexed semen are the smaller number of spermatozoa in the dose of which there are on average 2 million in sexed semen compared to 20 million in conventional semen. Some authors established a reduction in the conception rate using sexed semen, as a consequence of the low number of spermatozoa in the dose, but also potential physical damage, as well as mistakes during sorting (Frijters et al., 2009).

In addition to the above, the disadvantages of using sexed semen are the high costs of acquiring and maintaining equipment and the necessary qualified workforce. Also, the process that provide a small number of spermatozoa in a dose and a smaller number of doses per unit of time (7-10 doses / hour) is slow, there is a high proportion of sperm with undetermined gender (only 30% of sperm are properly sexed) and, finally, sexed semen has the higher price (Frijters et al., 2009; Seidel, 2014).

The advantages of using sexed semen are achieving the desired sex of the animal in a high percentage. It is stated that the gender ratio in dairy breeds of cattle is 85-90% female versus 10-15% male calves. There are significant potentials for improving the genetic trend in the herd, by selecting parents with the best production potential and obtaining female calves from the best cows in the herd. Also, a reduction in the occurrence of difficult calving and associated reproductive problems was recorded (Seidel, 2014).

Steele et al. (2020) described the analysis of sexed semen using the CASA method ( $n=5$  bulls) which showed significantly reduced percentages of progressive motility of fast and slow spermatozoa compared to conventional semen (25.6% and 4.3% versus 60.8% and 13.3%, respectively). The same author states that the

---

percentage of immobile spermatozoa is significantly increased in sexed semen as it is 64.3% compared to 18.4% of the same class of spermatozoa in conventional semen.

The determined number of spermatozoa per dose of sexed semen is  $2.1 \times 10^6$ . This number is significantly lower than the number of spermatozoa in a conventional dose of bull semen, which is on average about  $20 \times 10^6$ . Holstein heifers, as well as cows, have the same percentage of conception when inseminated with sexed semen of  $2 \times 10^6$  or conventional semen of  $3.5 \times 10^6$  spermatozoa per dose. However, there is an increased percentage of conception when heifers, as well as cows, are inseminated with conventional semen in a dose of  $15 \times 10^6$  spermatozoa (Macedo et al., 2013).

The percentage of immotile spermatozoa in the sexed semen of three Holstein and one Angus bulls immediately after thawing was 33%, 30%, 47% and 50% tested by the CASA method. Three hours later, the percentage of immotile spermatozoa was 53%, 71%, 77% in Holstein bulls and 82% in Angus bull (Brogliatti et al., 2003). The same author states that the percentage of progressively motile spermatozoa immediately after thawing was  $23.1 \pm 4.9\%$ , and after three hours the percentage decreased to  $3.7 \pm 3.2\%$ .

Article 5 of the Regulation on the manner of marking of sperm, the manner of keeping records on sperm production, as well as on the conditions that must be met by animal sperm in terms of quality (Propis, 2014) defines the minimum conditions regarding the quality of bull semen. The mentioned Regulation does not regulate the sexed semen at all, and consequently does not prescribe the conditions for obtaining sexed semen, as well as the quality requirements that must be met by sexed semen at market. The requirements of the modern market, where sexed semen is commercially available, impose the need for regulations that will define the production, trade, as well as the quality and safety conditions of this product.

The aim of this work is to examine the quality of sexed semen of imported bulls using CASA.

## MATERIALS AND METHODS

### **Analysis of sexed semen samples using the CASA and staining of the samples by Blom method**

Fifteen samples of sexed semen, originating from imports, were tested. The tests were performed at the Department of Obstetrics, Sterility and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade.

---

Sperm concentration, motility and speed were determined by Computer assisted semen analysis (CASA). For the purposes of CASA, a sub-sample of 5  $\mu$ l was used, which was applied to chamber beds (Proiser D4C20, Valencia, Spain), 20  $\mu$ m deep, placed on the heating plate of the microscope. After the cessation of passive movement of spermatozoa, imaging was performed on all 7 defined fields of the chamber. The number of analyzed spermatozoa per sample was 1500-5000, or 150-250 spermatozoa per one video. The program is set to analyze 25 images per second, with a 2-second exposure (50 images in total). After image processing, the following parameters were obtained:

- concentration of spermatozoa ( $\times 10^6$  in ml and in dose);
- the percentage of individual classes of spermatozoa according to mobility (progressively mobile, non-progressively mobile and immobile), as well as according to speed (fast, medium speed, slow and static spermatozoa).

Morphological analyzes of semen were carried out in order to determine the relationship between live and dead spermatozoa, findings of intact and damaged acrosomes, protoplasmic droplets, as well as primary, secondary and overall pathological forms of spermatozoa by specific supravital Blom staining method.

### **Determination of the total number of living aerobic microorganisms in deep-frozen bull semen**

The total number of living aerobic microorganisms was determined by the standard method ISO/TR 8607 (ISO, 1991).

### **Statistical data processing**

The normal distribution of the data was tested using the D'Agostino & Pearson normality test. Since the data were normally distributed ( $p > 0.05$ ), the t-test for independent samples was used to compare statistically significant differences between the two groups. Statistical processing of experimental data was performed using GraphPad Prism version 6 software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

## **RESULTS**

The results of testing the concentration and mobility of the tested semen samples determined by the CASA method are shown in Table 1.

---



**Table 1** Parameters of semen concentration and mobility determined by the CASA method

Sample No	Con ( $\times 10^6$ /ml)	Con D ( $\times 10^6$ /dozi)	TM (%)	PM (%)	FS (%)	SS (%)	LM (%)	IM (%)	C (%)
1	15.43	3.85	34.47	28.14	18.50	9.51	6.34	65.53	0.13
2	16.72	4.18	36.14	30.41	10.76	19.65	5.73	63.86	0.00
3	17.81	4.45	40.40	34.80	24.70	10.10	5.60	59.60	0.00
4	21.72	5.43	31.41	22.59	13.14	9.45	8.82	68.59	0.00
5	12.90	3.22	34.85	31.82	24.24	7.58	3.03	65.15	0.00
6	19.75	4.93	45.54	42.57	21.78	20.79	2.97	54.46	0.00
7	15.40	3.85	44.44	38.10	23.17	14.92	6.35	55.56	0.00
8	19.65	4.91	45.51	42.47	21.58	20.59	2.91	54.36	0.00
9	17.30	4.32	41.13	36.27	28.81	7.46	4.86	58.87	0.00
10	20.61	5.15	56.52	52.73	39.29	13.36	3.79	43.48	0.08
11	24.28	6.08	42.42	35.03	18.39	16.51	7.38	57.58	0.13
12	23.46	5.86	35.00	27.02	13.33	13.57	7.98	65.00	0.12
13	21.06	5.25	33.70	25.53	15.97	9.29	8.17	66.30	0.28
14	28.44	7.11	44.23	37.66	22.31	15.13	6.57	55.77	0.23
15	19.59	4.89	25.55	19.36	12.28	7.09	6.19	74.45	0.00

Legend: Con – semen concentration in mL; Con D – semen concentration in dose; TM – total motility; PM – progressive motility; FS – fast spermatozoa; SS – slow spermatozoa; LM – locally motile spermatozoa; IM – immobile; C – circular or spermatozoa that move in a circle;

After the statistical analysis of the sexed semen samples, the following results were obtained: by examining the concentration of spermatozoa in 15 samples of sexed semen, an average concentration of  $19.61 \pm 3.958 \times 10^6$ /ml of ejaculate was determined (Table 2). The lowest determined concentration was  $12.9 \times 10^6$ /ml, and the highest was  $28.44 \times 10^6$ /ml. The lowest concentration of spermatozoa in a dose was  $3.22 \times 10^6$ /dose, and the highest was  $6.08 \times 10^6$ /dose.

**Table 2** Descriptive statistical values of the analysis of parameters of sexed semen - concentration of spermatozoa in mL [ $10^6$ /ml]

Semen concentration	n	$\bar{x}$	SD	SE	X min	X max	CV (%)
	15	19.61	3.958	1.022	12.9	28.44	20.18

By examining sperm motility in 15 samples of sexed semen, a total motility of  $39.42 \pm 7.528\%$  was determined, and the percentage of spermatozoa that were immobile in the samples was  $60.58 \pm 7.528\%$  (Table 3).

**Table 3** Descriptive statistical values of the analysis of sexed semen parameters [%]

Parameter	n	$\bar{x}$	SD	SE	X min	X max	CV (%)
Total motility	15	39.42	7.528	1.944	25.55	56.52	19.10
Progressive motility	15	33.64	8.659	2.236	19.36	52.73	25.74
Fast spermatozoa	15	20.56	7.389	1.908	16.47	24.66	35.93
Slow spermatozoa	15	13.01	4.844	1.251	7.09	20.79	37.23
Local motility	15	5.783	1.927	0.4975	2.97	8.82	33.32
Immobile	15	60.58	7.528	1.944	43.48	74.45	12.43
Circular mobility	15	0.065	0.094	0.0242	0.00	0.28	145.05

Progressive motility varied from 19.36% to 52.73%, and the average values were  $33.64 \pm 8.659\%$ , the percentage of fast spermatozoa in the sample was on average  $20.56 \pm 7.389\%$  (from 10.75% to 39.29%), and the average percentage of slow spermatozoa was  $13.01 \pm 4.844\%$  (from 7.09% to 20.79%). The average percentage of spermatozoa that move in the circle was  $0.065 \pm 0.094\%$ , and the locally moving spermatozoa, i.e., oscillating in place, was on average  $5.783 \pm 1.927\%$ .

The percentage of live spermatozoa ranged from 34% to 60% in the examined samples of sexed semen. The percentage of changes in the head and tail of the spermatozoa ranged from 2% to 12%, and the changes in the middle part of the spermatozoa were less and amounted to 2% to 6%. The number of morphologically normal spermatozoa in sexed semen samples varied from  $2.91 \times 10^6$  to  $6.11 \times 10^6$ , and the percentage of pathological spermatozoa varied from 8% to 28% (Table 4).

**Table 4** Values of cytomorphological parameters of semen, by Blom's method

Sample No	Live/dead %	Changes on head %	Changes in the middle part %	Changes on tail %	Total number of pathological forms %	Number of morphologically normal spermatozoa in dose ( $\times 10^6$ )
1	44 / 56	4	/	4	8	3.55
2	40/60	4	4	8	16	3.51
3	48/52	4	2	8	14	3.83
4	60/40	8	/	4	12	4.78
5	52/48	2	2	6	10	2.91
6	58/42	/	/	12	12	4.35
7	52/48	2	/	6	8	3.39
8	58/42	/	/	12	12	4.32
9	56/44	4	2	8	14	3.73
10	60/40	8	/	12	20	3.50
11	44/56	8	6	8	22	4.61
12	48/52	8	2	6	16	3.55
13	40/60	6	2	2	10	4.73
14	52/48	6	2	6	14	6.11
15	34//66	12	4	12	28	3.53

## DISCUSSION

The determined average number of spermatozoa per dose of sexed semen in our study is  $4.9 \times 10^6$ , which is 57% more than described in study done by Macedo et al. (2013) where it was  $2.1 \times 10^6$ . Brogliatti et al. (2003) observed that the percentage of progressively motile spermatozoa immediately after thawing was  $23.1 \pm 4.9\%$ , and three hours later the percentage was reduced to  $3.7 \pm 3.2\%$ , while in our study progressive motility was  $33.64 \pm 8.659\%$  immediately after sample dissolution. While working on field with sexed semen, Seidel et al. (1997) established that doses for insemination of heifers ranging from  $1 \times 10^6$  to  $2.5 \times 10^6$  spermatozoa gave a satisfactory conception rate, that was between 35% and 48%. Steele et al. (2020) determined that the percentage of progressively moving fast and slow spermatozoa were 25.6% and 4.3%, respectively, while in our study the percentage of fast spermatozoa was  $20.56 \pm 7.389\%$  and slow spermatozoa was  $13.01\% \pm 4.844\%$ . So, in our study, there was a much higher percentage of slow spermatozoa than the above-mentioned author determined. The same author states that the percentage of immobile spermatozoa in sexed semen was 64.3%, which is similar to our results of this parameter of semen quality ( $60.58 \pm 7.528$ ). Contrary to our results, they obtained a much lower percentage of immobile spermatozoa in the sexed semen and it was 33%, 30% and 47% in three Holstein bulls and 50% in an Angus bull.

Based on the Regulation on the manner of marking of sperm, the manner of keeping records on sperm production, as well as on the conditions that must be met by animal sperm in terms of quality (Propis, 2014), which prescribes the fertilizing ability of bull semen after thawing, the progressive motility of spermatozoa should be at least 50%, which is not fulfilled by the fourteen sexed semen samples in our study, so that the percentage of progressive motility in the samples was  $33.64 \pm 8.659$ . Only one sample had progressive mobility greater than 50% (52.73%). Paragraph 2 of the Regulation prescribes that the percentage of morphologically changed spermatozoa should be up to 30%, which all the samples in our study fulfilled and it was amounted less than 28%. Paragraph 4 of the Regulation prescribes that the number of progressively motile and morphologically normal spermatozoa in a dose after thawing should be at least 10 million, which cannot be fulfilled with sexed semen, because their concentration in a dose is from 3.22 to  $7.11 \times 10^6$ , while the number of morphologically normal spermatozoa in sexed semen samples varied from  $2.91 \times 10^6$  to  $6.11 \times 10^6$ . All semen samples were bacteriologically and mycologically negative, which is in

---

accordance with paragraph 5 of the same Regulation, which prescribes that the total number of bacteria in the sample must be up to 500 CFU/mL.

### CONCLUSION

The valid Regulation on the manner of marking of sperm, the manner of keeping records on sperm production, as well as on the conditions that must be met by animal sperm in terms of quality (Official Gazette of the Republic of Serbia, 38/14) does not prescribe quality parameters for sexed semen. Taking into account the trend of increased use of sexed semen by farmers, it is necessary to carry out more frequent analyzes of sexed semen using the CASA method in order to obtain norms that would become an integral part of the Regulation. This would facilitate the manipulation of sexed semen on the market and establish standards for assessing the quality of sexed semen.

### Acknowledgment

The work was supported by the funds of the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Contract number 451-03-68/2022-14/200143).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

### REFERENCES

- Amann R., Waberski D. (2014): Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81:5-17.
- Brogliatti G. M., Barreiro G., Larraburu G., Laborde A. (2003): 10 CASA evaluation of sexed and non-sexed frozen bull semen. *Reproduction Fertility and Development*, 16(2):127-128
- Dragin S., Stančić I., Jotanović S. (2016): Biotehnologija u reprodukciji životinja. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Finelli R., Leisegang K., Tumallapalli S., Henkel R., Agarwal A. (2021): The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Translational Andrology and Urology*, 10(7):3069-3079.
- Frijters A. C, Mullaart E., Roelofs R. M., van Hoorne R. P., Moreno J. F., Moreno O., Merton J. S. (2009): What affects fertility of sexed bull sperm more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology*, 71:64-67.
-

- ISO. (1991): Artificial insemination of animals – Frozen semen of breeding bulls – Enumeration of living aerobic micro-organisms. International organisation for standardisation, ISO/TR 8607.
- Macedo G. G., de Sá Filho M. F., Sala R. V., Mendanha M. F., de Campos Filho E. P., Baruselli P. S. (2013): The Use Of Sex-Sorted Sperm For Reproductive Programs In cattle. In Success in Artificial Insemination – Quality of semen and Diagnostics Employed. Ed. A. Lemma, InTechOpen.
- Maes D., Lopez Rodriguez A., Rijsselaere T., Vyt P., Van Soom A. (2011): Artificial insemination in pigs. In Artificial insemination in farm animals. Ed. M. Manafi, In-TechOpen.
- Menon A. G., Thundathil J. C., Wilde R., Kastelic J. P., Barkema H. W. (2011): Validating the assessment of bull sperm morphology by veterinary practitioners: brief communications. *Canadian Veterinary Journal*, 52:407-408.
- Miljković V., Veselinović S. (2005): Porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje domaćih životinja, VI dopunjeno izdanje. Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
- Propis, (2014): Pravilnik o načinu obeležavanja sperme, načinu vođenja evidencije o proizvodnji sperme, kao i o uslovima koje mora da ispunjava sperma u pogledu kvaliteta. Službeni glasnik Republike Srbije, 38/14.
- Seidel G. E. A. C., Allen H., John L. A., Holland M. D., Brink Z., Welch G. R., Graham J. K., Cattell M. B. (1997): Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 48:1255-1264.
- Seidel Jr G. E. (2014): Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, 1:160-4.
- Steele H., Makri D., Maalouf W. E., Reese S., Kölle S. (2020): Bovine Sperm Sexing Alters Sperm Morphokinetics and Subsequent Early Embryonic Development. *Scientific Reports*, 10(1):6255.
- Thomas J., Locke J., Vishwanath R., Hall J., Ellersieck M., Smith M., Patterson D. (2017): Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology* 98:88-93.
-

- Ugur M. R., Abdelrahman A. S., Evans H. C., Gilmore A. A., Hitit M., Arifiantini R. I., Purwantara B., Kaya A., Memili E. (2019): Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Sciences*, 6:268.
- Vincent P., Underwood S. L., Dolbec C., Bouchard N., Kroetsch T., Blondin P. (2012): Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Animal Reproduction*, 9(3):153-165.
- WHO. (2010): WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5<sup>th</sup> edition, World Health organisation, WHO Press.

Paper received: 14.05.2022.

Paper accepted: 24.08.2022.

---

DOI 10.7251/VETJSR2201101S

UDK 6312.23.4:582.794.1

## Originalni naučni rad

### ANTIHELMINTIČKI POTENCIJAL ETARSKOG ULJA KORIJANDERA (*CORIANDRUM SATIVUM* L.) KOD OVACA

**Filip ŠTRBAC<sup>1\*</sup>, Antonio BOSCO<sup>2</sup>, Kosta PETROVIĆ<sup>1</sup>, Dragica STOJANOVIĆ<sup>1</sup>, Radomir RATAJAC<sup>3</sup>, Nataša SIMIN<sup>4</sup>, Dejan ORČIĆ<sup>4</sup>, Giuseppe CRINGOLI<sup>2</sup>, Laura RINALDI<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Napulju Federiko II, Departman za veterinarsku medicinu i animalnu proizvodnju, Napulj, Italija

<sup>3</sup> Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Srbija

<sup>4</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Novi Sad, Srbija

\*Korespondentni autor: Filip Štrbac, strbac.filip@gmail.com

#### Sažetak

Razvoj antihelmintičke rezistencije kod gastrointestinalnih nematoda ovaca na komercijalne antihelmintike je doveo do ogromnih ekonomskih gubitaka u mnogim delovima sveta. Zbog toga se aktivno traga za novim održivim strategijama za kontrolu ovih parazita, koje uključuju i primenu različitih alternativa poput biljnih etarskih ulja. Cilj ovog istraživanja je bio da se odredi hemijski sastav etarskog ulja korijandera (*Coriandrum sativum* L.) i da se ispita njegov antihelmintički potencijal protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca. Kvalitativna i semikvantitativna hemijska karakterizacija etarskog ulja izvršena je primenom gasne hromatografije kuplovane sa masenospektrometrijskom detekcijom (GC-MS analize). Antihelmintički potencijal etarskog ulja je ispitan pomoću *in vitro* testa izleganja larvi (EHT), koji je sproveden sa osam različitih koncentracija ispitanog ulja (50; 12,5; 3,125; 0,781; 0,195; 0,049; 0,025 i 0,0125 mg/mL). Pri tome je za pozitivnu kontrolu korišćen tiabendazol u koncentracijama 0,025 i 0,0125 mg/mL, a za negativnu emulgator 3% Tween 80 v/v i destilovana voda. GC-MS analizama je otkriven bogat hemijski sastav ispitanog ulja, pri čemu je pronađeno ukupno 17 različitih sastojaka iz različitih hemijskih grupa, od čega je 15 identifikovano. Dominantan sastojak je bio linalool (84,5%) uz  $\gamma$ -terpinen (5,04%), kamfor (3,26%) i  $\alpha$ -pinen (2,88%). Rezultati EHT su pokazali visok antihelmintički potencijal ulja korijandera sa inhibicijom izleganja larvi odnosno

ovicidnim efektom od 29,0-88,7% u zavisnosti od koncentracije, uz dobijenu IC<sub>50</sub> koncentraciju od 0,04 mg/mL i jasan dozno-zavisni efekat ( $R^2=0,90$ ). Ova studija je potvrdila mogući značaj botaničkih antihelmintika u održivoj kontroli nematoda kod životinja i borbi protiv antihelmintičke rezistencije. Dobijeni rezultati ukazuju na moguću ulogu korijandera u budućim terapijskim pristupima infekcijama izazvanih gastrointestinalnim nematoda ovaca, nakon daljih *in vivo* ispitivanja i studija toksičnosti.

**Ključne reči:** gastrointestinalne nematode, antihelmintička rezistencija, etarsko ulje, korijander, gasna hromatografija, test izleganja larvi.

### UVOD

Gastrointestinalne nematode na različite načine dovode do negativnih efekata kod ovaca, od subkliničkih gubitaka na težini i opadanja proizvodnje mleka, mesa i vune, pa sve do pojave anemije, dijareje, anoreksije, gubitaka proteina, smanjenog fertiliteta, a u težim slučajevima dolazi i do uginuća (Giovanelli i sar., 2018; Bosco i sar., 2020; Beleckè i sar., 2021). Kontrola infekcija izazvanih ovim parazitima se i dalje uglavnom gotovo isključivo oslanja na upotrebu komercijalnih antihelmintičkih lekova poput benzimidazola, makrocikličnih laktona i imidazotiazola (Dyary, 2018). Iako su ovi lekovi decenijama uspešno korišćeni u terapiji pomenutih infekcija (Kaplan, 2020), njihova neracionalna upotreba u smislu učestalih i intenzivnih tretmana, visokih ili niskih doza ili uzastopnog korišćenja antihelmintika iz samo jedne klase dovela je do razvoja rezistencije kod gastrointestinalnih nematoda (Bosco i sar., 2018; Pinto i sar., 2019; Beleckè i sar., 2021). Razvoj rezistencije je doveo do opadanja efikasnosti pomenutih lekova i posledičnih velikih ekonomskih gubitaka usled smanjene proizvodnje kod životinja i uginuća, ali i troškova lečenja (Szewc i sar., 2021). Zbog svega navedenog, gastrointestinalne nematode predstavljaju jednu od najvećih prepreka sa kojima se suočava moderno ovčarstvo (Giovanelli i sar., 2018).

Sve veći i izraženiji problem rezistencije zahteva osmišljavanje novih strategija za kontrolu pomenutih parazita, a koje se danas uglavnom baziraju na integrisanom pristupu terapiji (Keeton, 2016). Ovaj pristup podrazumeva sa jedne strane racionalnu upotrebu antihelmintika odnosno ciljane tretmane (tretman samo određenih stada) i ciljane selektivne tretmane (tretman samo pojedinih životinja koje zahtevaju lečenje unutar stada), uz kombinaciju više antihelmintika ili njihovu rotaciju (Calvete i sar., 2020). Sa druge strane i uz racionalno korišćenje komercijalnih preparata, integrisan pristup podrazumeva i uvođenje različitih alternativa poput selekcije genetski rezistentnih životinja, upravljanje pašnjacima,

---



nutritivne manipulacije, biološku kontrolu (upotrebu nematofagnih gljiva ili bakterija), razvoj vakcina kao i upotrebu botaničkih antihelmintika (Zeineldin i sar., 2018; Pinto i sar., 2019). Pri tome, od navedenih alternativa se fitoterapija se s obzirom na pokazane rezultate smatra posebno obećavajućom (Borges i Borges, 2016). Ona podrazumeva upotrebu celih biljaka ili njihovih delova u hrani za životinje, ali i različitih biljnih produkata poput ekstrahata i etarskih ulja.

Etarska ulja predstavljaju aromatične, koncentrovane i složene mešavine isparljivih i nepolarnih jedinjenja izolovanih iz biljnog materijala (Štrbac i sar., 2022a). Prisutna su u specijalizovanim ćelijama ili žlezdama određenih biljaka i imaju ulogu u njihovoj zaštiti od predatora i štetočina, kao i u privlačenju oprašivača (Butnariu i Sarac, 2018). U veterinarskoj medicini, etarska ulja se sve češće koriste u tretmanu i prevenciji različitih oboljenja, iako prevashodno kod monogastričnih životinja poput svinja i živine (Mucha i Witkovska, 2021), ali i kod pasa i mačaka (Štrbac i sar., 2021). Međutim, sve je više dokaza i o antihelmintičkom efektu etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca (Štrbac i sar., 2022b). Njihov biološki efekat potiče od bogatog hemijskog sastava i jedinjenja koja pripadaju različitim grupama poput terpena, terpenoida ili fenilpropanoidnih jedinjenja (Dhifi i sar., 2016, Fokou i sar., 2020).

Korijander (*Coriandrum sativum* L.) predstavlja aromatičnu, zeljastu jednogodišnju biljku iz porodice *Apiaceae* (Chahal i sar., 2017). Ima dugu istoriju korišćenja u kulinarstvu kao izvor aromatičnih jedinjenja sa antibakterijskim, antigljivičnim i antioksidativnim delovanjem, pa je koristan u pripremi hrane kao aroma i pomoćno sredstvo (Mandal i Mandal, 2015). Poznat je i po širokom spektru lekovitih svojstava i koristi se kod različitih gastrointestinalnih tegoba poput anoreksije, dispepsije, nadimanja, dijareje i povraćanja. Plod korijandera je takođe poznat kao rashladno sredstvo, tonik, diuretik i afrodizijak, dok se njegovo etarsko ulje smatra korisnim kod nadimanja, reumatizma i neuralgije, uz poznata antimikrobna, antioksidativna i pesticidna svojstva (Chahal i sar., 2017).

Cilj ovog istraživanja je bio ispitati antihelmintičku aktivnost etarskog ulja korijandera protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca uz određivanje njegovog hemijskog sastava i identifikaciju jedinjenja značajnih za antihelmintičku aktivnost.

## MATERIJALI I METODE

### Analiza hemijskog sastava

Etarsko ulje korijandera je nabavljeno iz Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad. Kvalitativna i semikvantitativna hemijska karakterizacija etarskog ulja izvršena je na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu primenom gasne

---

hromatografije kuplovane sa masenospektrometrijskom detekcijom (GC-MS). U gasni hromatograf (Agilent Technologies series 6890) injektovan je 1 $\mu$ L rastvora ispitivanog ulja (10  $\mu$ L/mL u heksanu) u split modu, uz split odnos 1:10, pri temperaturi od 250°C. Komponente su razdvojene na nepolarnoj poli (tetrametil-1,4-silfenilensiloksanskoj) koloni HP-5 ms (Agilent Technologies) dimenzija 30m $\times$ 0,25mm, debljina sloja 0,25 $\mu$ m. Kolona je eluirana u temperaturno-programiranom režimu, uz startnu temperaturu od 50°C, rampu 8°C/min do 120°C, 15°C/min do 230°C, 20°C/min do 270°C/min, i zadržavanje na finalnoj temperaturi od 16,92 min (ukupno vreme analize 35 min). Kao gas nosač korišćen je helijum visoke čistoće (5.0) u režimu konstantnog protoka od 1,0 mL/min. Efluent je preko transfer-linije održavane na 280°C prosleđen u maseni spektrometar sa elektronskom jonizacijom (Agilent Technologies series 5975). Parametri masenog spektrometra bili su: energija elektrona 70eV, temperatura jonskog izvora 230°C, temperatura kvadrupola 150°C. Primenjen je scan mod akvizicije, u m/z opsegu 35-400, i uz solvent delay od 2,30 min. U cilju postizanja boljeg slaganja između eksperimentalnih i bibliotečkih spektara, korišćen je standard spectra tune. Podaci su obrađeni pomoću Agilent Technologies MSD ChemStation softvera (revizija E01.01.335) u kombinaciji sa AMDIS (ver. 2.64) i NIST MS Search softverom (ver. 2.0d). AMDIS je korišćen za dekonvoluciju masenih spektara koeluirajućih jedinjenja, a NIST MS Search je obezbedio algoritam za bibliotečku pretragu komplementaran PBM algoritmu ChemStation-a. Za identifikaciju masenih spektara korišćene su spektralne biblioteke Wiley Registry of Mass Spectral Data 7 th Edition i NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library 05. Identitet jedinjenja potvrđen je poređenjem linearnih retencionih indeksa sa literaturnim podacima. Relativni udeli jedinjenja određeni su metodom normalizacije, na osnovu površine pikova u TIC.

### Test izleganja larvi

Antihelmintički potencijal etarskog ulja korijandera protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca je ispitan uz pomoć testa izleganja larvi (eng. *egg hatch test*, EHT), koji meri uticaj primene neke supstance na inhibiciju izleganja larvi iz jaja parazita, odnosno ovoidni efekat. Istraživanje je sprovedeno u regionalnom centru za praćenje parazitoza KREMOPAR (Eboli, Salerno, južna Italija). Za izolaciju jaja nematoda su korišćeni uzorci fecesa ovaca uzimani direktno iz rektalne ampule, od ovaca sa dve odvojene farme u ovom regionu, a jaja nematoda su izolovana uz pomoć tako zvane metode oporavka (eng. *recovery method*) (Bosco i sar., 2018).

Uzorci fecesa su najpre homogenizovani i filtrirani pod tekućom vodom kroz sita sa otvorima različitih veličina (1 mm, 250  $\mu$ m, 212  $\mu$ m i 38  $\mu$ m), u cilju odvajanja

jaja iz fecesa. Jaja zadržana na situ najmanje veličine su potom isprana sa destilovanom vodom u epruvete i centrifugovana na 1500 RPM, nakon čega je talog otklonjen. Nakon toga je izvršeno centrifugiranje kako bi jaja koja su isplivala na površinu, bila izolovana u nove epruvete u koje je dodata destilovana voda. Na kraju, dobijeni rastvori su centrifugovani još nekoliko puta kako bi se otklonio debris i dobio vodeni rastvor sa jajima.

Test izleganja larvi je sproveden prema uputstvima iz literature (Ferreira i sar., 2018) uz određene modifikacije. Testirano je 8 različitih koncentracija (50; 12,5; 3,125; 0,781; 0,195; 0,049; 0,025 i 0,0125 mg/mL) ulja korijandera, pri čemu su se koristile ploče sa jažicama. U jažicama su pravljene rastvori navedenih opadajućih koncentracija ulja emulgovanih u 3% Tween-uu 80, v/v, i potom dopunjavane sa dobijenim vodenim rastvorom sa jajima (oko 40 ml odnosno 100-150 jaja po jažici) i destilovanom vodom do ukupne količine od 0,5 mL po jažici. Potrebna količina ulja za najveću koncentraciju je određena računski, a potom su se metodom razblaživanja dobile ostale koncentracije.

Kao pozitivna kontrola je korišćen tiabendazol u koncentraciji 0,025 mg/mL i 0,0125 mg/mL, a kao negativne 3% Tween 80, v/v i destilovana voda. Sve koncentracije ulja i kontrole su ispitane u ukupno tri ponavljanja. Nakon pravljenja pomenutih rastvora, ploča sa jažicama je inkubirana na 27°C tokom 48h, a nakon toga su dodate 1-2 kapi Lugolovog rastvora u svaku jažicu, kako bi se zaustavilo izleganje larvi nematoda iz jaja. Napravljeni rastvori su potom posmatrani pod mikroskopom sa ciljem brojanja jaja i izleglih larvi pri svakoj koncentraciji ulja i kontrola.

### Statistička obrada

Procenat inhibicije izleganja jaja u larveni oblik je računat pomoću sledeće formule (Coles i sar., 1992; Pinto i sar., 2019):

$$IH = \text{broj jaja} / (\text{broj jaja} + \text{broj larvi}) \times 100\%$$

Nakon toga je krajnja vrednost za svaku koncentraciju i kontrole računata kao aritmetička sredina između tri ponavljanja. Za međusobno poređenje dobijenih vrednosti između različitih koncentracija ispitanog ulja, kao i za njihovo poređenje sa kontrolama korišćena je jednofaktorijalna analiza varijanse sa post hoc Takijevim testom ( $p < 0,05$ ). Sa druge strane, za određivanje koncentracije koja inhibiše 50% jaja za razvoj u larveni oblik korišćena je nelinearna regresija i logaritamska distribucija (Ferreira i sar., 2018; Štrbac i sar., 2022a). Statističke analize su rađene u programu GraphPad Prism 8.4.3. (GraphPad Holdings, LLC, San Antonio, CA, USA).

## REZULTATI

### Analiza hemijskog sastava

Rezultati sprovedene hemijske analize sastava uz pomoć gasne hromatografije i masene spektrometrije su pokazale bogat hemijski sastav etarskog ulja korijandera. Ukupan broj jedinjenja je bio 17 od kojih je 15 identifikovano (Tabela 1), iz različitih hemijskih grupa, a dominantna jedinjenja su bila linalool (84,53%),  $\gamma$ -terpinen (5,08%), kamfor (3,26%) i  $\alpha$ -pinen (2,88%).

**Tabela 1** Hemijski sastav etarskog ulja korijandera određen uz pomoć gasne hromatografije i masene spektrometrije

Aritmetički retencijski indeks	Jedinjenje	% Ukupne površine vrha
925	$\alpha$ -Tujon	0,02
932	$\alpha$ -Pinen	2,88
946	Kamfen	0,30
971	Sabinen	0,02
976	$\beta$ -Pinen	0,21
989	Mircen	0,37
1016	$\alpha$ -Terpinen	0,05
1023	p-Cimen	1,08
1027	Limonen	1,12
1029	1,8-Cineol	0,14
1056	$\gamma$ -Terpinen	5,08
1087	Terpinolen	0,30
1100	Linalool	84,53
1143	Kamfor	3,26
1165	<i>Nepoznato</i>	0,12
1176	Terpinen-4-ol	0,27
1191	<i>Nepoznato</i>	0,16

### Test izleganja larvi

Etarsko ulje korijandera je pokazalo visok antihelmintički potencijal protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca sa inhibicijom izleganja larvi (ovicidnom aktivnošću), koja je varirala od 29,0 do 88,7% u zavisnosti od primenjene koncentracije (Tabela 2). Aktivnost je bila visoka (70%) i pri relativnoj niskoj koncentraciji od 0,049 mg/mL, što je rezultiralo i veoma niskoj dobijenoj IC<sub>50</sub> vrednosti od 0,04 mg/mL. Pri svim testiranim koncentracijama, efekat je bio značajno veći (p<0,05) od obe negativne kontrole, dok je pri najvišoj

koncentraciji od 50 mg/mL bio sličan pozitivnoj kontroli ( $p > 0,05$ ). Antihelmintička aktivnost je bila u velikoj meri dozno-zavisna, s obzirom na vrednost  $R^2$  od 0,90.

**Tabela 2** Procentualna efikasnost (aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija) etarskog ulja korijandera protiv izleganja larvi gastrointestinalnih nematoda ovaca pri različitim koncentracijama

Koncentracija [mg/mL]	Inhibicija izleganja larvi (%)
50	88,7 $\pm$ 1,53 <sup>AB</sup>
12,5	85,7 $\pm$ 1,16 <sup>B</sup>
3,125	81,0 $\pm$ 1 <sup>BC</sup>
0,781	77,3 $\pm$ 2,08 <sup>CD</sup>
0,195	76,0 $\pm$ 4,36 <sup>CD</sup>
0,049	70,0 $\pm$ 1 <sup>D</sup>
0,025	36,3 $\pm$ 4,16 <sup>E</sup>
0,0125	29,0 $\pm$ 2 <sup>E</sup>
Tiabendazol, 0,025	96,3 $\pm$ 1,53 <sup>A</sup>
Tiabendazol, 0,0125	95,0 $\pm$ 1 <sup>A</sup>
3% Tween, v/v	14,2 $\pm$ 3,34 <sup>F</sup>
Destilovana H <sub>2</sub> O	6,6 $\pm$ 1,92 <sup>F</sup>

\*Vrednosti sa drugačijim označenim velikim slovima označavaju statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ )

## DISKUSIJA

Usled razvoja i širenja antihelmintičke rezistencije i sve većih posledičnih ekonomskih gubitaka, raste interesovanje za alternativne strategije lečenja nematodnih infekcija kod životinja. U tom kontekstu mnogi istraživači se slažu da bioaktivni sastojci proizvedeni od lekovitog bilja predstavljaju obećavajuću alternativu konvencionalnim antihelmintičkim preparatima, ili važan dodatak u paleti preparata i metoda u integrisanom pristupu kontrole ovih parazita (Macedo i sar., 2010; Borges i Borges, 2016; Zeineldin i sar., 2018). Međutim, pre uvođenja pojedinih biljnih preparata za šire korišćenje u praksi, potrebno je dokazati njihovu efikasnost uz pomoć pouzdanih testova. Pri tome su *in vitro* testovi veoma važni za inicijalnu procenu antihelmintičkog potencijala neke supstance i osnov za njihovu selekciju za dalja *in vivo* ispitivanja i studije toksičnosti (Fonseca i sar., 2013). Test izleganja larvi se smatra pouzdanim i preciznim testom koji je preporučen i naširoko se koristi kako za detekciju antihelmintičke rezistencije kod komercijalnih preparata, tako i za otkrivanje novih antihelmintičkih supstanci poput etarskih ulja (Coles i sar., 1992; André i sar., 2018; Štrbac i sar., 2022b).

Rezultati ovog istraživanja su dokazali antihelmintičku aktivnost etarskog ulja korijandera protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca. Iako nije dostignuta maksimalna efikasnost pri ispitanim koncentracijama, ovoidna aktivnost je bila visoka pri čak šest testiranih koncentracija, odnosno od 0,049 do 50 mg/mL (70,0-88,7%). Zbog toga je  $IC_{50}$  vrednost (parametar koji se često koristi u ovakvim ispitivanjima kao pokazatelj efikasnosti i za poređenje sa drugim rezultatima), bila veoma niska (0,04 mg/mL) što ukazuje na veoma visoku ovoidnu aktivnost ulja korijandera. Ukoliko se ovaj rezultat uporedi sa drugim do sada testiranim uljima (André i sar., 2018; Štrbac i sar., 2022b), zapaža se da je to jedan od najefikasnijih, što govori u prilog visokom antihelmintičkom potencijalu korijandera i pogodnosti za dalja ispitivanja.

Antihelmintički efekat etarskog ulja korijandera protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca je dokazan i u drugim istraživanjima. Dokazan je njegov ovoidni efekat protiv *Haemonchus contortus* od 14,8 - 99,0% pri koncentracijama od 0,15 - 2,5 mg/mL ( $IC_{50}$  0,63 mg/mL) u istraživanju Macedo i sar. (2013). Iako nešto slabiji, u istom istraživanju je dokazan i larvicidni efekat ulja korijandera od 10,1 - 99,5% pri koncentracijama od 1,25-20,0 mg/mL ( $IC_{50}$  2,89 mg/mL), sugerišući na njegovu aktivnost protiv različitih stadijuma parazita. Dokazana je i inhibitorna aktivnost korijandera na pokretljivost larvi različitih vrsta gastrointestinalnih nematoda, najjača protiv *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus vitrinus*, *T. axei* i *H. contortus* sa  $IC_{50}$  vrednostima od 0,11, 0,15, 0,25 i 0,26% (u finalnoj koncentraciji), redom, dok je kod mešane infekcije  $IC_{50}$  vrednost bila 0,22% (Helal i sar., 2020). U našem istraživanju je takođe bila u pitanju mešana infekcija, a koprokultura je ispitana u prethodnom istraživanju gde su korišćene iste farme, sa sledećom ukupnom procentualnom zastupljenošću pojedinih rodova: *Haemonchus* 53%, *Trichostrongylus* 29,5%, *Teladorsagia* 14,5% i *Chabertia* 3% (Štrbac i sar., 2022a). Iz ovih rezultata se može zaključiti da korijander poseduje antihelmintičku efikasnost protiv različitih vrsta gastrointestinalnih nematoda.

Visoka antihelmintička aktivnost ulja korijandera potiče od njegovog hemijskog sastava. Ukoliko se posmatraju rezultati gasne hromatografije i masene spektrometrije, zapaža se prisustvo terpenskih i terpenoidnih jedinjenja iz različitih hemijskih grupa. Ubedljivo najzastupljeniji sastojak je linalool (84,53%), aciklični monoterpenoidni alkohol, a pored njega i ugljovodonični terpeni ( $\gamma$ -terpinen,  $\alpha$ -pinen, limonen i p-cimen), kao i terpenoidni keton kamfor. S obzirom da biološke osobine etarskih ulja u najvećoj meri potiču od njihovog glavnog sastojka (Dhifi i sar., 2016), može se konstatovati da efekat korijandera potiče od linaloola, ali je prisustvo drugih pomenutih jedinjenja bitno za ukupan sinergistički efekat. Visoka ovoidna aktivnost izolovanog linaloola protiv *H. contortus* je dokazana u istraživanju Katiki i sar. (2017) sa  $IC_{50}$  od 0,29 mg/mL, a

linalool je pojedinačno gledano bio glavni sastojak *Arisaema franchetianum* (8,89%) i značajan sastojak *Arisaema lobatum* (6,67%), etarskih ulja sa ogromnim brojem izolovanih jedinjenja (preko 50), a koja su pokazala ovcidnu i larvicidnu aktivnost protiv *H. contortus* (Zhu i sar., 2013). Interesantno, sam izolovan linalool je u ovom istraživanju pokazao slabiju aktivnost u poređenju sa celim uljima, što ukazuje na značaj prisustva drugih jedinjenja i sinergističkog efekta.

Ukoliko se uporede rezultati analize hemijskog sastava etarskog ulja korijandera sa drugim istraživanjima, zapažaju se visoke podudarnosti. Tako su u istraživanju Helal i sar. (2020) glavni sastojci bili linalool (68,03%), kamfor (11,76%),  $\gamma$ -terpinen (10,48%) i  $\alpha$ -pinen (9,71%), dok su u istraživanju Macedo i sar. (2013) bili  $\beta$ -linalool (73,21%), kamfor (4,25%),  $\alpha$ -pinen (4,20%) i terpinen (3,10%). Ukoliko se pogledaju i druga istraživanja, hemijski sastav je takođe sličan uz dominaciju alkohola linalool, geraniol i terpinen-4-ol-a; ugljovodonika  $\gamma$ -terpinena, cimena, limonena i  $\alpha$ -pinena; ketona kamfora, ali i estara geraniol acetata i linalil acetata (Mandal i Mandal, 2015). Iako je hemijski sastav suštinski sličan u različitim istraživanjima, ipak se zapažaju određene razlike, najčešće u procentualnoj zastupljenosti pojedinih jedinjenja. Ove razlike se mogu objasniti različitim faktorima poput mesta uzgoja biljke (padavine, svetlost, zemljište - pH, struktura, salinitet), dela biljke iz koga se ekstrahuje, starosti biljke i samog načina ekstrakcije (Fokou i sar., 2020), a treba imati u vidu da mogu dovesti i do određenih razlika u samoj biološkoj aktivnosti ulja.

Upotreba različitih biljaka i njihovih proizvoda poput etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda, ali i parazita generalno, ima brojne prednosti. Njihov bogat hemijski sastav sa jedinjenjima iz različitih hemijskih grupa i potencijalno različitim mehanizmom delovanja može doprineti visokoj antiparazitskoj aktivnosti, ali i manjoj podložnosti razvoju rezistencije. Sa druge strane, njihovo prirodno poreklo se povezuje sa nižim stepenom toksičnosti za domaćine, manjim količinama rezidua u mesu i mleku, kao i boljoj ekološkoj prihvatljivosti u poređenju sa hemijskim preparatima. Na kraju, veliki broj raspoloživih biljnih vrsta pogoduje širokoj upotrebi botaničkih antihelmintika, lakoj dostupnosti i pogodnoj ceni u državama sa razvijenim biodiverzitetom (Ferreira i sar., 2018; Štrbac i sar., 2022b). Ipak, neophodna su dalja ispitivanja kako bi biljke i njihovi proizvodi našli široku primenu u veterinarskoj medicini.

## ZAKLJUČAK

Razvoj i širenje antihelmintičke rezistencije i sve veći posledični ekonomski gubici zahtevaju potragu za alternativnim sredstvima, gde spadaju i različiti botanički antihelmintici. U ovom istraživanju, etarsko ulje korijandera je pokazalo visok antihelmintički potencijal s obzirom na ovcidni efekat utvrđen kod

gastrointestinalnih nematoda ovaca, zbog čega se može smatrati pogodnim za dalja ispitivanja. Visoka ovicidna aktivnost korijandera potiče od bogatog hemijskog sastava, pre svega linaloola uz još neka jedinjenja poput  $\gamma$ -terpinena, kamfora i  $\alpha$ -pinena. Rezultati ove studije su još jedan pokazatelj moguće uloge fitoterapije u budućim održivim pristupima kontroli gastrointestinalnih nematoda ovaca, smanjenju upotrebe komercijalnih preparata i borbi protiv antihelmintičke rezistencije.

### Zahvalnica

Istraživanje je bilo deo naučno-studijskog boravka pod imenom „*Antihelmintička efikasnost odabranih etarskih ulja protiv gastrointestinalnih nematoda ovaca*“, sufinansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Rešenje broj: 451-03-1183/2021-14.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

### LITERATURA

- André W. P. P., Ribeiro W. L. C., de Oliveira L. M. B., Macedo I. T. F., Rondon F. C. R., Bevilaqua C. M. L. (2018): Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46:1522.
- Belecké A., Kupčinskas T., Stadalienė I., Höglund J., Thamsborg S. M., Stuen, S., Petkevičius S. (2021): Anthelmintic resistance in small ruminants in the Nordic-Baltic region. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63:18.
- Borges D. G. L., Borges F. A. (2016): Plants and their medicinal potential for controlling gastrointestinal nematodes in ruminants. *Nematoda*, 3:e92016.
- Bosco A., Kießler J., Amadesi A., Varady M., Hinney B., Ianniello D., Paola Maurelli M., Cringoli G., Rinaldi L. (2020): The threat of reduced efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in sheep from an area considered anthelmintic resistance-free. *Parasites & Vectors*, 13:457.
- Bosco A., Maurelli M. P., Ianniello D., Morgoglione M. E., Amadesi A., Coles G. C., Cringoli G., Rinaldi L. (2018): The recovery of added nematode eggs from horse and sheep faeces by three methods. *BMC Veterinary Research*, 14:7.
- Butnariu M., Sarac I. (2018): Essential oils from plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*, 1(4):35-43.
- Calvete C., González J. M., Ferrer L. M., Ramos J. J., Lacasta D., Delgado I., Uriarte J. (2020): Assessment of targeted selective treatment criteria to control subclinical gastrointestinal nematode infections on sheep farms. *Veterinary Parasitology*, 277:109018.



- Chahal K. K., Singh R., Kumar A., Bhardwaj U. (2017): Chemical composition and biological activity of *Coriandrum sativum L.*: A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 8(3):193-203.
- Coles G. C., Bauer C., Borgsteede F. H., Geerts S., Klei T. R., Taylor M. A., Waller P. J. (1992): World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44(1-2):35-44.
- Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W. (2016): Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines (Basel)*, 3(4):25.
- Dyary H. O. (2018): Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep in Piramagroon sub-district, Sulaymaniyah/Iraq. *Tropical Biomedicine*, 35(2):373-382.
- Ferreira L. E., Benincasa B. I., Fachin A. L., Contini S. H. T., França S. C., Chagas A. C. S., Belebony R. O. (2018): Essential oils of *Citrus aurantifolia*, *Anthemis nobilis* and *Lavandula officinalis*: In vitro anthelmintic activities against *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors*, 11(1):269.
- Fokou J. B. H., Dongmo P. M. J., Boyom F. F. (2020): Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. In *Essential oils - oils of nature*. Eds. H. El-Shemy, Intechopen, Chapter 2.
- Fonseca Z. A. A. S., Coelho W. A. C., Andre W. P. P., Ribeiro W. L. C., Bessa E. N., Galindo V. R., Pereira J. S., Ahid S. M. M. (2013): Use of herbal medicines in control of gastrointestinal nematodes of small ruminants: Efficacies and prospects. *Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanitary*, 7(2):233-249.
- Giovanelli F., Mattellini M., Fichi G., Flamini G., Perrucci S. (2018). In vitro anthelmintic activity of four plant-derived compounds against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Sciences*, 5(3):78.
- Helal M. A., Abdel-Gawad A. M., Kandil O. M., Khalifa M. M. E., Cave G. W. V., Morrison A. A., Bartley D. J., Elsheikha H. M. (2020): Nematocidal effects of a coriander essential oil and five pure principles on the infective larvae of major ovine gastrointestinal nematodes in vitro. *Pathogens*, 9(9):740.
- Kaplan R. M. (2020): Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1):17-30.
-

- Katiki L. M., Barbieri A. M. E., Araujo R. C., Veríssimo C. J., Louvandini H., Ferreira J. F. S. (2017): Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. *Veterinary Parasitology*, 243:47-51.
- Keeton S. T. N. (2016): Integrated methods for controlling gastrointestinal nematode infections in ewes and lambs. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- Macedo I. T. F., Bevilaqua C. M. I., de Oliveira L. M. B., Camurça-Vasconcelos A. L. F., Vieira L. S., Oliveira F. R., Queiroz-Junior E. M., Tome A. R., Nascimento N. R. F. (2010): Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 173(1-2):93-98.
- Macedo I. T. F., de Oliveira L. M. B., Camurca-Vasconcelos A. L. F., Ribeiro W. L. C., dos Santos J. M. L., de Moraes S. M., de Paula H. C. B., Bevilaqua C. M. L. (2013): In vitro effects of *Coriandrum sativum*, *Tagetes minuta*, *Alpinia zerumbet* and *Lantana camara* essential oils on *Haemonchus contortus*. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 22(4):463-469.
- Mandal S., Mandal M. (2015): Coriander (*Coriandrum sativum L.*) essential oil: Chemistry and biological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(6):421-428.
- Mucha W., Witkowska D. (2021): The applicability of essential oils in different stages of production of animal-based foods. *Molecules*, 26(13):3798.
- Pinto N. B., de Castro L. M., Azambuja R. H. M., Capella G. D. A., de Moura M. Q., Terto W. D., Freitag R. A., Jeske S. T., Villela M. M., Cleff M. B., Leite F. P. L. 2019. Ovicidal and larvicidal potential of *Rosmarinus officinalis* to control gastrointestinal nematodes of sheep. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 28(4):807-811.
- Szewc M., De Waal T., Zintl A. (2021): Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes. *The Veterinary Journal*, 268:105602.
- Štrbac F., Bosco A., Maurelli M. P., Ratajac R., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Pušić I., Krnjajić S., Sotiraki S., Saralli S., Cringoli G., Rinaldi L. (2022a): Anthelmintic properties of essential oils to control gastrointestinal nematodes in sheep - in vitro and in vivo studies. *Veterinary Sciences*, 9(2):93.
- Štrbac F., Bosco A., Rinaldi L., Cringoli C., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Pušić I., Ratajac R. (2022b): The use of essential oils against sheep gastrointestinal nematodes. In *Animal health perspectives*. Eds. R.Z. Abbas, A. Khan, P. Liu, M.K. Saleemi, Unique Scientific Publishers, Chapter 43.
-

- Štrbac F., Petrović K., Stojanović D., Ratajac R. (2021): Possibilities and limitations of the use of essential oils in dogs and cats. *Veterinary Journal of Republic of Srpska (Banja Luka)*, XXI(1-2):238-251.
- Zeineldin M., Abdelmegeid M., Barakat R., Ghanem M. (2018): A review: herbal medicine as an effective therapeutic approach for treating digestive disorders in small ruminants. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 56(1):33-44.
- Zhu L., Dai J., Yang L., Qui J. (2013): Anthelmintic activity of *Arisaema franchetianum* and *Arisaema lobatum* essential oils against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1):311-316.

Rad primljen: 10.05.2022.

Rad prihvaćen: 16.08.2022.

---

DOI 10.7251/VETJEN2201114S

UDK 6312.23.4:582.794.1

**Original Scientific Paper****ANTHELMINTIC POTENTIAL OF CORIANDER ESSENTIAL OIL  
(*CORIANDRUM SATIVUM L.*) IN SHEEP****Filip ŠTRBAC<sup>1\*</sup>, Antonio BOSCO<sup>2</sup>, Kosta PETROVIĆ<sup>1</sup>, Dragica STOJANOVIĆ<sup>1</sup>, Radomir RATAJAC<sup>3</sup>, Nataša SIMIN<sup>4</sup>, Dejan ORČIĆ<sup>4</sup>, Giuseppe CRINGOLI<sup>2</sup>, Laura RINALDI<sup>2</sup>**<sup>1</sup> University in Novi Sad, Agricultural Faculty, Department for Veterinary Medicine, Novi Sad, Serbia<sup>2</sup> University of Naples “Federico II“, Department of Veterinary Medicine and Animal Production, Naples, Italy<sup>3</sup> Scientific Veterinary Institute “Novi Sad“, Novi Sad, Serbia<sup>4</sup> University in Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Novi Sad, Serbia

\*Corresponding author: Filip Štrbac, strbac.filip@gmail.com

**Summary**

The development of anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes to commercial anthelmintics has led to enormous economic losses in many parts of the world. For this reason, new sustainable strategies for the control of these parasites are being actively searched, which include the use of different alternatives such as plant essential oils. The aim of this study was to determine the chemical composition of the essential oil of coriander (*Coriandrum sativum L.*) and to test its anthelmintic potential against gastrointestinal nematodes of sheep. Qualitative and semi-quantitative chemical characterization of the essential oil was performed using gas chromatography coupled with mass spectrometric detection (GC-MS analysis). The anthelmintic potential of the essential oil was tested using the *in vitro* egg hatching test (EHT), which was carried out with eight different concentrations of the tested oil (50; 12.5; 3.125; 0.781; 0.195; 0.049; 0.025 and 0.0125 mg/mL). Thiabendazole in concentrations of 0.025 and 0.0125 mg/mL was used as the positive control, and the emulsifier 3% Tween 80 v/v and distilled water was used as the negative control. GC-MS analyzes revealed a rich chemical composition of the tested oil, where a total of 17 different ingredients from different chemical groups were found, of which 15 were identified. The dominant ingredient was linalool (84.5%) along with  $\gamma$ -terpinene (5.04%), camphor (3.26%) and  $\alpha$ -pinene (2.88%). The EHT results showed a high

anthelmintic potential of coriander oil with inhibition of larval hatching, i.e. an ovicidal effect of 29.0-88.7% depending on the concentration, with an IC<sub>50</sub> concentration of 0.04 mg/mL and a clear dose-dependent effect ( $R^2 = 0.90$ ). This study confirmed the possible importance of botanical anthelmintics in the sustainable control of nematodes in animals and the fight against anthelmintic resistance. The obtained results indicate a possible role of coriander in future therapeutic approaches to infections caused by gastrointestinal nematodes of sheep, after further *in vivo* tests and toxicity studies.

**Keywords:** gastrointestinal nematodes, anthelmintic resistance, essential oil, coriander, gas chromatography, larval hatching test.

## INTRODUCTION

Gastrointestinal nematodes lead to negative effects in sheep in various ways, from subclinical weight loss and decreased production of milk, meat and wool, to the appearance of anemia, diarrhea, anorexia, protein losses, reduced fertility, and in severe cases, even death (Giovanelli et al., 2018; Bosco et al., 2020; Beleckè et al., 2021). Control of infections caused by these parasites still mostly relies almost exclusively on the use of commercial anthelmintic drugs such as benzimidazoles, macrocyclic lactones and imidazothiazoles (Dyary, 2018). Although these drugs have been successfully used for decades in the therapy of the mentioned infections (Kaplan, 2020), their irrational use in terms of frequent and intensive treatments, high or low doses or consecutive use of anthelmintics from only one class led to the development of resistance in gastrointestinal nematodes (Bosco and et al., 2018; Pinto et al., 2019; Beleckè et al., 2021). The development of resistance has led to a decline in the effectiveness of the mentioned drugs and consequent large economic losses due to reduced production in animals and deaths, as well as treatment costs (Szewc et al., 2021). Due to all of the above, gastrointestinal nematodes represent one of the biggest obstacles facing modern sheep farming (Giovanelli et al., 2018).

The growing and more pronounced problem of resistance requires the design of new strategies for the control of the mentioned parasites, which today are mainly based on an integrated approach to therapy (Keeton, 2016). This approach implies, on the one hand, the rational use of anthelmintics, i.e. targeted treatments (treatment of only certain herds) and targeted selective treatments (treatment of only certain animals that require treatment within the herd), with a combination of several anthelmintics or their rotation (Calvete et al., 2020). On the other hand, along with the rational use of commercial preparations, an integrated approach implies the introduction of various alternatives such as the selection of genetically

---

resistant animals, pasture management, nutritional manipulation, biological control (use of nematophagous fungi or bacteria), development of vaccines as well as the use of botanical anthelmintics (Zeineldin et al., 2018; Pinto et al., 2019). At the same time, among the listed alternatives, phytotherapy is considered particularly promising in view of the obtained results (Borges and Borges, 2016). It implies the use of whole plants or their parts in animal feed, but also different plant products such as extracts and essential oils.

Essential oils represent aromatic, concentrated and complex mixtures of volatile and non-polar compounds isolated from plant material (Štrbac et al., 2022a). They are present in specialized cells or glands of certain plants and play a role in protecting them from predators and vermin, as well as in attracting pollinators (Butnariu and Sarac, 2018). In veterinary medicine, essential oils are increasingly used in the treatment and prevention of various diseases, although primarily in monogastric animals such as pigs and poultry (Mucha and Witkovska, 2021), but also in dogs and cats (Štrbac et al., 2021). However, there is more and more evidence about the anthelmintic effect of essential oils against gastrointestinal nematodes of sheep (Štrbac et al., 2022b). Their biological effect originates from their rich chemical composition and compounds belonging to different groups such as terpenes, terpenoids or phenylpropanoid compounds (Dhifi et al., 2016, Fokou et al., 2020).

Coriander (*Coriandrum sativum L.*) is an aromatic, herbaceous annual plant from the *Apiaceae* family (Chahal et al., 2017). It has a long history of use in cooking as a source of aromatic compounds with antibacterial, antifungal and antioxidant activity, so it is useful in food preparation as an aroma and auxiliary agent (Mandal and Mandal, 2015). It is also known for its wide range of medicinal properties and is used for various gastrointestinal disorders such as anorexia, dyspepsia, flatulence, diarrhea and vomiting. Coriander fruit is also known as a cooling agent, tonic, diuretic and aphrodisiac, while its essential oil is considered useful in flatulence, rheumatism and neuralgia, with known antimicrobial, antioxidant and pesticidal properties (Chahal et al., 2017).

The aim of this study was to examine the anthelmintic activity of coriander essential oil against gastrointestinal nematodes of sheep, with the determination of its chemical composition and the identification of compounds significant for anthelmintic activity.

---

## MATERIALS AND METHODS

### Analysis of chemical composition

Coriander essential oil was purchased from the Institute of Field and Vegetable Crops in Novi Sad. Qualitative and semi-quantitative chemical characterization of the essential oil was performed at the Faculty of Science in Novi Sad using gas chromatography coupled with mass spectrometric detection (GC-MS). In the gas chromatograph (Agilent Technologies series 6890), 1  $\mu$ L of the solution of the tested oil (10  $\mu$ L/mL in hexane) was injected in split mode, with a split ratio of 1:10, at a temperature of 250°C. The components were separated on a non-polar poly (tetramethyl-1,4-silphenylenesiloxane) column HP-5 ms (Agilent Technologies) with dimensions 30m $\times$ 0.25mm, layer thickness 0.25 $\mu$ m. The column was eluted in a temperature-programmed regime, with a starting temperature of 50°C, ramp 8°C/min to 120°C, 15°C/min to 230°C, 20°C/min to 270°C/min, and retention at the final temperature of 16.92 min (total analysis time 35 min). High-purity helium (5.0) was used as carrier gas in a constant flow regime of 1.0 mL/min. The effluent was sent via a transfer line maintained at 280°C to a mass spectrometer with electron ionization (Agilent Technologies series 5975). The mass spectrometer parameters were: electron energy 70eV, ion source temperature 230°C, quadrupole temperature 150°C. Scan acquisition mode was applied, in the m/z range 35-400, and with a solvent delay of 2.30 min. In order to achieve a better agreement between the experimental and library spectra, the standard spectra tune was used. Data were processed using Agilent Technologies MSD ChemStation software (revision E01.01.335) in combination with AMDIS (ver. 2.64) and NIST MS Search software (ver. 2.0d). AMDIS was used for deconvolution of mass spectra of coeluting compounds, and NIST MS Search provided a library search algorithm complementary to ChemStation's PBM algorithm. Wiley Registry of Mass Spectral Data 7<sup>th</sup> Edition and NIST/EPA/NIH Mass spectral Spectral Library 05 libraries were used to identify mass spectra. The identity of the compound was confirmed by comparing the linear retention indices with literature data. The relative proportions of the compounds were determined by the normalization method, based on the area of the peaks in TIC.

### Larval hatching test

The anthelmintic potential of coriander essential oil against gastrointestinal nematodes of sheep was tested using the egg hatch test (EHT), which measures the effect of the application of a substance on the inhibition of hatching of larvae from parasite eggs, i.e. the ovicidal effect. The study was conducted in the regional center for monitoring parasitosis KREMOPAR (Eboli, Salerno, southern

Italy). For the isolation of nematode eggs, samples of sheep feces taken directly from the rectal ampoule, from sheep from two separate farms in this region, were used, and the nematode eggs were isolated using the so-called recovery method (Bosco et al., 2018).

Initially, feces samples were homogenized and filtered under flowing water through sieves with openings of different sizes (1 mm, 250  $\mu\text{m}$ , 212  $\mu\text{m}$  and 38  $\mu\text{m}$ ), in order to separate eggs from feces. The eggs retained on the sieve of the smallest size were then washed with distilled water into test tubes and centrifuged at 1500 RPM, after which the precipitate was removed. After that, centrifugation was performed so that the eggs that floated to the surface were isolated in new test tubes to which distilled water was added. Finally, the obtained solutions were centrifuged several more times to remove debris and obtain an aqueous solution with eggs.

The larval hatching test was conducted according to the instructions from the literature (Ferreira et al., 2018) with certain modifications. Eight different concentrations (50; 12.5; 3.125; 0.781; 0.195; 0.049; 0.025 and 0.0125 mg/mL) of coriander oil were tested using well plates. In the wells, solutions of the mentioned decreasing concentrations of oils emulsified in 3% Tween-uu 80, v/v, were made, and then supplemented with the obtained aqueous solution with eggs (about 40 ml, i.e. 100-150 eggs per well) and distilled water to a total amount of 0.5 mL per well.

The required amount of oil for the highest concentration was determined by calculation, and then the other concentrations were obtained using the dilution method.

Thiabendazole in concentrations of 0.025 mg/mL and 0.0125 mg/mL was used as a positive control, and 3% Tween 80, v/v and distilled water were used as negative controls. All oil concentrations and controls were tested in a total of three replicates. After making the mentioned solutions, the plate with wells was incubated at 27°C for 48 hours, and after that 1-2 drops of Lugol's solution were added to each well, in order to stop the hatching of nematode larvae from the eggs. The prepared solutions were then observed under a microscope with the aim of counting eggs and hatched larvae at each concentration of oil and controls.

### Statistical processing

The percentage of inhibition of egg hatching into the larval form was calculated using the following formula (Coles et al., 1992; Pinto et al., 2019):

$$\text{IH} = \text{number of eggs} / (\text{number of eggs} + \text{number of larvae}) \times 100\%$$

After that, the final value for each concentration and control was calculated as the arithmetic mean between three repetitions. One-factor analysis of variance with

---



post hoc Tukey test ( $p < 0.05$ ) was used to compare the obtained values between different concentrations of the tested oil, as well as to compare them with the controls. On the other hand, nonlinear regression and logarithmic distribution were used to determine the concentration that inhibits 50% of eggs from developing into larval form (Ferreira et al., 2018; Štrbac et al., 2022a). Statistical analyzes were performed in the GraphPad Prism 8.4.3 program (GraphPad Holdings, LLC, San Antonio, CA, USA).

## RESULTS

### Analysis of chemical composition

The results of the chemical analysis of the composition obtained by gas chromatography and mass spectrometry showed a rich chemical composition of coriander essential oil. The total number of compounds was 17, of which 15 were identified (Table 1), from different chemical groups, and the dominant compounds were linalool (84.53%),  $\gamma$ -terpinene (5.08%), camphor (3.26%) ) and  $\alpha$ -pinene (2.88%).

**Table 1.** Chemical composition of coriander essential oil determined by gas chromatography and mass spectrometry

Arithmetic retention index	Compound	% Total peak area
925	$\alpha$ -Thujone	0.02
932	$\alpha$ -Pinene	2.88
946	Camphene	0.30
971	Sabinene	0.02
976	$\beta$ -Pinene	0.21
989	Myrecene	0.37
1016	$\alpha$ -Terpinene	0.05
1023	p-Cymene	1.08
1027	Limonene	1.12
1029	1,8-Cineol	0.14
1056	$\gamma$ -Terpinene	5.08
1087	Terpinolene	0.30
1100	Linalool	84.53
1143	Camphor	3.26
1165	Unknown	0.12
1176	Terpinen-4-ol	0.27
1191	Unknown	0.16

### Larval hatching test

Coriander essential oil showed high anthelmintic potential against gastrointestinal nematodes of sheep with inhibition of larval hatching (ovicidal activity), which varied from 29.0 to 88.7% depending on the applied concentration (Table 2). The activity was high (70%) even at a relatively low concentration of 0.049 mg/mL, which resulted in a very low obtained IC<sub>50</sub> value of 0.04 mg/mL. At all tested concentrations, the effect was significantly greater ( $p < 0.05$ ) than both negative controls, while at the highest concentration of 50 mg/mL it was similar to the positive control ( $p > 0.05$ ). Anthelmintic activity was largely dose-dependent, with an R<sup>2</sup> value of 0.90.

**Table 2.** Percentage efficiency (arithmetic mean  $\pm$  standard deviation) of coriander essential oil against the hatching of sheep gastrointestinal nematode larvae at different concentrations

Concentration [mg/mL]	Inhibition of larval hatching (%)
50	88.7 $\pm$ 1.53 <sup>AB</sup>
12.5	85.7 $\pm$ 1.16 <sup>B</sup>
3.125	81.0 $\pm$ 1 <sup>BC</sup>
0.781	77.3 $\pm$ 2.08 <sup>CD</sup>
0.195	76.0 $\pm$ 4.36 <sup>CD</sup>
0.049	70.0 $\pm$ 1 <sup>D</sup>
0.025	36.3 $\pm$ 4.16 <sup>E</sup>
0.0125	29.0 $\pm$ 2 <sup>E</sup>
Thiabendazole, 0.025	96.3 $\pm$ 1.53 <sup>A</sup>
Thiabendazole, 0.0125	95.0 $\pm$ 1 <sup>A</sup>
3% Tween, v/v	14.2 $\pm$ 3.34 <sup>F</sup>
Distilled H <sub>2</sub> O	6.6 $\pm$ 1.92 <sup>F</sup>

\* Values with different capital letters indicate a statistically significant difference ( $p < 0.05$ )

### DISCUSSION

Due to the development and spread of anthelmintic resistance and the increasing consequent economic losses, there is a growing interest in alternative strategies for the treatment of nematode infections in animals. In this context, many researchers agree that bioactive ingredients produced from medicinal plants represent a promising alternative to conventional anthelmintic preparations, or an important addition to the range of preparations and methods in an integrated approach to the control of these parasites (Macedo et al., 2010; Borges and Borges, 2016; Zeineldin et al., 2018). However, before the introduction of individual herbal preparations for wider use in practice, it is necessary to prove

their effectiveness with the assistance of reliable tests. At the same time, *in vitro* tests are very important for the initial assessment of the anthelmintic potential of a substance and the basis for their selection for further *in vivo* tests and toxicity studies (Fonseca et al., 2013). The larval hatching test is considered a reliable and precise test that is recommended and widely used both for the detection of anthelmintic resistance in commercial preparations and for the discovery of new anthelmintic substances such as essential oils (Coles et al., 1992; André et al., 2018; Štrbac et al., 2022b).

The results of this study proved the anthelmintic activity of coriander essential oil against gastrointestinal nematodes of sheep. Although maximum efficiency was not reached at the tested concentrations, ovicidal activity was high at even six tested concentrations, i.e. from 0.049 to 50 mg/mL (70.0-88.7%). Due to that, the IC<sub>50</sub> value (a parameter that is often used in such tests as an indicator of efficiency and for comparison with other results) was very low (0.04 mg/mL), which indicates a very high ovicidal activity of coriander oil. If this result is compared with other oils tested so far (André et al., 2018; Štrbac et al., 2022b), it can be observed that it is one of the most effective, which indicate the high anthelmintic potential of coriander and its convenience for further tests.

The anthelmintic effect of coriander essential oil against gastrointestinal nematodes of sheep has been proven in other studies. Its ovicidal effect against *Haemonchus contortus* of 14.8 - 99.0% at concentrations of 0.15 - 2.5 mg/mL (IC<sub>50</sub> 0.63 mg/mL) was proven in a study by Macedo et al. (2013). Although not so strong, in the same study, the larvicidal effect of coriander oil was also proven to be 10.1 - 99.5% at concentrations of 1.25-20.0 mg/mL (IC<sub>50</sub> 2.89 mg/mL), suggesting its activity against different stages of parasites. The inhibitory activity of coriander on the motility of larvae of different types of gastrointestinal nematodes was also proven, the strongest against *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus vitrinus*, *T. axei* and *H. contortus* with IC<sub>50</sub> values of 0.11, 0.15, 0.25 and 0.26% (in the final concentration), respectively, while in mixed infection the IC<sub>50</sub> value was 0.22% (Helal et al., 2020). In our study, we also used mixed infection, and coproculture was examined in a previous study where the same farms were used, with the following percentage of individual genera: *Haemonchus* 53%, *Trichostrongylus* 29.5%, *Teladorsagia* 14.5% and *Chabertia* 3 % (Štrbac et al., 2022a). From these results, it can be concluded that coriander has anthelmintic efficacy against various types of gastrointestinal nematodes.

If the results of gas chromatography and mass spectrometry are observed, the presence of terpene and terpenoid compounds from different chemical groups is observed. By far the most abundant ingredient is linalool (84.53%), an acyclic monoterpenoid alcohol, and next to it, hydrocarbon terpenes ( $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -

pinene, limonene and p-cymene), as well as the terpenoid ketone camphor. Given that the biological properties of essential oils derive to the greatest extent from their main ingredient (Dhifi et al., 2016), it can be concluded that the effect of coriander originates from linalool, but the presence of other mentioned compounds is essential for the overall synergistic effect. High ovicidal activity of isolated linalool against *H. contortus* was demonstrated in the study done by Katiki et al. (2017) with an  $IC_{50}$  of 0.29 mg/mL, and linalool individually was the main constituent of *Arisaema franchetianum* (8.89%) and a significant constituent of *Arisaema lobatum* (6.67%), essential oils with a huge number of isolated compounds (over 50), which showed ovicidal and larvicidal activity against *H. contortus* (Zhu et al., 2013). Interestingly, isolated linalool alone showed a weaker activity in this study compared to whole oils, which indicates the importance of the presence of other compounds and the synergistic effect.

If the results of the analysis of the chemical composition of coriander essential oil are compared with other researches, a high level of agreement is observed. Thus, in the research done by Helal et al. (2020) the main ingredients were linalool (68.03%), camphor (11.76%),  $\gamma$ -terpinene (10.48%) and  $\alpha$ -pinene (9.71%), while in the research done by Macedo et al. (2013) the main ingredients were  $\beta$ -linalool (73.21%), camphor (4.25%),  $\alpha$ -pinene (4.20%) and terpinene (3.10%). In other studies, the chemical composition is also similar with the dominance of alcohol linalool, geraniol and terpinen-4-ol; hydrocarbons  $\gamma$ -terpinene, cymene, limonene and  $\alpha$ -pinene; camphor ketone, but also esters of geraniol acetate and linalyl acetate (Mandal and Mandal, 2015). Although the chemical composition is similar in different studies, certain differences are still observed, most often in the percentage of individual compounds. These differences can be explained by various factors such as the place where the plant is grown (rainfall, light, soil - pH, structure, salinity), the part of the plant from which it is extracted, the age of the plant and the method of extraction itself (Fokou et al., 2020). Those factors can lead to certain differences in the biological activity of the oil itself.

The use of different plants and their products, such as essential oils, against gastrointestinal nematodes, but also parasites in general, has numerous advantages. Their rich chemical composition with compounds from different chemical groups and potentially different mechanisms of action can contribute to a high antiparasitic activity, but also to a lower susceptibility to the development of resistance. On the other hand, their natural origin is associated with a lower degree of toxicity for hosts, smaller amounts of residues in meat and milk, as well as better environmental acceptability compared to chemical preparations. Finally, the large number of available plant species favors the wide use of botanical anthelmintics, easy availability and favorable price in countries with developed

---

biodiversity (Ferreira et al., 2018; Štrbac et al., 2022b). However, further tests are necessary in order for plants and their products to be widely used in veterinary medicine.

## CONCLUSION

The development and spread of anthelmintic resistance and the increasing consequent economic losses require the search for alternative tools, which include various botanical anthelmintics. In this study, coriander essential oil showed a high anthelmintic potential with regard to the ovicidal effect found in sheep gastrointestinal nematodes, which is why it can be considered suitable for further tests. Coriander's high ovicidal activity originates from its rich chemical composition, primarily linalool along with other compounds such as  $\gamma$ -terpinene, camphor and  $\alpha$ -pinene. The results of this study indicate the possible role of phytotherapy in future sustainable approaches to the control of gastrointestinal nematodes in sheep, reducing the use of commercial preparations and anthelmintic resistance.

## Acknowledgment

The research was part of a scientific-academic work entitled "*Anthelmintic efficacy of selected essential oils against gastrointestinal nematodes of sheep*", co-financed by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, No: 451-03-1183/2021-14.

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

## REFERENCES

- André W. P. P., Ribeiro W. L. C., de Oliveira L. M. B., Macedo I. T. F., Rondon F. C. R., Bevilaqua C. M. L. (2018): Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46:1522.
- Belecké A., Kupčinskas T., Stadalienė I., Höglund J., Thamsborg S. M., Stuenkel S., Petkevicius S. (2021): Anthelmintic resistance in small ruminants in the Nordic-Baltic region. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63:18.
- Borges D. G. L., Borges F. A. (2016): Plants and their medicinal potential for controlling gastrointestinal nematodes in ruminants. *Nematoda*, 3:e92016.
- Bosco A., Kießler J., Amadesi A., Varady M., Hinney B., Ianniello D., Paola Maurelli M., Cringoli G., Rinaldi L. (2020): The threat of reduced efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in sheep from an area considered anthelmintic resistance-free. *Parasites & Vectors*, 13:457.
-

- Bosco A., Maurelli M. P., Ianniello D., Morgoglione M. E., Amadesi A., Coles G. C., Cringoli G., Rinaldi L. (2018): The recovery of added nematode eggs from horse and sheep faeces by three methods. *BMC Veterinary Research*, 14:7.
- Butnariu M., Sarac I. (2018): Essential oils from plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*, 1(4):35-43.
- Calvete C., González J. M., Ferrer L. M., Ramos J. J., Lacasta D., Delgado I., Uriarte J. (2020): Assessment of targeted selective treatment criteria to control subclinical gastrointestinal nematode infections on sheep farms. *Veterinary Parasitology*, 277:109018.
- Chahal K. K., Singh R., Kumar A., Bhardwaj U. (2017): Chemical composition and biological activity of *Coriandrum sativum L.*: A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 8(3):193-203.
- Coles G. C., Bauer C., Borgsteede F. H., Geerts S., Klei T. R., Taylor M. A., Waller P. J. (1992): World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44(1-2):35-44.
- Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W. (2016): Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines (Basel)*, 3(4):25.
- Dyary H. O. (2018): Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep in Piraagroon sub-district, Sulaymaniyah/Iraq. *Tropical Biomedicine*, 35(2):373-382.
- Ferreira L. E., Benincasa B. I., Fachin A. L., Contini S. H. T., França S. C., Chagas A. C. S., Belebani R. O. (2018): Essential oils of *Citrus aurantifolia*, *Anthemis nobile* and *Lavandula officinalis*: In vitro anthelmintic activities against *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors*, 11(1):269.
- Fokou J. B. H., Dongmo P. M. J., Boyom F. F. (2020): Essential oil's chemical composition and pharmacological properties. In *Essential oils - oils of nature*. Eds. H. El-Shemy, Intechopen, Chapter 2.
- Fonseca Z. A. A. S., Coelho W. A. C., Andre W. P. P., Ribeiro W. L. C., Bessa E. N., Galindo V. R., Pereira J. S., Ahid S. M. M. (2013): Use of herbal medicines in control of gastrointestinal nematodes of small ruminants: Efficacies and prospects. *Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanitary*, 7(2):233-249.
- Giovanelli F., Mattellini M., Fichi G., Flamini G., Perrucci S. (2018). In vitro anthelmintic activity of four plant-derived compounds against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Sciences*, 5(3):78.
-

- Helal M. A., Abdel-Gawad A. M., Kandil O. M., Khalifa M. M. E., Cave G. W. V., Morrison A. A., Bartley D. J., Elsheikha H. M. (2020): Nematocidal effects of a coriander essential oil and five pure principles on the infective larvae of major ovine gastrointestinal nematodes in vitro. *Pathogens*, 9(9):740.
- Kaplan R. M. (2020): Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 36(1):17-30.
- Katiki L. M., Barbieri A. M. E., Araujo R. C., Veríssimo C. J., Louvandini H., Ferreira J. F. S. (2017): Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. *Veterinary Parasitology*, 243:47-51.
- Keeton S. T. N. (2016): Integrated methods for controlling gastrointestinal nematode infections in ewes and lambs. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.
- Macedo I. T. F., Bevilaqua C. M. I., de Oliveira L. M. B., Camurça-Vasconcelos A. L. F., Vieira L. S., Oliveira F. R., Queiroz-Junior E. M., Tome A. R., Nascimento N. R. F. (2010): Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 173(1-2):93-98.
- Macedo I. T. F., de Oliveira L. M. B., Camurça-Vasconcelos A. L. F., Ribeiro W. L. C., dos Santos J. M. L., de Moraes S. M., de Paula H. C. B., Bevilaqua C. M. L. (2013): In vitro effects of *Coriandrum sativum*, *Tagetes minuta*, *Alpinia zerumbet* and *Lantana camara* essential oils on *Haemonchus contortus*. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 22(4):463-469.
- Mandal S., Mandal M. (2015): Coriander (*Coriandrum sativum L.*) essential oil: Chemistry and biological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(6):421-428.
- Mucha W., Witkowska D. (2021): The applicability of essential oils in different stages of production of animal-based foods. *Molecules*, 26(13):3798.
- Pinto N. B., de Castro L. M., Azambuja R. H. M., Capella G. D. A., de Moura M. Q., Terto W. D., Freitag R. A., Jeske S. T., Villela M. M., Cleff M. B., Leite F. P. L. 2019. Ovicidal and larvicidal potential of *Rosmarinus officinalis* to control gastrointestinal nematodes of sheep. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 28(4):807-811.
- Szewc M., De Waal T., Zintl A. (2021): Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes. *The Veterinary Journal*, 268:105602.
- Štrbac F., Bosco A., Maurelli M. P., Ratajac R., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Pušić I., Krnjajić S., Sotiraki S., Saralli S., Cringoli G., Rinaldi L. (2022a): Anthelmintic properties of essential oils to control gastrointestinal
-

nematodes in sheep - in vitro and in vivo studies. *Veterinary Sciences*, 9(2):93.

Štrbac F., Bosco A., Rinaldi L., Cringoli C., Stojanović D., Simin N., Orčić D., Pušić I., Ratajac R. (2022b): The use of essential oils against sheep gastrointestinal nematodes. In *Animal health perspectives*. Eds. R.Z. Abbas, A. Khan, P. Liu, M.K. Saleemi, Unique Scientific Publishers, Chapter 43.

Štrbac F., Petrović K., Stojanović D., Ratajac R. (2021): Possibilities and limitations of the use of essential oils in dogs and cats. *Veterinary Journal of Republic of Srpska (Banja Luka)*, XXI(1-2):238-251.

Zeineldin M., Abdelmegeid M., Barakat R., Ghanem M. (2018): A review: herbal medicine as an effective therapeutic approach for treating digestive disorders in small ruminants. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 56(1):33-44.

Zhu L., Dai J., Yang L., Qui J. (2013): Anthelmintic activity of *Arisaema franchetianum* and *Arisaema lobatum* essential oils against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1):311-316.

Paper received: 10.05.2022.

Paper accepted: 16.08.2022.

---



DOI 10.7251/VETJSR2201127S

UDK 616.681-007.4-08:636.7

Originalni naučni rad

## KRIPTORHIZAM KOD PASA

Jovan SPASOJEVIĆ\*, Ivan GALIĆ, Bojan TOHOLJ, Ivan STANČIĆ,  
Sandra NIKOLIĆ, Ivana DAVIDOV, Tijana KUKURIC, Nenad POPOVIĆ

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku  
medicinu, Novi Sad, Republika Srbija

\*Korespondentni autor: Jovan Spasojević, jovan.spasojevic1984@yahoo.com

### Sažetak

Kriptorhizam predstavlja oboljenje koje se manifestuje zaostajanjem testisa sa pripadajućim anatomskim strukturama unutar abdomena ili ingvinalnog kanala. Kod pasa, pojava kriptorhizma je nerazjašnjene etiologije, ali se smatra da za nastanak ima genetsku osnovu. „Zlatni standard“ u dijagnostici ovog oboljenja predstavlja ultrazvučna dijagnostika sa osetljivošću 95-100%.

Istraživanje je sprovedeno na 10 pasa. Klinički pregled pasa suspektnih na kriptorhizam je inicijalno izveden metodama adspekcije i palpacije, nakon čega je pristupano ultrazvučnom pregledu radi identifikacije i lokalizacije zaostalih testisa. Kod svih pasa izvršeno je hirurško odstranjivanje kako zaostalih, tako i fiziološki spuštenih testisa. Na odstranjenim zaostalim testisima je izvršena patohistološka analiza.

Kod 2 od 10 pasa (20%) je ustanovljen bilateralni kriptorhizam, dok je kod 8 od 10 pasa (80%) ustanovljen unilateralni kriptorhizam. Desni unilateralni kriptorhizam je utvrđen kod 5 od 8 pasa (62,5%), dok je levi unilateralni kriptorhizam utvrđen kod 3 od 8 pasa (37,5%). Prediktivna vrednost poređenja ultrazvučne identifikacije i lokalizacije zaostalih testisa sa njihovom hirurškom identifikacijom i lokalizacijom u ovom istraživanju iznosi 100%. Rezultati patohistološke analize su pokazali prisustvo tumoroznih promena u tipu seminoma na jednom testisu kod jednog psa (unilateralni ingvinalni kriptorhizam), dok je kod preostalih 9 pasa na morfološki promenjenim testisima postavljena dijagnoza atrofije testisa.

**Ključne reči:** pas, kriptorhizam, ultrazvučna dijagnostika, tumori testisa.

## UVOD

Testisi su parne muške polne žlezde smeštene u skrotumu. Uloga testisa kod životinja je dvojaka: gametogena, jer proizvode muške gamete (polne ćelije - spermatozoide) i endokrina, jer sintetišu i u krv izlučuju muške polne hormone (androgene) (Stančić, 2014). Za razliku od ostalih sisara, testisi kod pasa se ne spuštaju kroz ingvinalni kanal još 3-4 dana nakog njihovog rođenja i nalaze se u konačnoj poziciji u skrotumu tek nakon 35. dana postnatalno (Pretzer, 2008), dok bi svoj konačni skrotalni položaj trebali zauzeti do šestog meseca starosti životinje (Spangenberg, 2021). Spuštanje testisa regulišu androgeni i neandrogeni faktori, a posredovano je delovanjem gubernakuluma (Pretzer, 2008). Kod novorođenih pasa testisi su mali, meki i mogu se kretati između skrotuma i ingvinalnog kanala, posebno kada je štene pod stresom ili uplašeno.

Крипторхизам паса, као и код других врста животиња, представља заостajanje testisa са припадajućим анатомским структурама унутар абдомена или ингвиналног канала, односно изостанак спуштања наведених структура у скротум (Spangenberg, 2021; Moon i sar., 2014). На основу тога да ли заостaju један или оба testisa, крипторхизам се дели на unilateralni и bilateralni, док на основу локализације заосталог testisa крипторхизам може бити абдоминални, ингвинални и субкутани крипторхизам (Felumlee i sar., 2012; Mattos i sar., 2000; Mialot, 1988). Unilateralni крипторхиди могу производити fertile spermatozoide, док bilateralni крипторхиди обично не могу и sterile су. Psi крипторхиди имају већи ризик од настања неоплазија testisa и торзија сперматичне врпце (Moon i sar., 2014).

Сумња на крипторхизам се поставља путем метода опште клиничке дијагностике, пре свега адспекцијом и палпацијом, док се „златним“ стандардном у дијагностички крипторхизма сматра ултразвучни преглед са осетљивошћу од 96,6% (Khan i sar., 2018).

Једини вид лечења овог оболјенја представља хируршко уклањање заосталог/их testisa, а како се ради о наследном оболјенју, препоручује се и кастрација unilateralnih крипторхиди (одстрањивање и спуштење testisa), јер такви psi не би требали да се користе за даљи узгој (Gradil i McCarthy, 2012). Након оперативног уклањања testisa, заостали testis је неопходно послати на патолошко-анализу како би се утврдило да ли је неопластично изменјен.

Цилјеви овог истраживања су: утврђивање адекватних дијагностичких протокола при евалуацији заосталих testisa, одабир адекватне хируршке технике приликом одстрањивања заосталих testisa и патолошко-анализа testisa након њиховог хируршког уклањања.

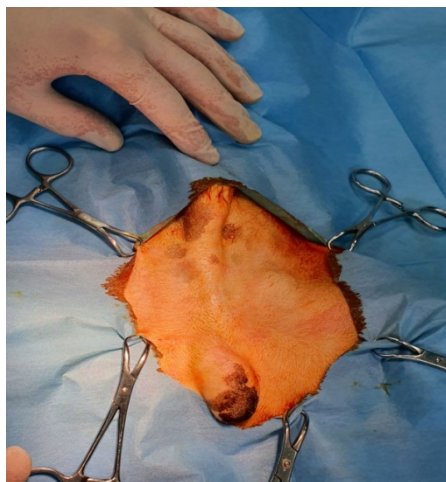
## MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje je sprovedeno na 10 vlasničkih pasa u okviru kliničkog rada u Univerzitetskoj veterinarskoj klinici Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu. Nakon detaljno prikupljenih anamnestičkih podataka od vlasnika životinja, pristupljeno je procesu kliničke dijagnostike kriptorhizma. Inicijalno, metodama adspekcije i palpacije, a zatim i korišćenjem ultrazvučne dijagnostike, utvrđeno je zaostajanje testisa kod svih prethodno suspektnih jedinki. Ultrazvučni pregled je izveden pomoću ultrazvučnog aparata BPU60 Vet (BMV, Kina), korišćenjem konveksne sonde, frekvencije 6 MHz, u B modu u realnom vremenu. Metodama kliničke dijagnostike je utvrđena lokalizacija zaostalih testisa (Tabela 1).

Nakon izvršenog detaljnog kliničkog pregleda svih jedinki, izvršena je preoperativna priprema pacijenta koja se sastojala iz nekoliko postupaka. Svim pacijentima je vađena krv kako bi se izvršile sledeće laboratorijske analize: kompletna krvna slika sa diferencijalnom leukocitarnom formulom, biohemijski parametri (kreatinin, AST, ALT, ukupni bilirubin, albumin, fosfor, kalcijum, glukoza, globulini, ukupni proteini, urea, alfa-amilaza, magnezijum, trigliceridi, lipaza, ALP, GGT). Kompletna krvna slika sa diferencijalnom leukocitarnom formulom analizirana je na aparatu MEK-6550 (Nihon KOHDEN CORPORATION, Japan). Biohemijska analiza parametara krvnog seruma izvršena je na aparatu Chemray (Rayto Life and Analytical Sciences Co., Kina). Kod svih pasa, a u okviru preoperativne pripreme pacijenta, urađen je test na vektorski prenosive bolesti - CaniV-4 Rapid Diagnostic Test (Bionote, Korea).

Kada je na osnovu svih prethodno navedenih analiza utvrđeno da su psi podobni za izvršenje hirurškog zahvata, pristupljeno je pripremi pasa za operaciju. Hirurški zahvati kod pasa su izvedeni u opštoj inhalacionoj anesteziji, po svim načelima dobre veterinarske i hirurške prakse. Prvo je izvršena premedikacija opšte anestezije, koja je podrazumevala aplikovanje sedativa životinji. Kod svih 10 jedinki, sedacija je izvedena pomoću ksilazina (XYLASED, Bioveta, Češka), intravenskom aplikacijom u dozi od 1 mg/kg telesne mase životinje. Nakon izvođenja postupka premedikacije, pristupljeno je pripremi operacionog polja. Dlačni prekrivač je uklonjen sa predela čitavog abdomena, prepucijuma i skrotuma (Slika 1). Koža je prvo prana neutralnim sapunima, a zatim je antisepsa izvedena pomoću 70% rastvora etil alkohola i 10% rastvora povidon joda. Indukcija opšte anestezije kod svih jedinki izvedena je intravenskom aplikacijom ketamina (Ketamidol 10%, RICHTER PHARMA AG, Austrija) u dozi od 3 mg/kg telesne mase životinje. Održavanje opšte anestezije izvedeno je pomoću sevoflurana (Sevorane 100%, AESICA QUEENBOROUGH LIMITED, Velika Britanija) sa minimalnom alveolarnom koncentracijom od 2,3%.

---



**Slika 1** Priprema operacionog polja (Fotografija: Ivan Galić, 2021)

Kod pasa sa dijagnostikovanim ingvinalnim kriptorhizmom, rez je plasiran direktno preko ingvinalnog kanala - preko kože, a zatim i potkožnog tkiva (Slika 2). Nakon evaluacije suspektnog testisa izvršeno je dvostruko podvezivanje spermatičnog svežnja. Spermatični svežanj je podvezan sa resorptivnim multifilamentnim koncem PGA, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska). Nakon podvezivanja i odstranjivanja suspektnog testisa, pristupalo se šivenju potkožnog tkiva resorptivnim monofilamentnim koncem MONOSORB, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska) tekućim šavom. Koža je šivena neresorptivnim monofilamentnim koncem NYLON, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska), pojedinačnim čvorastim šavom (Slika 3).



**Slika 2** Pristup ingvinalno zaostalom testisu (Fotografija: Ivan Galić, 2021)



**Slika 3** Izgled operacione rane nakon šivenja kože kod ingvinalnog kriptorhida  
(Fotografija: Ivan Galić, 2021)

Kod pasa sa dijagnostikovanim abdominalnim kriptorhizmom postojala su dva pristupa u zavisnosti da li se radilo o unilateralnom ili bilateralnom kriptorhizmu. U slučaju unilateralnog abdominalnog kriptorhizma rez je plasiran paramedijalno (Slika 4). Nakon inicijalnog reza kroz kožu izvršeno je preparisanje potkožja i plasiranje incizije kroz mišić kako bi se pristupilo trbušnoj duplji i vizuelizaciji suspektnog testisa. Po vizuelizaciji suspektnog testisa izvršeno je dvostruko podvezivanje spermatičnog svežnja i odstranjivanje zaostalog testisa. Spermatični svežanj je podvezivan resorptivnim multifilamentnim koncem PGA, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska). Zatim je pristupano zatvaranju trbušnog zida. Šivenje trbušnog zida izvršeno je resorptivnim monofilamentim koncem MONOSORB, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska) tekućim šavom. Šivenje potkožnog vezivnog tkiva izvršeno je resorptivnim monofilamentim koncem MONOSORB, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska) tekućim šavom. Koža je šivena neresorptivnim monofilamentim koncem NYLON, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska), pojedinačnim čvorastim šavom.



**Slika 4** Paramedijalni pristup abdominalno zaostalom testisu (Fotografija: Ivan Galić, 2021)

U slučaju bilateralnog kriptorhizma rez je plasiran medijalno. U tom slučaju, prvo je izvršeno preparisanje prepucijuma od trbušnog zida i pomeranje prepucijuma lateralno, nakon čega je izvršena incizija po beloј liniji trbušnog zida. Po vizuelizaciji suspektnog testisa izvršeno je dvostruko podvezivanje spermatičnog svežnja i odstranjivanje zaostalog testisa. Spermatični svežanj je podvezivan resorptivnim multifilamentnim koncem PGA, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska). Zatim je pristupano zatvaranju trbušnog zida. Šivenje trbušnog zida izvršeno je resorptivnim monofilamentim koncem MONOSORB, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska) tekućim šavom. Šivenje potkožnog vezivnog tkiva izvršeno je resorptivnim monofilamentim koncem MONOSORB, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska) tekućim šavom. Koža je šivena neresorptivnim monofilamentim koncem NYLON, USP 0 ili 2/0 (Yavo, Poljska), pojedinačnim čvorastim šavom.

Nakon odstranjivanja suspektnog testisa, testisi su stavljeni u formalin i poslani na patohistološku analizu. Patohistološka analiza je izvršena u laboratoriji za patologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

U okviru postoperativnog terapijskog protkola, svim psima su aplikovani nesteroidni-antiinflamatorni lekovi i antibiotici. U terapiji bola korišćen je metamizol-natrijum (Noramin, Evrolek Farmacija d.o.o, R. Srbija), aplikovan intravenski, u dozi od 25 mg metamizola/kg telesne mase životinje. Terapija bola kod svih pasa sprovedena je 3 dana u kontinuitetu. U okviru antibiotske zaštite, svi psi su jednokratno dobili kombinaciju penicilina i streptomicina u dozi od 0,5ml suspenzije na 5kg telesne mase psa - Penstrep (Dopharma, Holandija), a potom i dvokratno, na svakih 72<sup>h</sup>, antibiotik sa produženim delovanjem, kombinaciju penicilina i streptomicina – Shotapen, u dozi od 1ml suspenzije na

20kg telesne mase psa, (Virbac S.A.,Francuska). Konci su kod svih pasa skidani 14. dana nakon operacije.

## REZULTATI

U ovom istraživanju, metodama opšteg kliničkog pregleda i ultrazvučnom dijagnostikom, unilateralni kriptorhizam je dijagnostikovao kod 8/10 pasa (80%), dok je kod 2/10 pasa (20%) dijagnostikovao bilateralni kriptorhizam. Desni unilateralni kriptorhizam je utvrđen kod 5/8 pasa (62,5%). Zaostali levi testis je utvrđen kod 3/8 unilateralnih kriptorhida (37,5%). Kod 7/8 unilateralnih kriptorhida je utvrđena lokalizacija testisa u ingvinalnoj regiji (87,5%) dok je kod jednog utvrđena lokalizacija testisa u abdominalnoj duplji (12,5%). Bilateralni kriptorhizam je potvrđen kod 2/10 pasa. Kod jednog bilateralnog kriptorhida jedan testis je lokalizovan u ingvinalnom kanalu dok se drugi nalazio u abdominalnoj duplji. Kod drugog bilateralnog kriptorhida oba testisa su lokalizovana u abdomenu (Tabela 1).

**Tabela 1** Oblici kriptorhizma kod klinički pregledanih pasa



Pas	Rasa	Starost	Težina	Oblik kriptorhizma	Strana tela
1	Ši-cu	10 godina	6 kg	Ingvinalni - unilateralni	Leva strana
2	Bradati koli	2 godine	25kg	Ingvinalni - unilateralni	Desna strana
3	Sibirski haski	2 godine	22 kg	Ingvinalni - unilateralni	Desna strana
4	Border koli	3 godine	25 kg	Ingvinalni - unilateralni	Desna strana
5	Kavalijer Princa Čarlsa	1 godinu	8 kg	Ingvinalni - unilateralni	Leva strana
6	Francuski buldog	3 godine	9 kg	Ingvinalni - unilateralni	Desna strana
7	Patuljasti pinč	6 godina	5 kg	Ingvinalni - unilateralni	Leva strana
8	Patuljasta pudla	2 godine	4 kg	Abdominalni unilateralni	Desna strana
9	Jorkširski terijer	2 godine	5 kg	Abdominalni/ingvinalni bilateralni	Bilateralni
10	Jazavičar	4 godine	8 kg	Abdominalni - bilateralni	Bilateralni

Kako je jedina metoda lečenja kriptorhizma kod pasa hirurško odstranjivanje zaostalog testisa, izvršeni su hirurški zahvati i uklanjanje zaostalih testisa, a zatim se pristupilo i kastraciji, odnosno hirurškom odstranjivanju preostalog testisa s obzirom da se radi o naslednom oboljenju.

Nakon odstranjivanja zaostalih testisa, svaki odstranjeni testis je poslat na patohistološko ispitivanje. Od ukupno deset pasa, kod jednog psa je ustanovljen tumor zaostalog testisa u tipu seminoma (unilateralni ingvinalni kriptorhid) (Slika 5, 6), dok je kod ostalih ustanovljena atrofija testisa (Slika 7).



**Slika 5** Morfološki izmenjen testis-gore; Morfološki nepromenjen testis-dole  
(Fotografija: Jovan Spasojević, 2021)

	UNIVERZITET U NOVOM SADU POLJOPRIVREDNI FAKULTET DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU Trg Dositeja Obradovića 8 21000 Novi Sad	
---	--	---

Ustanova koja je poslala uzorak:	Veterinarska klinika	
Broj zdravstvenog kartona-protokola	7280	11/21PK
Ime i prezime vlasnika životinje:	Nela Markov	
Vrsta životinje:	Pas	
Rasa životinje:	Ši-cu	
Starost životinje:	10 godina	
Pol životinje:	m	
Uzorak koji je poslat:	Testis	
Datum uzimanja uzorka:	29.06.2021.	

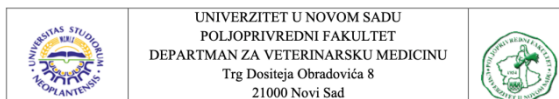
<b><u>PATOLOŠKO-HISTOLOŠKI NALAZ:</u></b>
Datum prijema: 30.06.2021.
Tip uzorka: Uzorak (1 kom.) testisa veličine 4,0 x 2,7 cm.
Na histološkom preparatu testisa psa se uočavaju okrugle ćelije sa velikim ovalnim jedrom i sa odsustvom bojenja citoplazme eozinom.
Dg. Seminoma benignum canis

Novi Sad, 12.07.2021.

Potpis \_\_\_\_\_

**Slika 6** Patohistološki nalaz i potvrda tumoroznih promena





Ustanova koja je poslala uzorak:	Veterinarska klinika	
Broj zdravstvenog kartona-protokola	7154	10/21PK
Ime i prezime vlasnika životinje:	Sreten Kovačević	
Vrsta životinje:	Pas	
Rasa životinje:	Bradati koli	
Starost životinje:	2 godine	
Pol životinje:	m	
Uzorak koji je poslat:	Testis	
Datum uzimanja uzorka:	14.06.2021.	

<b><u>PATOLOŠKO-HISTOLOŠKI NALAZ:</u></b>	
Datum prijema: 21.06.2021.	
Tip uzorka: Uzorak (1 kom.) testisa veličine 3,1 x 1,7 cm.	
Na histološkom preparatu se uočava atrofično tkivo testisa bez patoloških promena.	
Dg. Atrophia testis canis	

Novi Sad, 12.07.2021.

Potpis \_\_\_\_\_

**Slika 7** Patohistološki nalaz atrofijske testisa

## DISKUSIJA

Kriptorhizam je oboljenje nerazjašnjene etiologije za koje se smatra da ima genetsku osnovu. Mnogobrojne studije su pokazale da se stopa incidencije ovog oboljenja kod pasa kreće od 0,8% do 9,7% (Ruble i Hird, 1993; Priester i sar., 1970; Reif, 1969). Rase pasa kod kojih se najčešće javlja kriptorhizam su: malteški psi, čivave, nemački bokseri, engleski buldozi, toi pudle, jorkširski terijeri, jazavičari, pomeranski špic, pekinezeri, sibirski haski (Johnston, 2001). U ovom radu nije istraživana stopa incidencije kriptorhizma kod pasa, ali iz Tabele 1. se može zaključiti da se rezultati ovog istraživanja u velikoj meri poklapaju u pogledu rasa koje se smatraju predisponiranim na ovo oboljenje.

Klinička dijagnostika kriptorhizma kod pasa zasniva se na korišćenju opštih i specijalnih metoda kliničke dijagnostike, a „zlatnim standardom“ u dijagnostici kriptorhizma može se smatrati ultrazvučna dijagnostika. Ultrazvučna dijagnostika, sa osetljivošću od 96,6%, koristi se za otkrivanje abdominalnih kriptorhida, a sa osetljivošću od čak 100% za otkrivanje ingvinalnih kriptorhida (Khan i sar., 2018). Istraživanje koje su sveli Felumlee i sar. (2012) na psima, ukazuje da je postojala 100% pozitivna prediktivna vrednost za ukupno 42 od 43 psa, od kojih je 28 abdominalnih i 14 ingvinalnih kriptorhida. Kod navedenih pasa, ultrazvučni nalaz i pozicija testisa su istovetni sa njihovom hirurškom lokalizacijom. Kod jednog od 43 psa kriptorhida, abdominalno zaostao testis nije mogao biti identifikovan upotrebom ultrazvuka i kasnije je pronađen u abdomenu tokom operacije. Hirurški i ultrazvučni nalazi su bili isti za 42/43 (97,7%) zaostalih

testisa. Osetljivost ultrazvuka je iznosila 96,6% за abdominalно и 100% за ingvinalно позicionиране testise. У нашем научноистраживачком раду, као дијагностичке методе за откривање крипторхидних паса коришћене су методе опште клиничке дијагностике (адспекција и палпација) у комбинацији са ултразвучном дијагностиком. Код свих паса је помоћу ултразвучне дијагностике откривена локализација заосталог testisa која је касније потврђена приликом операције. На основу тога се може извести закључак да се у нашем истраживању ултразвучна дијагностика користила са степеном оsetљивости од 100%, што се поклапа са резултатима истраживања Felumlee i sar. (2012).

У нашем истраживању, а на основу резултата клиничког прегледа, код 80% паса (8/10) је дијагностикован unilateralни крипторхизам, док је код 20% паса (2/10) дијагностикован bilateralни крипторхизам. Десни unilateralни крипторхизам је утврђен код 5 од 8 паса (62,5%). Леви unilateralни крипторхизам је утврђен код 3 од 8 паса (37,5%). Код 7 од 8 паса unilateralних крипторхида је утврђена локализација testisa у ingvinalној регији (87,5%) док је код једног утврђена локализација testisa у abdominalној дупљи (12,5%). У истраживању које су спровели Tannouz i sar. (2019) установљено је присуство unilateralног крипторхизма у 70% случајева, а bilateralног крипторхизма у 30% случајева. Исти аутори наводе да је највећа преваленија код крипторхида забележена у десној ingvinalној регији (36,2%), затим у левој ingvinalној регији (25,4%), унутар десне стране abdominalне дупље (23,3%), док је преваленија крипторхизма унутар левој стране abdomena 15,1%. Резултати добијени у нашем научноистраживачком раду се делимично поклапају са резултатима добијеним од стране Tannouz i sar. (2019), а разлог делимичног поклапања лежи у различитом броју испитаних пацијената.

Ултразвучна дијагностика се сматра и примарном дијагностичком методом у дијагностици крипторхизма и код других животињских врста, као и код човека. Ултразвук је оsetљива и високо специфична метода за детекцију и локализацију заосталог testisa код коња (Felumlee i sar. 2012; Ras i sar., 2010; Schambourg i sar., 2006). Истраживање које су спровели Schambourg i sar. (2006) на 38 коња, од којих су unilateralни били у 32 случаја, а bilateralни у 6 случајева, указује да је у 97,5% случајева заостали testis успешно lociran и да је путем ултрасонографије могуће дати тачну дијагнозу abdominalног крипторхизма на терену без допуне хормонских анализа или ректалног прегледа. У истом истраживању се такође наводи да се ниједна друга abdominalна структура не може заменити са abdominalно заосталим testisом, под условом да је hiperehogена *tunica albuginea* видљива и да су centralна вена или epididimis лако уочљиви, што transabdominalну ултрасонографију чини поузданом дијагностичком методом.

Код људи је ултразвучна дијагностика такође коришћена за откривање заосталих testisa али са не тако задовољјавујим резултатима у појединим студијама

(Felumlee i sar. 2012; Pekkafali i sar., 2003; Elder, 2002; Malone i Guiney, 1985). Kod dece, ultrazvuk ima značaja jer predstavlja neinvazivnu tehniku koja ne koristi jonizujuće zračenje i olakšava planiranu hiruršku intervenciju (Felumlee i sar. 2012; Nijis i sar., 2007; Cain i sar., 1996; Weiss i sar., 1986; Kullendorff i sar., 1985; Wolverson i sar., 1983). Prilikom upoređivanja nalaza ultrazvuka sa hirurškim lokacijama nepalpabilnih testisa kod dece, ultrazvuk je bio uspešan u lociranju 103/152 (68,0%) nepalpabilnih testisa: 16 u abdomenu i 87 u ingvinalnim kanalima (Nijis i sar., 2007).

Gharagozlou i sar. (2014) su ispitivali korišćenje antimilerovog hormona kao potencijalnog dijagnostičkog markera kod pasa. Istraživanje je sprovedeno na 10 bilateralnih kriptorhida, 7 intaktnih pasa i 7 kastriranih pasa preko 6 meseci starosti toi rasa. Ustanovljeno je da su serumske koncentracije antimilerovog hormona značajno veće kod intaktnih i kastriranih pasa nego kod bilateralnih kriptorhida, što može poslužiti u diferencijalnoj dijagnostici kastriranih od kriptorhidnih pasa (Gharagozlou i sar., 2014).

Psi sa dijagnozom kriptorhizma imaju veći rizik od nastanka neoplazije testisa. Najčešće je reč o tumorima intersticijuma, odnosno *Leydigovih* ćelija, tumorima germinativnog epitela testisa-seminoma i tumorima *Sertolijevih* ćelija (North i sar., 2009). Tumori testisa predstavljaju više od 90% svih tumora genitalnih organa kod pasa i psi imaju najveću incidencu od svih životinjskih vrsta (North i sar., 2009). Veća incidencija tumora u tipu seminoma se može pripisati činjenici da ovi tipovi tumora rezultiraju jasnijim kliničkim znacima, odnosno povećanjem testisa (Grieco i sar., 2008; Marinković, 2006). Ovakav nalaz bio je i u našem slučaju, što se jasno uočava nakon orhidektomije oba testisa (Slika 5.) kod psa kod kog je na osnovu patohistološkog nalaza utvrđen tumor u tipu seminoma. Lalošević i sar. (2008) od trinaest pronađenih tumora testisa kod pasa, prijavljuju dva seminoma, od toga jedan pas, kao i u našem radu, bio je unilateralni kriptorhid. Takođe, istraživanje koje su sproveli Liao i sar. (2009) ukazuje da je tumorom zahvaćen češće desni testis, zbog toga što on i češće zaostaje u abdomenu, odnosno ingvinalnom kanalu, kako je bilo i u našem naučnoistraživačkom rad.

U analizi koju prikazuju Marinković i sar. (2006), tumor u tipu seminoma se najranije javio u devetoj godini, a najkasnije u petnaestoj godini, sa prosečnim uzrastom pasa od 10,8 godina, što se poklapa sa starošću našeg psa koji je bio starosti deset godina. U istom istraživanju, kada je reč o incidenciji pojave tumora testisa kod pasa koji nisu pokazivali nikakvu simptomatologiju karakterističnu za prisustvo tumora, dobijeni su sledeći rezultati na ispitanih ukupno 232 psa: istraživanje je obuhvatilo mužijake različitih rasa, različite starosti, a uzeta su oba testisa za patološko-histološku analizu. Utvrđeno je da je 27% pasa imalo tumor

testisa, od kojih je 50% imalo tumor *Leydigovih* ćelija, 42% seminom, a svega 8% tumor *Serolijevih* ćelija. Takođe, 31% od ukupnog broja obolelih imao je kombinacije ovih tumora. Zajedno su se najčešće pojavljivali tumori *Leydigovih* ćelija i seminom, potom tumor *Leydigovih* i tumor *Sertolijevih* ćelija, dok je kombinacija seminoma i tumora *Sertolijevih* ćelija zabeležena u malom broju slučajeva.

Orhidektomija je preporučena metoda odstranjivanja testisa koji je zahvaćen tumorom, ali kako postoji mogućnost i metastaziranja tumora, hemioterapija predstavlja dodatan terapijski protokol orhidektomiji (Botelho Soares de Brito i sar., 2014). Iako su metastaze retka pojava, mogu se pojaviti, a prognoza će zavisi o veličini i lokalizaciji metastaza. Seminomi pasa retko metastaziraju za razliku od seminoma kod ljudi. Metastaziraju samo u 6 do 11% slučajeva u ingvinalne, ilijačne i sublumbalne limfne čvorove, pluća i viscelarne organe (McEntee, 2002; Moulton, 1990).

### ZAKLJUČAK

Konačna dijagnoza postojanja kriptorhizma kod pasa može se postaviti sa napunjenih 6 meseci starosti životinje. Ultrazvučna dijagnostika se smatra primarnom dijagnostičkom metodom i „zlatnim standardom“ u dijagnostici kriptorhizma kod pasa, sa osetljivošću od 90% do 100% u zavisnosti od oblika kriptorhizma. Hirurška terapija, odnosno odstranjivanje zaostalih testisa, predstavlja jedino opciono rešenje u terapiji kriptorhizma. Takođe, neophodno je istovremeno izvršiti i kastraciju životinje, tj. odstranjivanje i normoponiranog testisa. S obzirom na patomorfološku izmenjenost svih zaostalih testisa, patohistološka analiza bi trebalo biti uvedena kao standard u okviru dijagnostičkih i terapijskih protokola u lečenju kriptorhizma.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

### LITERATURA

- Botelho Soares de Brito M., Coutinho L. N., Simoes A. P. R., Jark P. C., Reis C. C. V., Kihara M. T., Rolemberg D. S., Vicente W. R. R. (2014): Metastatic Sertoli Cell Tumor on Cryptorchid Dog-Case Report. In The 39 World Small Animal Veterinary Association World Congress, Proceedings.
- Cain M. P., Garra B., Gibbons M. D. (1996): Scrotal-inguinal ultrasonography: a technique for identifying the nonpalpable inguinal testis without laparoscopy. *The Journal of urology*, 156(2S): 791-794.
- Elder J. S. (2002): Ultrasonography is unnecessary in evaluating boys with a nonpalpable testis. *Pediatrics*, 110(4):748-751.

- Felumlee A. E., Reichle J. K., Hecht S., Penninck D., Zekas L., Dietze Yeager A., Goggin J. M., Lowry J. (2012): Use of ultrasound to locate retained testes in dogs and cats. *Veterinary radiology & ultrasound*, 53(5):581-585.
- Gharagozlou F., Youssefi R., Akbarinejad V., Mohammadkhani N. I., Shahpoorzadeh T. (2014): Anti-Müllerian hormone: a potential biomarker for differential diagnosis of cryptorchidism. *Theriogenology*, 79:1229-1235.
- Gradil C., McCarthy R. (2012): Cryptorchidism. *Small animal soft tissue surgery*, 681-685.
- Grieco V., Riccardi E., Greppi G. F., Teruzzi F., Iermano V., Finazzi M. (2008): Canine testicular tumours: a study on 232 dogs. *Journal of comparative pathology*, 138(2-3):86-89.
- Johnston S. D. (2001): Disorders of the canine testes and epididymes. *Canine and feline theriogenology*, 312-332.
- Khan F. A., Gartley C. J., Khanam A. (2018): Canine cryptorchidism: An update. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(6):1263-1270.
- Kullendorff C. M., Hederström E., Forsberg L. (1985): Preoperative ultrasonography of the undescended testis. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 19(1):13-15.
- Lalošević D., Prašović S., Kovačević S., Putić S., Vasić I. (2008): Pathological diagnostics of dog genital system tumors. *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta*, 32(1):133-139.
- Liao A. T., Chu P. Y., Yeh L. S., Lin C. T., Liu, C. H. (2009): A 12-year retrospective study of canine testicular tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7):919-923.
- Malone P. S., Guiney E. J. (1985): A comparison between ultrasonography and laparoscopy in localising the impalpable undescended testis. *The Journal of Urology*, 134(5):1058-1058.
- Marinković D., Pavlović N., Magaš V., Aleksić-Kovačević S. (2006): Pathohistological study of tumors in canine testes and ovarian in the period 1999-2003. *Veterinarski glasnik*, 60(1-2):51-60.
- Mattos M. R. F., Simões-Mattos L., Domingues S. F. S. (2000): Cryptorchidism in dog. *Ciência Animal*, 10(1):61-70.
- McEntee M. C. (2002): Reproductive oncology. *Clinical techniques in small animal practice*, 17(3):133-149.
- Mialot J. P. (1988): Patologia do aparelho genital masculino. *Patologia da Reprodução dos carnívoros domésticos*, 69-71.
- Moon J. H., Yoo D. Y., Jo Y. K., Kim G. A., Jung H. Y., Choi J. H., Hwang I. K., Jang G. (2014): Unilateral cryptorchidism induces morphological changes of

- testes and hyperplasia of Sertoli cells in a dog. *Laboratory animal research*, 30(4):185-189.
- Moulton J. E. (1990): Tumors of the mammary gland. *Tumors in domestic animals*, 518-552.
- Nijs S. M., Eijsbouts S. W., Madern G. C., Leyman P. M., Lequin M. H., Hazebroek F. W. (2007): Nonpalpable testes: is there a relationship between ultrasonographic and operative findings? *Pediatric Radiology*, 37(4):374-379.
- North S., Banks T., Straw R. (2009): Tumors of the urogenital tract. *Small Animal Oncology, an introduction*, 151:172.
- Pekkafali M. Z., Sahin C., Ilbey Y. O., Albayrak S., Yildirim S., Basekim C. Ç. (2003): Comparison of ultrasonographic and laparoscopic findings in adult nonpalpable testes cases. *European urology*, 44(1):124-127.
- Pretzer S. D. (2008): Canine embryonic and fetal development: A review. *Theriogenology*, 70(3):300-303.
- Priester W. A., Glass A. G., Waggoner N. S. (1970): Congenital defects in domesticated animals: general considerations. *American journal of veterinary research*, 31:1871-1879.
- Ras A., Rapacz A., Ras-Norynska M., Janowski T. E. (2010): Clinical, hormonal and ultrasonograph approaches to diagnosing cryptorchidism in horses. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(3):473.
- Reif J. S. (1969): The relationship between cryptorchidism and canine testicular neoplasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 155:2005-2010.
- Ruble R. P., Hird D. W. (1993): Congenital abnormalities in immature dogs from a pet store: 253 cases (1987-1988). *Journal of the American veterinary medical association*, 202(4):633-636.
- Schambourg M. A., Farley J. A., Marcoux M., Laverty S. (2006): Use of transabdominal ultrasonography to determine the location of cryptorchid testes in the horse. *Equine veterinary journal*, 38(3):242-245.
- Spangenberg C. (2021): Canine cryptorchidism: a concise review of its origin, diagnosis and treatment caroline spangenberg. *Biology, Engineering, Medicine and Science Reports*, 7(1):1-3.
- Stančić I. B. (2014): Reprodukcijska domaćih životinja. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Tannouz V. G. S., Mamprim M. J., Lopes M. D., Santos-Sousa C. A., Junior P. S., Babinski M. A., Abidu-Figueiredo M. (2019): Is the right testis more affected by cryptorchidism than the left testis? An ultrasonographic approach in dogs of different sizes and breeds. *Folia Morphologica*, 78(4):847-852.
-

- Weiss R. M., Carter A. R., Rosenfield A. T. (1986): High resolution real-time ultrasonography in the localization of the undescended testis. *The Journal of urology*, 135(5):936-938.
- Wolverson M. K., Houttuin E., Heiberg E., Sundaram M., Shields J. B. (1983): Comparison of computed tomography with high-resolution real-time ultrasound in the localization of the impalpable undescended testis. *Radiology*, 146(1):133-136.

Rad primljen: 11.04.2022.

Rad prihvaćen: 23.07.2022.

---

DOI 10.7251/VETJEN2201142S

UDK 616.681-007.4-08:636.7

### Original Scientific Paper

## CRYPTORCHIDISM IN DOGS

Jovan SPASOJEVIĆ\*, Ivan GALIĆ, Bojan TOHOLJ, Ivan STANČIĆ,  
Sandra NIKOLIĆ, Ivana DAVIDOV, Tijana KUKURIĆ, Nenad POPOVIĆ

University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Veterinary  
Medicine, Novi Sad, Serbia

\*Corresponding author: Jovan Spasojević, jovan.spasojevic1984@yahoo.com

### Summary

Cryptorchidism is a disease that is manifested by the retardation of the testicles with the associated anatomical structures inside the abdomen or inguinal canal. In dogs, the appearance of cryptorchidism is of unclear etiology, but it is believed to have a genetic basis. The "gold standard" in the diagnosis of this disease is ultrasound diagnostics with a sensitivity of 95-100%.

The study was conducted on 10 dogs. The clinical examination of dogs suspected to suffer from cryptorchidism was initially carried out using adsppection and palpation methods, after which an ultrasound examination was performed to identify and localize residual testicles. All dogs underwent surgical removal of both residual and physiologically descended testicles. A pathohistological analysis was performed on the removed residual testicles.

Bilateral cryptorchidism was found in 2 out of 10 dogs (20%), while unilateral cryptorchidism was found in 8 out of 10 dogs (80%). Right unilateral cryptorchidism was found in 5 out of 8 dogs (62.5%), while left unilateral cryptorchidism was found in 3 out of 8 dogs (37.5%). The predictive value of the comparison of ultrasound identification and localization of residual testicles with their surgical identification and localization in this study was 100%. The results of the pathohistological analysis showed the presence of tumorous changes in the type of seminoma on one testicle in one dog (unilateral inguinal cryptorchidism), while the diagnosis of testicular atrophy was made in the remaining 9 dogs with morphologically changed testicles.

**Keywords:** dog, cryptorchidism, ultrasound diagnosis, testicular tumors.

---



## INTRODUCTION

Testes are paired male sex glands located in the scrotum. The role of the testes in animals is twofold: gametogenic, since they produce male gametes (sex cells - spermatozoa), and endocrine, since they synthesize and secrete male sex hormones (androgens) into the blood (Stančić, 2014). Unlike other mammals, the testicles in dogs do not descend through the inguinal canal for another 3-4 days after their birth and are in their final position in the scrotum on day 35 postnatally (Pretzer, 2008). They occupy their final scrotal position up to the sixth month of the animal's age (Spangenberg, 2021). Testicular descent is regulated by androgenic and non-androgenic factors, and is mediated by the action of the gubernaculum (Pretzer, 2008). In newborn dogs, the testicles are small, soft and can move between the scrotum and the inguinal canal, especially when the puppy is stressed or frightened.

Cryptorchidism in dogs, as in other species of animals, represents the retardation of the testes with the associated anatomical structures inside the abdomen or inguinal canal, i.e. the absence of descent of the mentioned structures into the scrotum (Spangenberg, 2021; Moon et al., 2014). Based on whether one or both testicles remain, cryptorchidism is divided into unilateral and bilateral, while based on the localization of the remaining testicle, cryptorchidism can be abdominal, inguinal and subcutaneous cryptorchidism (Felumlee et al., 2012; Mattos et al., 2000; Mialot, 1988). Unilateral cryptorchids can produce fertile sperm, while bilateral cryptorchids usually cannot and are sterile. Cryptorchid dogs have a higher risk of testicular neoplasia and spermatic cord torsion (Moon et al., 2014).

Suspicion of cryptorchidism is established by the general clinical diagnostics, primarily using adsppection and palpation methods, while the "gold standard" in the diagnosis of cryptorchidism is the ultrasound examination with a sensitivity of 96.6% (Khan et al., 2018).

The only form of treatment for this disease is the surgical removal of the remaining testicle(s), and as it is a hereditary disease, castration of unilateral cryptorchids (removal of the descended testicle) is also recommended, because such dogs should not be used for further breeding (Gradil and McCarthy, 2012). After the surgical removal of the testicle, the remaining testicle must be sent for pathohistological analysis to determine whether it has undergone neoplastic changes.

---

The goals of this study are: determination of adequate diagnostic protocols for evaluation of residual testicles, selection of adequate surgical technique for removal of residual testicles and pathohistological analysis of testicles after their surgical removal.

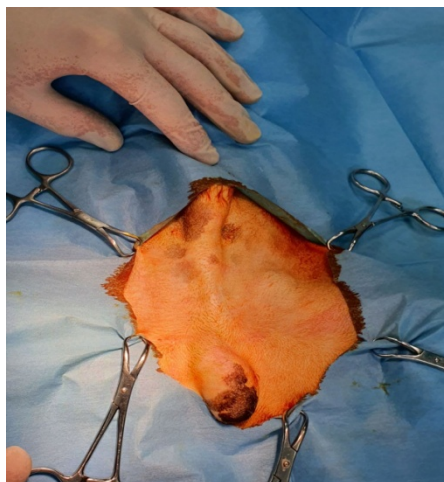
## MATERIALS AND METHODS

This study was conducted on 10 owner's dogs as part of clinical work at the University Veterinary Clinic of the Faculty of Agriculture in Novi Sad. After collecting detailed anamnestic data from the animal owners, the process of clinical diagnosis of cryptorchidism was initiated. Initially, with the methods of adsppection and palpation, and then with the use of ultrasound diagnostics, testicular retardation was determined in all previously suspected individuals. The ultrasound examination was performed using an ultrasound machine BPU60 Vet (BMV, China), using a convex probe, frequency 6 MHz, in B mode in real time. Clinical diagnostic methods were used to determine the localization of residual testicles (Table 1).

After a detailed clinical examination of all individuals, preoperative preparation of the patient was performed, which consisted of several procedures. Blood was taken from all patients to perform the following laboratory analyses: complete blood count with differential leukocyte formula, biochemical parameters (creatinine, AST, ALT, total bilirubin, albumin, phosphorus, calcium, glucose, globulins, total proteins, urea, alpha-amylase, magnesium, triglycerides, lipase, ALP, GGT). Complete blood count with differential leukocyte formula was analyzed on the MEK-6550 machine (Nihon KOHDEN CORPORATION, Japan). Biochemical analysis of blood serum parameters was performed on a Chemray apparatus (Rayto Life and Analytical Sciences Co., China). All dogs were tested for vector-borne diseases - CaniV-4 Rapid Diagnostic Test (Bionote, Korea) as part of the preoperative preparation of the patient.

The preparation of the dogs for the operation started when, on the basis of all the above-mentioned analyses, it was determined that the dogs are suitable for the surgical procedure. Surgical procedures in dogs were performed under general inhalation anesthesia, according to all principles of good veterinary and surgical practice. First, premedication for general anesthesia was performed, which involved the application of a sedative to the animal. In all 10 individuals, sedation was performed using xylazine (XYLASED, Bioveta, Czech Republic), intravenously administered at a dose of 1 mg/kg of the animal's body weight. After obtaining the premedication procedure, the preparation of the surgical field started. The hair was removed from the area of the entire abdomen, prepuce and scrotum (Figure 1). At first, the skin was washed with neutral soaps, and then

antisepsis was performed using a 70% ethyl alcohol solution and a 10% povidone iodine solution. Induction of general anesthesia in all animals was performed by intravenous administration of ketamine (Ketamidor 10%, RICHTER PHARMA AG, Austria) in a dose of 3 mg/kg of the animal's body weight. Maintenance of general anesthesia was performed using sevoflurane (Sevorane 100%, AESICA QUEENBOROUGH LIMITED, Great Britain) with a minimum alveolar concentration of 2.3%.



**Figure 1** Surgical field preparation (Photography: Ivan Galić, 2021)

In dogs diagnosed with inguinal cryptorchidism, the incision was made directly through the inguinal canal - through the skin and then the subcutaneous tissue (Figure 2). After evaluating the suspect testicle, a double ligation of the spermatic cord was performed. The spermatic cord was ligated with absorbable multifilament suture PGA, USP 0 or 2/0 (Yavo, Poland). After ligation and removal of the suspected testicle, suturing of the subcutaneous tissue was performed with absorbable monofilament thread MONOSORB, USP 0 or 2/0 (Yavo, Poland) with continuous suture. The skin was sutured with nonabsorbable monofilament NYLON, USP 0 or 2/0 (Yavo, Poland), by single knotted suture (Figure 3).



**Figure 2** Access to the inguinal residual testis (Photography: Ivan Galić, 2021)



**Figure 3** The appearance of the surgical wound after suturing the skin in inguinal cryptorchidism (Photography: Ivan Galić, 2021)

In the case of bilateral cryptorchidism, the incision was placed medially. In this case, the foreskin was first removed from the abdominal wall and moved laterally, after which an incision was made along the white line of the abdominal wall. After visualization of the suspicious testicle, a double ligation of the spermatic cord and removal of the remaining testicle was performed. The spermatic cord was ligated with absorbable multifilament suture PGA, USP 0 or 2/0 (Yavo,

---

Poland). Then the abdominal wall was closed. Abdominal wall suturing was performed with absorbable monofilament thread MONOSORB, USP 0 or 2/0 (Yavo, Poland) with continuous suture. Suturing of the subcutaneous connective tissue was performed with absorbable monofilament thread MONOSORB, USP 0 or 2/0 (Yavo, Poland) with continuous suture. The skin was sutured with nonabsorbable monofilament NYLON, USP 0 or 2/0 (Yavo, Poland), by single knotted suture.

After removing the suspect testicle, the testicles were placed in formalin and sent for pathohistological analysis. Pathohistological analysis was performed in the pathology laboratory of the Faculty of Agriculture, University of Novi Sad.

As part of the postoperative therapeutic protocol, non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics were administered to all dogs. In pain therapy, metamizole sodium (Noramin, Evrolek Farmacija d.o.o., R. Serbia) was used, administered intravenously, in a dose of 25 mg metamizole/kg animal body weight. Pain therapy in all dogs was carried out continuously for 3 days. As part of the antibiotic protection, all dogs were once given a combination of penicillin and streptomycin in a dose of 0.5 ml of suspension per 5 kg of the dog's body weight - Penstrep (Dopharma, the Netherlands), and then twice, every 72 hours, a long-acting antibiotic, a combination of penicillin and streptomycin - Shotapen, in a dose of 1 ml of suspension per 20 kg of the dog's body weight, (Virbac S.A., France). Sutures were removed in all dogs on the 14<sup>th</sup> day after surgery.

## RESULTS

In this study, using methods of general clinical examination and ultrasound diagnostics, unilateral cryptorchidism was diagnosed in 8/10 dogs (80%), while bilateral cryptorchidism was diagnosed in 2/10 dogs (20%). Right unilateral cryptorchidism was found in 5/8 dogs (62.5%). A left testicle was found in 3/8 unilateral cryptorchids (37.5%). In 7/8 unilateral cryptorchids, the localization of the testes was determined in the inguinal region (87.5%), while in one case, the localization of the testes was determined in the abdominal cavity (12.5%). Bilateral cryptorchidism was confirmed in 2/10 dogs. In one bilateral cryptorchid, one testicle was localized in the inguinal canal, while the other was located in the abdominal cavity. In the second bilateral cryptorchid, both testicles were localized in the abdomen (Table 1).

---

**Table 1** Types of cryptorchidism in clinically examined dogs

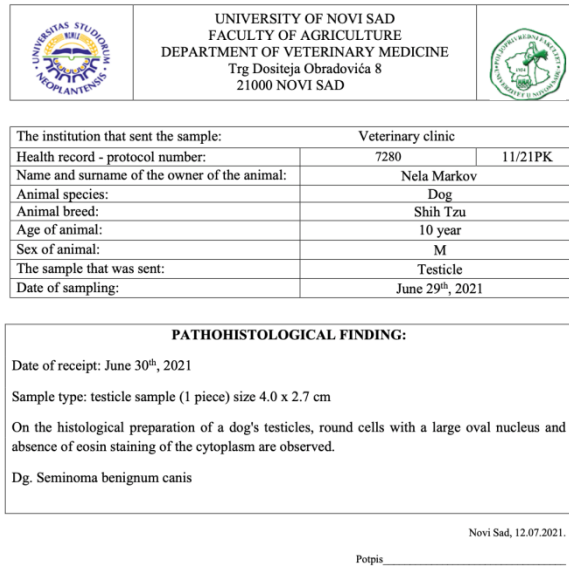
Dog	Race	Age	Weight	Cryptorchism type	Body side
1	Shih Tzu	10 years	6 kg	Inguinal – unilateral	Left side
2	Bearded Collie	2 years	25 kg	Inguinal - unilateral	Right side
3	Siberian Husky	2 years	22 kg	Inguinal - unilateral	Right side
4	Border Collie	3 years	25 kg	Inguinal - unilateral	Right side
5	Cavalier of Prince Charles	1 year	8 kg	Inguinal - unilateral	Left side
6	French Bulldog	3 years	9 kg	Inguinal - unilateral	Right side
7	Miniature Pinscher	6 years	5 kg	Inguinal - unilateral	Left side
8	Miniature Poodle	2 years	4 kg	Abdominal unilateral	Right side
9	Yorkshire Terrier	2 years	5 kg	Abdominal / inguinal bilateral	Bilateral
10	Dachshund	4 years	8 kg	Abdominal - bilateral	Bilateral

Since the only method of treating cryptorchidism in dogs is surgical removal of the residual testicle, surgical procedures and removal of the residual testicle were performed. Thereafter, castration, or surgical removal of the remaining testicle, was performed, considering cryptorchidism is a hereditary disease.

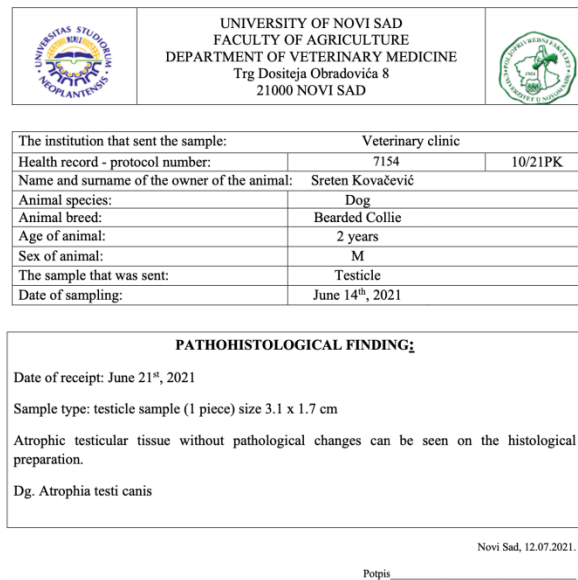
After removal of residual testicles, each removed testicle was sent for pathohistological examination. Out of a total of ten dogs, one dog was diagnosed with a residual testicular tumor in the seminoma type (unilateral inguinal cryptorchid) (Figure 5, 6), while the others were diagnosed with testicular atrophy (Figure 7).



**Figure 5** Morphologically altered testicle-above; Morphologically unchanged testicle-down (Photography: Jovan Spasojević, 2021)



**Figure 6** Pathohistological finding and confirmation of tumorous changes



**Figure 7** Pathohistological findings of testicular atrophy

## DISCUSSION

Cryptorchidism is a disease of unexplained etiology that is believed to have a genetic basis. Numerous studies have shown that the incidence rate of this disease in dogs ranges from 0.8% to 9.7% (Ruble and Hird, 1993; Priester et al., 1970; Reif, 1969). Breeds of dogs in which cryptorchidism occurs most often are: Maltese dogs, Chihuahuas, German boxers, English bulldogs, Toy poodles, Yorkshire terriers, Dachshunds, Pomeranian spitz, Pekingese, Siberian huskies (Johnston, 2001). In this study, the rate of incidence of cryptorchidism in dogs was not investigated, but from Table 1 it can be concluded that the results of this study are in accordance with others, when it comes to breeds that are considered predisposed to this disease.

Clinical diagnosis of cryptorchidism in dogs is based on the use of general and special clinical diagnostic methods, and ultrasound diagnostics can be considered the "gold standard" in cryptorchidism diagnosis. Ultrasound diagnostics, with a sensitivity of 96.6%, is used to detect abdominal cryptorchids, and with a sensitivity of even 100% to detect inguinal cryptorchids (Khan et al., 2018). Research conducted by Felumlee et al. (2012) on dogs, indicates that there was a 100% positive predictive value for a total of 42 out of 43 dogs, of which 28 were abdominal and 14 were inguinal cryptorchids. In the mentioned dogs, the ultrasound findings and position of the testicles are identical to their surgical localization. In one of the 43 cryptorchid dogs, an abdominally retained testis could not be identified using ultrasound diagnostic and was later found in the abdomen during surgery. Surgical and ultrasound findings were the same for 42/43 (97.7%) residual testes. The sensitivity of ultrasound diagnostic was 96.6% for abdominal and 100% for inguinal positioned testicles. In our study, the methods of general clinical diagnostics (aspection and palpation) in combination with ultrasound diagnostics were used as diagnostic methods for detecting cryptorchid dogs. In all dogs, the location of the residual testicle was detected using ultrasound diagnostics, which was later confirmed during surgery. Based on this, it can be concluded that in our study, ultrasound diagnostics was used with a degree of sensitivity of 100%, which coincides with the results of the research done by Felumlee et al. (2012).

In our study, based on the results of the clinical examination, unilateral cryptorchidism was diagnosed in 80% of dogs (8/10), while bilateral cryptorchidism was diagnosed in 20% of dogs (2/10). Right unilateral cryptorchidism was found in 5 out of 8 dogs (62.5%). Left unilateral cryptorchidism was found in 3 out of 8 dogs (37.5%). In 7 out of 8 dogs with unilateral cryptorchidism, the localization of the testicles was determined in the inguinal region (87.5%), while in one case, the localization of the testicles was

---



determined in the abdominal cavity (12.5%). In the research conducted by Tannouz et al. (2019), the presence of unilateral cryptorchidism was found in 70% of cases, and bilateral cryptorchidism in 30% of cases. The same authors stated that the highest prevalence of cryptorchidism was detected in the right inguinal region (36.2%), followed by the left inguinal region (25.4%), than within the right side of the abdominal cavity (23.3%). The prevalence of cryptorchidism within left side of abdomen was 15.1%.

The results obtained in our study partially coincide with the results obtained by Tannouz et al. (2019), and the reason for the partial coincidence lies in the different number of examined patients.

Ultrasound diagnostics is also considered the primary diagnostic method in the diagnosis of cryptorchidism in other animal species, as well as in humans. Ultrasound diagnostic is a sensitive and highly specific method for the detection and localization of a residual testicle in horses (Felumlee et al., 2012; Ras et al., 2010; Schambourg et al., 2006). Research conducted by Schambourg et al. (2006) on 38 horses, of which unilateral cryptorchidism was detected in 32 cases, and bilateral in 6 cases, indicates that in 97.5% of cases the residual testicle was successfully located and that it is possible, using ultrasonography, to give an accurate diagnosis of abdominal cryptorchidism on the field without additional hormonal analyzes or rectal examination. In the same study, it is also stated that no other abdominal structure can be mistaken for an abdominally retained testicle, provided that the hyperechoic *tunica albuginea* is visible and that the central vein or the epididymis are easily visible, which makes transabdominal ultrasonography a reliable diagnostic method.

In humans, ultrasound diagnostics have also been used to detect residual testicles, but with less satisfactory results in some studies (Felumlee et al. 2012; Pekkafali et al., 2003; Elder, 2002; Malone and Guiney, 1985). In children, ultrasound diagnostic is important because it is a non-invasive technique that does not use ionizing radiation and facilitates planned surgical intervention (Felumlee et al., 2012; Nijs et al., 2007; Cain et al., 1996; Weiss et al., 1986; Kullendorff and et al., 1985; Wolverson et al., 1983). When comparing ultrasound findings with surgical locations of non-palpable testicles in children, ultrasound diagnostic was successful in locating of 103 out of 152 (68.0%) non-palpable testicles: 16 in the abdomen and 87 in the inguinal canals (Nijs et al., 2007).

Gharagozlou et al. (2014) investigated the use of anti-Müllerian hormone as a potential diagnostic marker in dogs. The research was conducted on 10 bilateral cryptorchids, 7 intact dogs and 7 neutered dogs over 6 months of age of Toy breeds. It was found that serum concentrations of anti-Müllerian hormone are significantly higher in intact and neutered dogs than in bilateral cryptorchids,

---

which can be used in the differential diagnosis of neutered and cryptorchid dogs (Gharagozlou et al., 2014).

Dogs diagnosed with cryptorchidism have a higher risk of developing testicular neoplasia. The most common are tumors of the interstitium, i.e. *Leydig* cells, tumors of the testicular germinal epithelium-seminomas, and *Sertoli* cell tumors (North et al., 2009). Testicular tumors represent more than 90% of all tumors of the genital organs in dogs and dogs have the highest incidence of all animal species (North et al., 2009). The higher incidence of tumors in the seminoma type can be attributed to the fact that these types of tumors result in clear clinical signs, i.e. testicular enlargement (Grieco et al., 2008; Marinković, 2006). This finding was also in our case, which was clearly observed after the orchidectomy of both testicles (Figure 5) in a dog in which, based on the pathohistological findings, a tumor of the seminoma type was determined. Lalošević et al. (2008) reported two seminomas out of thirteen testicular tumors found in dogs, one of which, as in our study, was a unilateral cryptorchid. Also, the research conducted by Liao et al. (2009) indicates that the right testicle is more often affected by the tumor, due to the fact that it often lags behind in the abdomen, that is, the inguinal canal, as was also the case in our study.

In the analysis presented by Marinković et al. (2006), the seminoma type tumor appeared at the earliest at the age of nine, and at the latest at the age of fifteen, with an average age of dogs of 10.8 years, which coincides with the age of our dog, which was ten years old. In the same study, when it comes to the incidence of testicular tumors in dogs that did not show any symptomatology characteristic for the presence of tumors, the following results were obtained on a total of 232 dogs examined: the study included males of different breeds, of different ages, and both testicles were taken for pathological-histological analysis. It was found that 27% of the dogs had a testicular tumor, of which 50% had a *Leydig* cell tumor, 42% had a seminoma, and only 8% had a *Seroli* cell tumor. Also, 31% of the total number of patients had combinations of these tumors. *Leydig* cell tumors and seminoma appeared together most often, followed by *Leydig* cell tumor and *Sertoli* cell tumor, while the combination of seminoma and *Sertoli* cell tumor was recorded in a small number of cases.

Orchidectomy is the recommended method of removing a testicle affected by a tumor, but as there is a possibility of tumor metastasis, chemotherapy represents an additional therapeutic protocol to orchidectomy (Botelho Soares de Brito et al., 2014). Although metastases are rare, they can occur, and the prognosis will depend on the size and localization of the metastases. Seminomas in dogs rarely metastasize, unlike seminomas in humans. They metastasize only in 6 to 11% of

cases to inguinal, iliac and sublumbar lymph nodes, lungs and visceral organs (McEntee, 2002; Moulton, 1990).

### CONCLUSION

The final diagnosis of the presence of cryptorchidism in dogs can be made from the age of 6 months. Ultrasound diagnostics is considered the primary diagnostic method and the "gold standard" in the diagnosis of cryptorchidism in dogs, with a sensitivity of 90% to 100% depending on the type of cryptorchidism. Surgical therapy, i.e. removal of residual testicles, is the only optional solution in the treatment of cryptorchidism. Also, it is necessary to neuter the animal at the same time, i.e. remove the physiologically descended testicle. Considering the pathomorphological changes of all residual testicles, pathohistological analysis should be introduced as a standard within diagnostic and therapeutic protocols in the treatment of cryptorchidism.

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

### REFERENCES

- Botelho Soares de Brito M., Coutinho L. N., Simoes A. P. R., Jark P. C., Reis C. C. V., Kihara M. T., Rolemberg D. S., Vicente W. R. R. (2014): Metastatic Sertoli Cell Tumor on Cryptorchid Dog-Case Report. In The 39 World Small Animal Veterinary Association World Congress, Proceedings.
- Cain M. P., Garra B., Gibbons M. D. (1996): Scrotal-inguinal ultrasonography: a technique for identifying the nonpalpable inguinal testis without laparoscopy. *The Journal of urology*, 156(2S): 791-794.
- Elder J. S. (2002): Ultrasonography is unnecessary in evaluating boys with a nonpalpable testis. *Pediatrics*, 110(4):748-751.
- Felumlee A. E., Reichle J. K., Hecht S., Penninck D., Zekas L., Dietze Yeager A., Goggin J. M., Lowry J. (2012): Use of ultrasound to locate retained testes in dogs and cats. *Veterinary radiology & ultrasound*, 53(5):581-585.
- Gharagozlou F., Youssefi R., Akbarinejad V., Mohammadkhani N. I., Shahpoorzadeh T. (2014): Anti-Müllerian hormone: a potential biomarker for differential diagnosis of cryptorchidism. *Theriogenology*, 79:1229-1235.
- Gradil C., McCarthy R. (2012): Cryptorchidism. *Small animal soft tissue surgery*, 681-685.
- Grieco V., Riccardi E., Greppi G. F., Teruzzi F., Iermano V., Finazzi M. (2008): Canine testicular tumours: a study on 232 dogs. *Journal of comparative pathology*, 138(2-3):86-89.
- Johnston S. D. (2001): Disorders of the canine testes and epididymes. *Canine and feline theriogenology*, 312-332.
-

- Khan F. A., Gartley C. J., Khanam A. (2018): Canine cryptorchidism: An update. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(6):1263-1270.
- Kullendorff C. M., Hederström E., Forsberg L. (1985): Preoperative ultrasonography of the undescended testis. *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 19(1):13-15.
- Lalošević D., Prašović S., Kovačević S., Putić S., Vasić I. (2008): Pathological diagnostics of dog genital system tumors. *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta*, 32(1):133-139.
- Liao A. T., Chu P. Y., Yeh L. S., Lin C. T., Liu, C. H. (2009): A 12-year retrospective study of canine testicular tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(7):919-923.
- Malone P. S., Guiney E. J. (1985): A comparison between ultrasonography and laparoscopy in localising the impalpable undescended testis. *The Journal of Urology*, 134(5):1058-1058.
- Marinković D., Pavlović N., Magaš V., Aleksić-Kovačević S. (2006): Pathohistological study of tumors in canine testes and ovarian in the period 1999-2003. *Veterinarski glasnik*, 60(1-2):51-60.
- Mattos M. R. F., Simões-Mattos L., Domingues S. F. S. (2000): Cryptorchidism in dog. *Ciência Animal*, 10(1):61-70.
- McEntee M. C. (2002): Reproductive oncology. *Clinical techniques in small animal practice*, 17(3):133-149.
- Mialot J. P. (1988): Patologia do aparelho genital masculino. *Patologia da Reprodução dos carnívoros domésticos*, 69-71.
- Moon J. H., Yoo D. Y., Jo Y. K., Kim G. A., Jung H. Y., Choi J. H., Hwang I. K., Jang G. (2014): Unilateral cryptorchidism induces morphological changes of testes and hyperplasia of Sertoli cells in a dog. *Laboratory animal research*, 30(4):185-189.
- Moulton J. E. (1990): Tumors of the mammary gland. *Tumors in domestic animals*, 518-552.
- Nijs S. M., Eijsbouts S. W., Madern G. C., Leyman P. M., Lequin M. H., Hazebroek F. W. (2007): Nonpalpable testes: is there a relationship between ultrasonographic and operative findings? *Pediatric Radiology*, 37(4):374-379.
- North S., Banks T., Straw R. (2009): Tumors of the urogenital tract. *Small Animal Oncology, an introduction*, 151:172.
- Pekkafali M. Z., Sahin C., Ilbey Y. O., Albayrak S., Yildirim S., Basekim C. Ç. (2003): Comparison of ultrasonographic and laparoscopic findings in adult nonpalpable testes cases. *European urology*, 44(1):124-127.
-

- Pretzer S. D. (2008): Canine embryonic and fetal development: A review. *Theriogenology*, 70(3):300-303.
- Priester W. A., Glass A. G., Waggoner N. S. (1970): Congenital defects in domesticated animals: general considerations. *American journal of veterinary research*, 31:1871-1879.
- Ras A., Rapacz A., Ras-Norynska M., Janowski T. E. (2010): Clinical, hormonal and ultrasonograph approaches to diagnosing cryptorchidism in horses. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13(3):473.
- Reif J. S. (1969): The relationship between cryptorchidism and canine testicular neoplasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 155:2005-2010.
- Ruble R. P., Hird D. W. (1993): Congenital abnormalities in immature dogs from a pet store: 253 cases (1987-1988). *Journal of the American veterinary medical association*, 202(4):633-636.
- Schambourg M. A., Farley J. A., Marcoux M., Laverty S. (2006): Use of transabdominal ultrasonography to determine the location of cryptorchid testes in the horse. *Equine veterinary journal*, 38(3):242-245.
- Spangenberg C. (2021): Canine cryptorchidism: a concise review of its origin, diagnosis and treatment caroline spangenberg. *Biology, Engineering, Medicine and Science Reports*, 7(1):1-3.
- Stančić I. B. (2014): Reprodukcijska domaćih životinja. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Tannouz V. G. S., Mamprim M. J., Lopes M. D., Santos-Sousa C. A., Junior P. S., Babinski M. A., Abidu-Figueiredo M. (2019): Is the right testis more affected by cryptorchidism than the left testis? An ultrasonographic approach in dogs of different sizes and breeds. *Folia Morphologica*, 78(4):847-852.
- Weiss R. M., Carter A. R., Rosenfield A. T. (1986): High resolution real-time ultrasonography in the localization of the undescended testis. *The Journal of rology*, 135(5):936-938.
- Wolverson M. K., Houttuin E., Heiberg E., Sundaram M., Shields J. B. (1983): Comparison of computed tomography with high-resolution real-time ultrasound in the localization of the impalpable undescended testis. *Radiology*, 146(1):133-136.

Paper received: 11.04.2022.

Paper accepted: 23.07.2022.

---

DOI 10.7251/VETJSR2201156B

UDK 636.09:614.31]:619

Прегледни научни рад

**ЗНАЧАЈ САРАДЊЕ ЛЕКАРА И ВЕТЕРИНАРА У КОНЦЕПТУ ЈЕДНО  
ЗДРАВЉЕ****Бранислава БЕЛИЋ<sup>1\*</sup>, Марко ЦИНЦОВИЋ<sup>1</sup>, Николина НОВАКОВ<sup>1</sup>,  
Марија ЈЕФТИЋ<sup>2</sup>, Драгана ДИМИТРИЈЕВИЋ<sup>3</sup>, Бобан ЂУРИЋ<sup>4</sup>**<sup>1</sup> Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Департман за ветеринарску медицину, Нови Сад, Србија<sup>2</sup> Институт за јавно здравље Војводине, Нови Сад, Србија<sup>3</sup> Институт за јавно здравље Србије “Др Милан Јовановић Батут“, Београд, Србија<sup>4</sup> Управа за ветерину, Београд, Србија

Коресподентни аутор: Бранислава Белић, drbbelic@gmail.com

**Сажетак**

Хумана медицина и ветеринарска медицина су две области у оквиру медицинских наука и постоје велике могућности и потребе да се оне ближе повежу, нарочито у лечењу људи и животиња. Једно здравље промовише сарадњу и везу лекара и ветеринара али и стручњака животне средине и других специјалности, које имају значаја за здравље. Поједини стручњаци сматрају да би напредак ове сарадње утицала едукација пацијената и власника животиња о зоонотским болестима њихових љубимаца, коју би требало да врше лекари и ветеринари. Једно здравље има задатак да помогне лекару да препозна да одређена болест није искључиво везана за хуману медицину, већ да укаже да се са том болести сусрећу и ветеринари. Боља и ближа сарадња лекара и ветеринара и њихова повезаност би допринела да обе струке боље препознају и лече одређене болести људи и животиња и да спрече и смање негативан утицај животне средине на здравље људи и животиња. Упознавањем концепта Једно здравље, постоје могућности за бољом сарадњом и заједничким радом, али у овом тренутку још увек постоји и удаљеност ове две професије. У свету се велики број стручњака бави овим проблемом и сматра се да би требало направити стратегију, која би отклонила овај проблем, што би допринело и промоцији концепта Једно здравље. Значај сарадње лекара и ветеринара је велики а допринос нових научних сазнања на примеру различитих врста данас представља велики изазов за науку.

**Кључне речи:** Једно здравље, сарадња, лекари, ветеринари, животна средина

## УВОД

Концепт Једно здравље (енгл. One Health) обухвата здравље људи и животиња уз животну средину, која их окружује. Порекло једне медицине и концепта Једно здравље, сарадња лекара и ветеринара, се сповезује са немачким лекаром и патологом Рудолфом Вирхофом (Rudolph Virchow), још у 19. веку, који је открио животни циклус трихинеле (*Trichinella spiralis*) која из свињског меса конзумацијом улази у организам човека. Увео је термин зооноза и указао на сличности хумане и ветеринарске медицине, те навео да не би требало да постоји подела на хумане и ветеринарске лекаре. Још тада се говорило о сарадњи лекара и ветеринара у лечењу људи и животиња (Saunders, 2000; Kahn и сар., 2007; Gyles, 2016; Јефтић и сар., 2021; Belić и сар., 2021).

Мисао коју је изрекао Hippocrates (460-367. пре нове ере), да при посматрању начина живљења људи не треба их посматрати ван њихове животне средине, јасно указује да је и тада постојао значајан утицај животне средине на живот људи. У старом веку, су Hippocrates и Galen, поставили теорију да су сва тела сачињена од четири врсте течности, а да је болест индивидуе последица неуравнотежености која се јавља између ових течности. У овом периоду су у испитивањима учествовали и људи и животиње, при чему су имали исти третман и пажњу. Ова теорија је важила до открића микроба и савремених схватања хуморалног и целуларног имунолошког одговора. У 18. веку је папа Clement XI дао лекару, Giovanni Maria Lancisi (1654-1720), инструкције за борбу и мере усмерене против куге преживара, јер се знало да је она летална вирусна болест животиња, и да значајно утиче на приносе и смањује залихе хране. Предложио је да се болесне животиње униште и на тај начин спречи ширење болести. Прва ветеринарска школа у Лиону је основана због спречавања ширења ове опасне заразне болести 1761. године. Студенте из области здравља животиња је учио Claude Bourgelat (1712-1779), а користио је исте „патобиолошке принципе“ који су примењивани у хуманој медицини и бавио се њиховим утицајем на здравље животиња. Након оснивања прве ветеринарске школе у Лиону, значај и улога ветеринара је значајно порасла у друштву. После оснивања ове школе у Европи и целом свету се оснивају овакве школе.

Концепт Једно здравље је наставило да се помиње у наредним годинама све до данас. William Osler, канадски лекар и патолог, који је подучавао

студенте медицине на Mc Gill колеџу и студенте ветерине на Montreal ветеринарском колеџу током 1870-тих година, у концепту Једно здравље је поставио концепт компаративне патологије животиња и људи односно јединствен концепт медицине (Kahn и сар., 2007; Kahn, 2008; Schultz, 2008). Grant и Olsen су крајем 19. века, у својим истраживањима проучавали улогу лекара и ветеринара у превенцији зоонотских обољења, код имунокомпромитованих пацијената и дошли до сазнања да лекари нису довољно разговарали са својим пацијентима о тим болестима, али и да пацијенти нису препознали ветеринаре као стручњаке за лечење њихове болести. Констатовали су да је ризик хронично имунокомпромитованих болесника који поседују животиње знатно већи, него код имунокомпетентних индивидуа. Значајан напредак би могао да се постигне, када би лекари и ветеринари едуковали своје пацијенте односно клијенте о зоонотским болестима њихових љубимаца. Они су сматрали да школе медицине и ветерине треба да обезбеде знања својим студентима о начину на који животиње и људи утичу једни на друге. Сматра се да су приступ Једној медицини унапредили ветеринари јавног здравља, а да је најистакнутији био James Harlan Steele (1913-2013), који се данас сматра оцем ветеринарског јавног здравља. Он је 1947. године, основао одељење ветеринарског јавног здравља у Центру за заразне болести у САД (History of one health). Ова организација је била концентрисана на зоонотске болести: туберкулозу говеда, бруцелозу, беснило и салмонелозу, те је применила принципе јавног здравља у њиховој превенцији и искорењавању. Један од твораца једне медицине односно концепта Једно здравље је Calvin Schwabe, који се залагао за сарадњу професионалаца у хуманој и ветеринарској медицини у изучавању зоонотских болести, а залагао се за превенцију и спречавање избијања ових болести. У току 19. века сарадња лекара и ветеринара је била веома ограничена и одвијала се само у појединачним случајевима.

Термин Једна медицина је еволуирао у Једно здравље, чиме је стављен нагласак на промоцију здравља, а не на лечење болести. У наредном периоду развоја овог концепта, јавља се утицај животне средине на здравље, односно утицај фактора спољашње средине на људе и животиње. Покрет Једно здравље односно Иницијатива Једног здравља (One health initiative) се формира у току 2006. године. Данас је концепт Једно здравље и његов интерес усмерен на болести, које су последица интеракције људи и животиња. Циљ овог концепта је промоција примене међусекторског, мултидисциплинарног приступа за ублажавање и смањење постојећих или потенцијалних ризика по здравље, који проистичу из интеракција људи.



Образују се међународне мултидисциплинарне научне заједнице, политичких и владиних лидера, шире јавности и медија у вези са концептом Једно здравље, које помажу у промоцији брзе имплементације концепта широм света. Билтен Једно здравље, који издаје Универзитет у Флориди, настоји да подстакне комуникацију и сарадњу међу ветеринарима, лекарима, стручњацима за јавно здравље и научницима из области заштите животне средине и да утврди мултидисциплинарна решења за ове заједничке изазове. Повећано интересовање за Једно здравље се јавља након конференција 2011. године, које су одржаване у САД, а на њима су учествовали лекари и ветеринари, који се баве сличним болестима на људима и животињама. Концепт Једно здравље има задатак да помогне лекару да препозна да одређена болест није искључиво везана за хуману медицину, већ да се са њом сусрећу и ветеринари. Конференције и скупови о једном здрављу имају за циљ да се једно здравље помери са периферије хумане медицине у централну позицију где и припада.

Избијања зооноотских болести, као што су САРС, инфекције вирусом еболе и пандемијски грип послужила су за истицање значаја концепта Једно здравље. Једно здравље треба да се више промовише на локалном нивоу, због побољшања комуникације и сарадње лекара и ветеринара у размени информација, знања и образовања о зоонозама и другим питањима јавног здравља. Водеће место у промовисању разумевања екосистема у ветеринарској медицини имале су Канадске ветеринарске школе, које су настојале да се ветеринари припреме за рад као део трансдисциплинарних тимова који се баве Концептом Једно здравље односно лечењем болести (Nielsen и сар., 2012; Кировски и Плавшић, 2019). Предлог Nielsena и сар. (2014) је био да се на националном нивоу оснаже капацитети ветеринарске струке и да се им допусти водећа улога у јавној политици.

Историјски посматрано и поред напредних схватања многих научника веома је дуг пут до развоја концепта Једно здравље и повезивања и сарадње лекара и ветеринара.

Једно здравље се сматра једним од најважнијих покрета и концепата здравља данашњице. Сарадња хумане и ветеринарске медицине има потенцијал, да доведе до нових научних схватања, креира нове терапије и промени начин на који лекари, ветеринари и њихови пацијенти и клијенти разумеју здравље и болест. Концепт Једно здравље није добило довољан значај и развијену свест или привлачност у хуманим медицинским заједницама. Од настанка овај концепт, који је на почетку назван Једна медицина, примарно је вођен светским ветеринарским струкама. На медицинским и ветеринарским факултетима у свету се за њега зна већ око

15 година, а упоредна медицина је деценијама дуже била тихо евидентна у универзитетским кампусима са ветеринарским и медицинским школама (Wilkinson, 1992). Иако је неколико лекара имало водећу улогу у концепту Једно здравље, у Сједињеним америчким државама, упркос више од петнаест година снажног раста покрета, многи још увек нису чули за њега. У свету је велики број лекара укључен у овај покрет, али му још увек није дат довољан значај и није постигнута довољна повезаност лекара и ветеринара односно медицине и ветеринарске медицине. У концепту Једно здравље се највише налазе људи, који раде на зоонозама у пољу сигурности хране и инфективних обољења. Познато је да су зоонозе болести карактеристичне за човека и животиње, које се преносе између животиња, или са животиња на човека. Преношење може бити директно или индиректно, преко вектора или путем контаминиране животне средине (Saunders, 1987).

За разумевање везе животиња, људи и њиховог здравља, неопходно је у концепт Једно здравље укључити и лекаре, који нису само инфектолози. Једно од главних изазова концепта Једно здравље је укључивање лекара да би схватили да је то неопходно за њихов свакодневни рад. Медицинска заједница којој припадају лекари и здравствено особље је и даље у великој мери искључена из концепта Једно здравље, али без значајног ангажовања лекара медицинских сестара и других здравствених радника не може се у потпуности оствари његов потенцијал.

Потребно је да лекари препознају да болести које лече код својих пацијената често нису јединствене само за људе односно да стручњаци за здравље животиња имају информације и знања о болестима које преносе животиње, које треба поделити са лекарима и тиме унапредити концепт Једно здравље. Постоји и велики број могућности за сарадњу али и велики раскорак између ове две професије (Natterson-Horowitz, 2015).

Концепт Једно здравље није нов јер је познато да здравље људи, животиња и екосистем представљају једну целину још од настанка људске врсте. Једно здравље нема једну конкретну и од свих прихваћену дефиницију. Највише се користи дефиниција Америчког ветеринарско-медицинског друштва: Једно здравље је интегративни приступ више различитих дисциплина, које се остварују на локалном националном и глобалном нивоу у циљу одржавања оптималног здравља људи, животиња и одржавања животне средине. Светска здравствена организација дефинисала је Једно здравље као приступ за осмишљавање и спровођење програма, политика, законодавства и истраживања, у којима више сектора комуницира и ради заједно ради постизања бољих резултата јавног здравља.

Једно здравље подразумева низ поступака у свакодневној пракси, који доприносе здрављу људи и животиња. Одсек Једно здравље у Шведској и Једно здравље Иницијатива Аутономни *pro bono* тим су представили једно здравље шематским приказом „кишобрана”, који покрива све области којима овај концепт треба да се бави и јасно фокусира на последице, реакције и поступке на животињи – човеку – екосистему и њиховој повезаности, а посебно на зоонозе, које настају и ендемске и ензооноске зоонозе, при чему су претходне одговорне за много већи терет болести у земљама у развоју, са великим друштвеним утицајем у окружењу и сиромашним ресурсима (Welburn и сар., 2015; Cleaveland и сар., 2017).

Једно здравље поред медицине и ветеринарске медицине по свом концепту обухвата и друге дисциплине, укључујући екологију и здравље екосистема, друштвене науке, коришћење земљишта и биодиверзитет. Ветеринарска заједница се веома брзо укључила у концепт Једно здравље што није био случај са медицинском заједницом. Једно здравље је подржано и од Америчког медицинског удружења, Енглеског јавног здравља и Светске здравствене организације. Поред ове подршке за потпуније укључивање медицинске заједнице у будућности биће потребно укључивање концепта Једно здравље у наставне програме медицинских школа и у програме студија медицине, да би они Јавно здравље сагледали као значајну компоненту јавног здравља и заразних болести (Rabinowitz и сар., 2017; Кировски и Плавшић, 2019).

Не постоји боље квалификована професија него што је ветеринарска, која је кроз историју и тренинге промовисала интердисциплинарни приступ Једно здравље и била лидер у имплементацији првих корака.

Већина ветеринара данас, завршава специјализације за једну врсту животиња или један сектор професије, али остају верни својој заклетви и обављају своју праксу по принципима концепта Једно здравље. Једно здравље представља систематски приступ различитим праксама, који и даље расте и поред зооноза узима у обзир и утицаје екосистема (Battelli и Mantovani, 2011).

Надзор животиња и њиховог здравственог стања представља главну компоненту једног здравља нарочито у детекцији нових претњи које се могу јавити у вези животиња и човека.

Доктори Rolf Zinkernagel и Peter C. Doherty лекар и ветеринар су открили како имунски систем разликује нормалну од вирусно заражене ћелије. Они су 1996. године добили Нобелову награду из медицинске физиологије или медицине (Nobelpriset i fysiologi eller medicin). Овај пример показује да је

концепт Једно здравље веома значајан за научноистраживачки и практичан рад лекара и ветеринара.

Једно здравље је концепт различитих дисциплина сакупљених у једну перспективу, са заједничким решењима за очување здравља људи и животиња уз очување животне средине, оптималног здравља људи, животиња и екосистема, односно животне средине (Savić и сар., 2014).

Кроз историју медицински радници су лечили људе и животиње. Постоје подаци да су бригу о здрављу животиња на подручју Војводине, у 18. веку преузели лекари. Они су имали важну улогу у организацији ветеринарске службе, јер су се до друге половине 19. века, поред хумане медицине, бавили и сузбијањем сточних зараза и ветеринарском полицијом. Лекари су тај посао могли да обављају до 1819. године, пошто је тада по други пут донет пропис да посао ветеринара могу да обављају само они лекари, који имају испит из ветеринарства, односно који су оспособљени за дипломираног ветеринара на Ветеринарском институту у Бечу. Овакав пропис је први пут донет 1781. године, али тада није постојао задовољавајући број лекара с ветеринарским испитом. На Ветеринарском институту у Бечу те године почеле су последипломске студије из ветерине у трајању од две године, а уписивали су их лекари и хирурзи. Након завршетка студија, кандидати су добијали звање ветеринара, а од 1833-1857. године и звање магистар ветеринарства. Образовањем кадрова из ветеринарске медицине, у Војводини су тек 1910. године здравствену заштиту домаћих животиња потпуно преузели академски образовани ветеринари, који су завршили студије на ветеринарским факултетима или одселима медицинских факултета у Европи (Јовановић, 2004; Белић, 2014).

До раздвајања медицине на ветеринарску и хуману је дошло током различитих времена у различитим подручјима. У мање развијеним земљама, ова подела није толико стриктна, као у развијеним друштвима. Данас су у већини земаља, хумана и ветеринарска медицина законски раздвојене области. У Немачкој, ветеринари не смеју да лече људе, осим када се ради о изузетним стањима. У мање развијеним земљама се ова подела је само делимична, јер њихови традиционалистички приступ медицинским наукама (који подједнако цени сваку врсту) постоји и поред прихваћених постулата модерне медицине. У традиционалним системима и удаљеним подручјима локални „исцељивачи” су једини, који се баве здрављем људи и животиња. У развијеним подручјима, са свом потребном опремом, медицина је подељена на хуману и ветеринарску. Важна импликација концепта Једно здравље и приступа који овај концепт има су области медицине које се баве

пијаћом водом, хигијенским навикама људи, хигијеном животне средине, лоша и неконтролисана исхрана, као и уска веза људи и животиња (Jevtic и сар., 2020).

Током 2018. године, забележено је преко 2 милиона смртних случајева као последица зоонотских болести, док је код преко 2 милијарде зоонотски патоген био узрочник обољења.

У овом случају ветеринари представљају „прву линију” за препознавање, дијагностиковање и одговор на оваква обољења. Човек је домаћин за свега 3% зоонотских патогена. Ипак, да би се потврдило избијање болести морају се препознати случајеви обољевања људи као и оболеле индивидуе. Ефикасан надзор, праћење и контрола болести, захтева сарадњу између ветеринара и лекара. Пораст потребе за прехранбеним сировинама и њихова контрола и исправност зависе од ветеринара. Они су повезани и са производњом сигурне, микробиолошки безбедне хране, која би могла да буде опасност и пренесе инфективне агенсе на човека (FAO, 2011; Kelly и сар., 2013; Nabarro, 2012). Координацијом и сарадњом лекара, ветеринара, стоматолога и биолога постиже се боља превенција одређених обољења, што је значајније од деловања на њих, када се већ развију. Превенција увек представља бољи корак, него лечење. Ефикасна борба против зооноза захтева приступ и концепт Једно здравље, интердисциплинарну сарадњу за превенцију и контролу инфективних обољења и епидемија, хроничних болести, које нападају људе и животиње. Лекари, ветеринари, еколози, заштитари животне средине, експерти за лабораторијске животиње и друге научне области морају да раде заједно и сарађују у циљу превазилажења професионалних баријера (Mersha и Tewodors, 2012).

Иако ветеринарска медицина представља вођу концепта Једно здравље, постоје оправдани страхови да ће се удаљити од њега. Ветеринарска медицина поседује добре основе за промоцију, усвајање и вођење концепта Једно здравље, али је потребно да се у курикулуме уведу и професионални тренинзи и едукације, да би се што боље спроводио концепт Једно здравље (Gibbs и Gibbs, 2012).

Ветеринари у обављању своје делатности виде животиње и њихове власнике, људе, што им омогућава да први могу да уоче обољења са зоонотским потенцијалом и да укажу на то да одређена претња постоји. Они су одлични познаваоци компаративне медицине, зооноза и јавног здравља. Лекари не посвећују довољну пажњу и не пролазе озбиљније едукације из области зооноза и компаративне медицине. Услед тога, ветеринари су у бољој позицији да препознају претњу по јавно здравље. У неразвијеним земљама и сиромашнијим подручјима, увођење концепта Једно здравље

потенцијално може побољшати ефикасну контролу болести за људе и животиње (Mersha и Tewodors, 2012).

Иако се све више иницира концепт Једно здравље, многе земље Европске Уније и даље не показују озбиљније тенденције ка његовом усвајању и кооперацији различитих поља. Многе земље су увеле концепт Једно здравље у борби против зооноза и антимикробне резистенције. У пракси се показало да ветеринари боље прихватају и промовишу овај концепт, као и важност међусобне сарадње, него хумани лекари. Промоција овог концепта треба да помогне промовисању мултидисциплинарног приступа (De Guisti и сар., 2019).

Многи људи су заборавили катастрофалне последице зооноотских болести које су се догодиле у прошлости. Постојао је последњих неколико деценија пораст појаве посебно зооноотских болести. Није добро да се занемарује могућност избијања болести, те да се систематски не боримо против њих. Имајући у виду да зоонозе имају огроман утицај на јавно здравље, животиње и животну средину треба истаћи значај концепта Једно здравље и применити његов систематски приступ, који је веома важан. Интердисциплинарна сарадња концепта Једно здравље има значај у смањењу претњи по глобално здравље од заразних болести.

### **ЗАКЉУЧАК**

Боља и ближа сарадња лекара и ветеринара и њихова повезаност би допринела да обе струке боље препознају и лече одређене болести људи и животиња и да спрече и смање негативан утицај животне средине на здравље људи и животиња. Упознавањем концепта Једно здравље, постоје могућности за бољом сарадњом и заједничким радом, али у овом тренутку још увек постоји и удаљеност ове две професије. У свету се велики број стручњака бави овим проблемом и сматра се да би требало направити стратегију, која би отклонила овај проблем, што би допринело и промоцији концепта Једно здравље. Значај сарадње лекара и ветеринара је велики а допринос нових научних сазнања на примеру различитих врста данас представља велики изазов за науку.

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

---

## ЛИТЕРАТУРА

- Battelli G., Mantovani A. (2011): The veterinary profession and one medicine: some considerations with particular reference to Italy, *Vet. Ital.*, 47(4):389-95.
- Белић Б. (2014): Здравствена култура Сремских Карловаца. Друштво лекара Војводине. Српско лекарско друштво.
- Белић Б., Цинцовић М., Новаков Н. (2021): Једно здравље – веза хумане и ветеринарске медицине. У: Једно здравље, ур. Јевтић М., Белић Б., Савић С. Академија медицинских наука СЛД, 34-47.
- Cleaveland S., Sharp J., Abela-Ridder B., Allan K. J., Buza J., Crump J. A., Davis A., Del Rio Vilas V. J., de Glanville W. A., Kazwala R. R., Kibona T., Lankester F. J., Lugelo A., Mmbaga B. T., Rubach M. P., Swai E. S., Waldman L., Haydon D. T., Hampson K., Halliday J. E. B. (2017): One Health contributions towards more effective and equitable approaches to health in low- and middle-income countries. *Philo. Trans. R. Soc. B.*, 372:20160168.
- De Giusti M., Barbato D., Lia L., Colamesta V., Lombardi A. M., Cacchio D., Villari P., La Torre G. (2019): Collaboration between human and veterinary medicine as a tool to solve public health problems. *Planetary health*; 3(2):e64-e65.
- FAO. (2011): One health: food and agriculture organization of the United Nations strategic action plan. Food and Agriculture Organisation.
- Gibbs S. E. J., Gibbs E. P. J. (2012): The Historical Present, and Future Role of Veterinarians in One Health. In: Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer, 365:31-47.
- Gyles C. (2016): One Medicine, One Health, One World. *CVJ*, 57:345-346.
- Јевтић М., Белић Б, Савић С. (2021): Једно здравље. Академија медицинских наука Српског лекарског друштва, 10(1).
- Jevtic M., Belic B., Glavas-Trbic D. (2020): One Health Approach in Traditional Milk Production as a Part of Steps towards SDGs. *European Journal of Sustainable Development*, 9(1):263.
- Јовановић П. В. (2004): Историја ветеринарске медицине и здравствене културе на тлу данашње Војводине. Матица српска.
- Kahn L. H., Kaplan B., Monath T. P., Steele J. H. (2008): Teaching “One Medicine, One Health”. *Am J Med.*, 121(3):169-70.
- Kahn L. H., Kaplan B., Steele J. H. (2007): Confronting zoonoses through closer collaboration between medicine and veterinary medicine (as ‘one medicine’). *Vet. Ital.*, 43(1):5-19.
-

- Kelly A. M., Ferguson J. D., Galligan D. T., Salman M. Osburn B. I. (2013): One health, food security, and veterinary medicine. *J Am Vet Assoc.*, 242(6):739-743.
- Кировски Д., Плавшић Б. (2019): Концепт једног здравља у ветеринарском образовању. У 30. Јубиларно саветовање ветеринара Србије, Зборник радова, 7-11.
- Mersha C., Tewodors F. (2012): One Health One Medicine One World: Co-joint of Animal and Human Medicine with Prespectives, A review. *Vet. World*, 5(4)238-243.
- Nabarro D. (2012): One health: towards safeguarding the health, food security and economic welfare of communities. *Onderstepoort J Vet Res.*; 79(2):450.
- Natterson-Horowitz B. (2015): A Physician's View of One Health. Challenges and Opportunities. *Vet Sci.*, 2:23-25.
- Nielsen N. O., Buntain B., Stemshorn B., Evans B. (2014): Public policy and veterinary medicine. *Can Vet J.*, 55:389-390.
- Nielsen N. O., Waltner-Toews D., Nishi J. S., Hunter D. B. (2012): Whither ecosystem health and ecological medicine in veterinary medicine and education. *Can Vet J.*, 53:747-753.
- Rabinowitz P. M., Natterson-Horowitz B, J., Kahn L. H., Kock R., Pappaioanou M. (2017): Incorporating one health into medical education. *BMC Med. Educ.*, 17:45.
- Saunders L Z. (1987): From Osler to Olafson. The evolution of veterinary pathology in North America. *Can J Vet Res.*, 51:1-26.
- Saunders L. Z. (2000): Virchow's contributions to veterinary medicine: celebrated then, forgotten now. *Vet Pathol.*, 37:199-207.
- Savić S, Vidić B, Ćirković M, Petrović T, et al. (2014): One Health-Concept for today and tomorrow. *Arhiv veterinarske medicine*;7(2):89-97
- Schultz M. (2008): Rudolf Virchow. *Emerg Infect Dis.*, 14:1480-1481.
- Welburn S. C., Beange I., Ducrotoy M. J., Okello A. L. (2015): The neglected zoonoses--the case for integrated control and advocacy. *Clin. Microbiol. Infect.*, 21:433-443.
- Wilkinson L. (1992): Animals and disease. An introduction to the history of comparative medicine. Cambridge University Press.

Рад примљен: 09.05.2022.

Рад прихваћен: 10.08.2022.



DOI 10.7251/VETJEN2201167B

UDK 636.09:614.31]:619

Review article

**IMPORTANCE OF COLLABORATION BETWEEN PHYSICIANS AND VETERINARIANS IN ONE HEALTH CONCEPT**

**Branislava BELIĆ<sup>1\*</sup>, Marko CINCOVIĆ<sup>1</sup>, Nikolina NOVAKOV<sup>1</sup>,  
Marija JEFTIĆ<sup>2</sup>, Dragana DIMITRIJEVIĆ<sup>3</sup>, Boban ĐURIĆ<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine, Novi Sad, Serbia

<sup>2</sup> Institute of Public Health of Vojvodina, Novi Sad, Serbia

<sup>3</sup> Institute of Public Health of Serbia “Dr Milan Jovanović Batut“, Belgrade, Serbia

<sup>4</sup> Veterinary Directorate, Belgrade, Serbia

Corresponding author: Branislava Belić, drbbelic@gmail.com

**Summary**

Human medicine and veterinary medicine are two areas within medical sciences and there are great opportunities and needs to connect them more closely, especially in the treatment of humans and animals. One health promotes cooperation and connection between physicians and veterinarians, but also environmental experts and other professionals who are important for health. Some experts believe that the progress of this cooperation would be achieved by the education of patients and animal owners about zoonotic diseases of their pets, which should be carried out by physicians and veterinarians. One health has the task of helping the physicians to recognize that a certain disease is not exclusively related to human medicine, but to point out that veterinarians also encounter this disease. Better and closer cooperation between physicians and veterinarians would contribute to both professions to better recognize and treat certain human and animal diseases and prevent and reduce the negative impact of the environment on human and animal health. By introducing the concept of One Health, there are opportunities for better cooperation and mutual work, but at the moment there is still a distance between these two professions. A large number of experts deal with this problem all over the world, and it is considered that a strategy should be made which would eliminate this problem and also contribute to the promotion of the One Health concept. The importance of cooperation between physicians and veterinarians is great, and, nowadays, the contribution of new scientific

knowledge on the examples of different species represents a great challenge for science.

**Keywords:** One health, collaboration, physicians, veterinarians, environment

## INTRODUCTION

The One Health concept includes the health of people and animals as well as the environment that surrounds them. The origin of one medicine and the concept of One Health, the collaboration of physicians and veterinarians, is associated with the German doctor and pathologist Rudolph Virchow, back in the 19<sup>th</sup> century, who discovered the life cycle of trichinella (*Trichinella spiralis*), which enters the human organism after pork meat consumption. He introduced the term zoonosis and pointed out the similarities between humane and veterinary medicine, and stated that there should not be a division between physicians and veterinarians. Back then, there were some conversations related to collaboration between physicians and veterinarians in the treatment of humans and animals (Saunders, 2000; Kahn et al., 2007; Gyles, 2016; Jeftić et al., 2021; Belić et al., 2021).

The thought expressed by Hippocrates (460-367 BC), that when observing people's way of life they should not be observed outside their environment, clearly indicates that even then there was a significant influence of the environment on people's lives. In the old century, Hippocrates and Galen put forward the theory that all organisms are made of four types of fluids, and that an individual's illness is a consequence of the imbalance that occurs between these fluids. In this period, both humans and animals participated in the tests, and they had the same treatment and attention. This theory was valid until the discovery of microbes and modern understandings of the humoral and cellular immune response. In the 18<sup>th</sup> century, Pope Clement XI gave the physician, Giovanni Maria Lancisi (1654-1720), instructions for the fight and measures directed against plague of ruminants, because it was known that is lethal viral disease of animals which significantly affects yields and reduces food supplies. He suggested culling of animals as a method for preventing the spread of the disease. The first veterinary school in Lyon was founded in 1761 to prevent the spread of this dangerous infectious disease. Students in the field of animal health were taught by Claude Bourgelat (1712-1779), and he used the same "pathobiological principles" that were applied in human medicine and dealt with their impact on animal health. After the establishment of the first veterinary school in Lyon, the importance and role of veterinarians increased significantly in society. After the establishment of this school, similar schools were founded in Europe and throughout the world.

---

The concept of One Health continued to be mentioned in the following years until today. William Osler, a Canadian physician and pathologist, who taught medical students at McGill College and veterinary students at the Montreal Veterinary College during the 1870s, established the concept of comparative pathology of animals and humans in the One Health concept, and introduced a unique concept of medicine (Kahn et al., 2007; Kahn, 2008; Schultz, 2008). At the end of the 19<sup>th</sup> century, in their research, Grant and Olsen studied the role of physicians and veterinarians in the prevention of zoonotic diseases in immunocompromised patients and found out that physicians did not talk enough with their patients about these diseases, but also that patients did not recognize veterinarians as experts to treat their illness. They found that the risk of chronically immunocompromised patients who own animals is significantly higher than in immunocompetent individuals. Significant progress could be achieved if physicians and veterinarians would educate their patients or clients about zoonotic diseases of their pets. They believed that medical and veterinary schools should provide their students with knowledge about the way animals and humans influence each other. It is believed that the One Medicine approach was advanced by public health veterinarians, the most prominent of whom was James Harlan Steele (1913-2013), who is today considered to be the father of veterinary public health. In 1947, he founded the Department of Veterinary Public Health at the Center for Infectious Diseases in the USA (History of one health). This organization was concentrated on zoonotic diseases: bovine tuberculosis, brucellosis, rabies and salmonellosis, and applied public health principles to their prevention and eradication. One of the creators of one medicine or the concept of One Health is Calvin Schwabe, who insisted on the cooperation of professionals in human and veterinary medicine in the study of zoonotic diseases, and promoted the prevention in general and prevention of outbreaks of these diseases. During the 19<sup>th</sup> century, cooperation between physicians and veterinarians was very limited and took place only in individual cases.

The term One Medicine has evolved into One Health, which emphasizes the promotion of health rather than the treatment of disease. In the following period of development of this concept, the influence of the environment on health i.e. the influence of factors of the environment on people and animals came up. The One Health Initiative was established in 2006. Nowadays, the concept of One Health and its interest is focused on diseases, which are the result of the interaction between humans and animals. The aim of this concept is to promote the application of an interdisciplinary, multidisciplinary approach to mitigating and reducing existing or potential health risks arising from human interactions. International multidisciplinary scientific communities, political and government

---

leaders, the general public and the media are being educated about the concept of One Health, which help promote the rapid implementation of the concept around the world. The One Health Newsletter, published by the University of Florida, seeks to encourage communication and collaboration among veterinarians, physicians, public health professionals, and environmental scientists and to identify multidisciplinary solutions for these common challenges. Increased interest in One Health appears after conferences in 2011, which were held in the USA, and physicians and veterinarians, who deal with similar diseases in humans and animals, participated in them. The One Health concept has the task to help the physician to recognize that a certain disease is not exclusively related to human medicine, but that also veterinarians deal with it. Conferences and gatherings about One Health aim to move one health from the periphery of human medicine to the central position where it belongs.

Outbreaks of zoonotic diseases, such as SARS, Ebola virus infections and pandemic influenza served to highlight the importance of the One Health concept. One Health needs to be promoted more at the local level, due to the improvement of communication and cooperation between physicians and veterinarians in the exchange of information, knowledge and education about zoonoses and other public health issues. The leading place in promoting the understanding of the ecosystem in veterinary medicine was held by Canadian veterinary schools, which tried to prepare veterinarians to work as part of transdisciplinary teams dealing with the concept of One Health, i.e. the treatment of diseases (Nielsen et al., 2012; Kirovski and Plavšić, 2019). The proposal of Nielsen et al. (2014) was to strengthen the capacities of the veterinary profession at the national level and to allow them a leading role in public policy. Historically speaking, despite the advanced understandings of many scientists, there is a very long way to develop the concept of One Health and the connection and cooperation of physicians and veterinarians.

One Health is considered one of the most important health movements and concepts today. Collaboration between humane and veterinary medicine has the potential to lead to new scientific understandings, create new therapies and change the way physicians, veterinarians and their patients and clients understand health and disease. The concept of One Health has not gained sufficient importance and developed awareness or attraction in humane medical communities. Since its inception, this concept, which was initially called One Medicine, has primarily been guided by the world's veterinary professions. It has been known at medical and veterinary faculties around the world for about 15 years, and comparative medicine has been present on university campuses with veterinary and medical schools for decades longer (Wilkinson, 1992). Although several physicians played

---

a leading role in the concept of One Health, in the United States, despite more than fifteen years of strong growth of the movement, many still have not heard of it. In the world, a large number of physicians are involved in this movement, but it has not yet been given sufficient importance and a sufficient connection between physicians and veterinarians i.e. human and veterinary medicine has not been achieved. In the One Health concept, there are mostly people who work on zoonoses in the field of food safety and infectious diseases. It is known that zoonoses are diseases characteristic for humans and animals, which are transmitted between animals, or from animals to humans. Transmission can be direct or indirect, through a vector or through a contaminated environment (Saunders, 1987).

In order to understand the connection between animals, people and their health, physicians, who are not only infectious disease specialists, should be included in the One Health concept. One of the main challenges of the One Health concept is involving physicians to understand that it is necessary for their daily work. The medical community, to which physicians and health personnel belong, is still largely excluded from the concept of One Health, but without the significant involvement of physicians, nurses and other health workers, its potential cannot be fully realized.

It is necessary for physicians to recognize that the diseases they treat in their patients are often not unique only to humans, that is, that animal health experts have information and knowledge about diseases transmitted by animals, which should be shared with physicians and thereby improve the concept of One Health. There are a large number of possibilities for cooperation, but also a large gap between these two professions (Natterson-Horowitz, 2015).

The concept of One Health is not new, because it is known that the health of people, animals and the ecosystem represent a whole since the emergence of the human species. One Health does not have one concrete and universally accepted definition. The definition of the American Veterinary Medical Association is used the most: One Health is an integrative approach of several different disciplines, which are realized at the local, national and global level in order to maintain optimal health of people, animals and environment. The World Health Organization has defined One Health as an approach for designing and implementing programs, policies, legislation and research, in which multiple sectors communicate and work together to achieve better public health outcomes. One Health implies a series of procedures in everyday practice, which contribute to the health of people and animals. The One Health Department in Sweden and the One Health Initiative Autonomous *Pro Bono* Team presented One Health with a schematic representation of an "umbrella", which covers all the areas that this

---

concept should deal with and clearly focuses on the consequences, reactions and actions on animals - humans - ecosystem and their connection. It focuses especially on zoonoses, both endemic and zoonotic zoonoses, where the former are responsible for a much greater burden of disease in developing countries, with a large social impact in the environment and poor resources (Welburn et al., 2015; Cleaveland et al., 2017).

In addition to human and veterinary medicine, One Health encompasses other disciplines in its concept, including ecology and ecosystem health, social sciences, land use and biodiversity. The veterinary community got involved in the One Health concept very quickly, which was not the case with the medical community. One Health is also supported by the American Medical Association, Public Health England and the World Health Organization. In addition to this support, for a more complete inclusion of the medical community in the future, it will be necessary to include the concept of One Health in the curricula of medical schools and medical study programs, so that they accept Public Health as an important component of public health and infectious diseases (Rabinowitz et al., 2017; Kirovski and Plavšić, 2019).

There is no better qualified profession than the veterinary profession, which through history and training has promoted the interdisciplinary approach of One Health and was a leader in the implementation of the first steps.

Most veterinarians today complete specializations for one type of animal or one sector of the profession, but remain faithful to their oath and perform their practice according to the principles of the One Health concept. One Health represents a systematic approach to different practices, which continues to grow and takes into account ecosystem impacts in addition to zoonoses (Battelli and Mantovani, 2011).

The monitoring of animals and their health condition is the main component of One Health, especially in the detection of new threats that may occur in relation of animals and humans.

Rolf Zinkernagel and Peter C. Doherty, a physician and a veterinarian, discovered that the immune system distinguishes between normal and virally infected cells. In 1996, they received the Nobel Prize in Medical Physiology or Medicine (Nobelpriset i fysiologi eller medicin). This example shows that the concept of One Health is very important for scientific research and practical work of physicians and veterinarians.

One Health is the concept of different disciplines gathered into one perspective, with common solutions for preserving the health of people and animals while preserving the environment, optimal health of people, animals and ecosystems, i.e. the environment (Savić et al., 2014).

---

Throughout history, medical workers have treated people and animals. There is information that in the 18<sup>th</sup> century, physicians took over the care of animal health in the area of Vojvodina. They played an important role in the organization of the veterinary service, because until the second half of the 19<sup>th</sup> century, in addition to humane medicine, they also dealt with the suppression of livestock diseases and veterinary police. Physicians were able to perform this work until 1819, when a regulation was brought for the second time that only those physicians who have a veterinary exam, or who have been trained as a graduate veterinarian at the Veterinary Institute in Vienna, can perform the work of veterinarians. This type of regulation was first brought in 1781, but at that time there was not a sufficient number of physicians with a veterinary exam. At the Veterinary Institute in Vienna, two-year postgraduate studies in veterinary medicine began that year, and physicians and surgeons enrolled in them. After completing their studies, candidates received the title of veterinarian, and from 1833-1857 they received also a master's degree in veterinary medicine. It was not until 1910 in Vojvodina that the health care of domestic animals was completely taken over by academically educated veterinarians, who completed their studies at veterinary faculties or departments of medical faculties in Europe (Jovanović, 2004; Belić, 2014).

The separation of medicine into veterinary and human medicine occurred at different periods in different areas. In less developed countries, this division is not as strict as in developed societies. Today, in most countries, human and veterinary medicine are legally separate fields. In Germany, veterinarians are not allowed to treat people, except in exceptional cases. In less developed countries, this division is only partial, because their traditionalist approach to medical sciences (which values each species equally) exists despite the accepted postulates of modern medicine. In traditional systems and remote areas, local "healers" are the only ones who deal with human and animal health. In developed areas, with all the necessary equipment, medicine is divided into human and veterinary medicine. An important implication of the One Health concept and the approach that this concept has are areas of medicine that deal with drinking water, people's hygiene habits, environmental hygiene, poor and uncontrolled nutrition, as well as the close relationship between people and animals (Jevtic et al., 2020).

In 2018, over 2 million deaths were recorded as a result of zoonotic diseases, while over 2 billion were caused by a zoonotic pathogen.

In this case, veterinarians represent the "first line" for recognizing, diagnosing and responding to these diseases. Man is the host for only 3% of zoonotic pathogens. However, in order to confirm the outbreak of the disease, it is necessary to recognize cases of human illness as well as sick individuals. Effective supervision,

monitoring and disease control requires cooperation between veterinarians and physicians. The increase in the need for food raw materials and their control and quality depend on veterinarians. They are also related to the production of safe, especially microbiologically safe food, which could be a threat and transmit infectious agents to humans (FAO, 2011; Kelly et al., 2013; Nabarro, 2012). Coordination and cooperation of physicians, veterinarians, dentists and biologists leads to better prevention of certain diseases, which is more important than acting on them once they have already developed. Prevention is always a better step than treatment. The effective fight against zoonoses requires the One Health approach and concept, interdisciplinary cooperation for the prevention and control of infectious diseases and epidemics, chronic diseases that attack humans and animals. Physicians, veterinarians, ecologists, environmentalists, laboratory animal experts and other scientific fields must work together and cooperate in order to overcome professional barriers (Mersha and Tewodros, 2012).

Although veterinary medicine represents the leader of the One Health concept, there are justified fears that it will move away from it. Veterinary medicine has good foundations for the promotion, adoption and management of the One Health concept, but it is necessary to introduce professional training and education into the curricula, in order to better implement the One Health concept (Gibbs and Gibbs, 2012).

During their work, veterinarians observe animals and their owners, people, which enables them to be the first to spot diseases with zoonotic potential and to point out that a certain threat exists. They are excellent experts in comparative medicine, zoonoses and public health. Physicians do not pay enough attention and do not undergo serious education in the field of zoonoses and comparative medicine. As a result, veterinarians are in a better position to recognize a threat to public health. In underdeveloped countries and poorer areas, the introduction of the One Health concept can potentially improve effective disease control for humans and animals (Mersha and Tewodros, 2012).

Although the One Health concept is increasingly initiated, many countries of the European Union still do not show serious tendencies towards its adoption and cooperation in various fields. Many countries have introduced the One Health concept in the fight against zoonoses and antimicrobial resistance. In practice, it has been shown that veterinarians better accept and promote this concept, as well as the importance of mutual cooperation, than physicians. The promotion of this concept should help promote a multidisciplinary approach (De Guisti et al., 2019). People have forgotten the catastrophic consequences of zoonotic diseases that occurred in the past. There has been an increase in the occurrence of especially zoonotic diseases in the last few decades. It is not good to ignore the possibility of

---



outbreaks of diseases, and to not systematically fight against them. Bearing in mind that zoonoses have a huge impact on public health, animals and the environment, the importance of the One Health concept should be highlighted and its systematic approach should be applied, which is very important. The interdisciplinary cooperation in the One Health concept is important in reducing threats to global health from infectious diseases.

### CONCLUSION

Better and closer cooperation between physicians and veterinarians and their connection would contribute to both professions to better recognize and treat certain human and animal diseases and to prevent and reduce the negative impact of the environment on human and animal health. By introducing the concept of One Health, there are opportunities for better cooperation and mutual work, but at the moment there is still a distance between these two professions. In the world, a large number of experts deal with this problem and it is considered that a strategy should be made which would eliminate this problem and would also contribute to the promotion of the One Health concept. The importance of cooperation between physicians and veterinarians is great, and the contribution of new scientific knowledge on the example of different species represents a great challenge for science.

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

### REFERENCES

- Battelli G., Mantovani A. (2011): The veterinary profession and one medicine: some considerations with particular reference to Italy, *Vet. Ital.*, 47(4):389-95.
- Belić B. (2014): Zdravstvena kultura Sremskih Karlovaca. Društvo lekara Vojvodine. Srpsko lekarsko društvo.
- Belić B., Cincović M., Novakov N. (2021): Jedno zdravlje – veza humane i veterinarske medicine. U: Jedno zdravlje, ur. Jevtić M., Belić B., Savić S. Akademija medicinskih nauka SLD, 34-47.
- Cleaveland S., Sharp J., Abela-Ridder B., Allan K. J., Buza J., Crump J. A., Davis A., Del Rio Vilas V. J., de Glanville W. A., Kazwala R. R., Kibona T., Lankester F. J., Lugelo A., Mmbaga B. T., Rubach M. P., Swai E. S., Waldman L., Haydon D. T., Hampson K., Halliday J. E. B. (2017): One Health contributions towards more effective and equitable approaches to health in low- and middle-income countries. *Philo. Trans. R. Soc. B.*, 372:20160168.
-

- De Giusti M., Barbato D., Lia L., Colamesta V., Lombardi A. M., Cacchio D., Villari P., La Torre G. (2019): Collaboration between human and veterinary medicine as a tool to solve public health problems. *Planetary health*; 3(2):e64-e65.
- FAO. (2011): One health: food and agriculture organization of the United Nations strategic action plan. Food and Agriculture Organisation.
- Gibbs S. E. J., Gibbs E. P. J. (2012): The Historical Present, and Future Role of Veterinarians in One Health. In: Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer, 365:31-47.
- Gyles C. (2016): One Medicine, One Health, One World. *CVJ*, 57:345-346.
- Jeftić M., Belić B., Savić S. (2021): Jedno zdravlje. Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva, 10(1).
- Jevtic M., Belic B., Glavas-Trbic D. (2020): One Health Approach in Traditional Milk Production as a Part of Steps towards SDGs. *European Journal of Sustainable Development*, 9(1):263.
- Jovanović P. V. (2004): Istorija veterinarske medicine i zdravstvena kultura na tlu današnje Vojvodine. Matica Srpska.
- Kahn L. H., Kaplan B., Monath T. P., Steele J. H. (2008): Teaching “One Medicine, One Health”. *Am J Med.*, 121(3):169-70.
- Kahn L. H., Kaplan B., Steele J. H. (2007): Confronting zoonoses through closer collaboration between medicine and veterinary medicine (as ‘one medicine’). *Vet. Ital.*, 43(1):5-19.
- Kelly A. M., Ferguson J. D., Galligan D. T., Salman M. Osburn B. I. (2013): One health, food security, and veterinary medicine. *J Am Vet Assoc.*, 242(6):739-743.
- Kirovski D., Plavšić B. (2019): Koncept jednog zdravlja u veterinarskom obrazovanju. U 30. Jubilarno savetovanje veterinara Srbije, Zbornik radova, 7-11.
- Mersha C., Tewodors F. (2012): One Health One Medicine One World: Co-joint of Animal and Human Medicine with Perspectives, A review. *Vet. World*, 5(4)238-243.
- Nabarro D. (2012): One health: towards safeguarding the health, food security and economic welfare of communities. *Onderstepoort J Vet Res.*; 79(2):450.
- Natterson-Horowitz B. (2015): A Physician’s View of One Health. Challenges and Opportunities. *Vet Sci.*, 2:23-25.
- Nielsen N. O., Buntain B., Stemshorn B., Evans B. (2014): Public policy and veterinary medicine. *Can Vet J.*, 55:389-390.
-

- Nielsen N. O., Waltner-Toews D., Nishi J. S., Hunter D. B. (2012): Whither ecosystem health and ecological medicine in veterinary medicine and education. *Can Vet J.*, 53:747-753.
- Rabinowitz P. M., Natterson-Horowitz B, J., Kahn L. H., Kock R., Pappaioanou M. (2017): Incorporating one health into medical education. *BMC Med. Educ.*, 17:45.
- Saunders L Z. (1987): From Osler to Olafson. The evolution of veterinary pathology in North America. *Can J Vet Res.*, 51:1-26.
- Saunders L. Z. (2000): Virchow's contributions to veterinary medicine: celebrated then, forgotten now. *Vet Pathol.*, 37:199-207.
- Savić S, Vidić B, Ćirković M, Petrović T, et al. (2014): One Health-Concept for today and tomorrow. *Arhiv veterinarske medicine*;7(2):89-97
- Schultz M. (2008): Rudolf Virchow. *Emerg Infect Dis.*, 14:1480-1481.
- Welburn S. C., Beange I., Ducrotoy M. J., Okello A. L. (2015): The neglected zoonoses--the case for integrated control and advocacy. *Clin. Microbiol. Infect.*, 21:433-443.
- Wilkinson L. (1992): *Animals and disease. An introduction to the history of comparative medicine.* Cambridge University Press.

Paper received: 09.05.2022.

Paper accepted: 10.08.2022.

---

DOI 10.7251/VETJSR2201178V

UDK 636.1:[616.15:577.152.1

**Оригинални научни рад****АКТИВНОСТ СЕЛЕНОЕНЗИМА *GPx-1* И *GPx-3* У КРВИ РАДНИХ КОЊА НА ТЕРИТОРИЈИ ЦЕНТРАЛНЕ СРБИЈЕ****Оливера ВАЛЧИЋ\*, Петар МИЛОСАВЉЕВИЋ, Иван ЈОВАНОВИЋ,  
Светлана МИЛАНОВИЋ**

Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

\* Коресподентни аутор: Оливера Валчић, olja@vet.bg.ac.rs

**Сажетак**

Глутатион пероксидаза (GPx) је ензим који постоји у 8 изоензимских облика, од којих GPx-1 је облигаторни интрацелуларни ензим, док је GPx-3 активна у екстрацелуларним течностима, посебно у крвној плазми. Основна улога GPx се огледа у заштити ћелија од оксидативног стреса којег индукују слободни кисеонични радикали. Активност GPx се узима као поуздан индикатор статуса селена у организму људи и животиња. Основни пут уноса селена у организам је преко ланца исхране. Унети селен се уграђује у облику селенометионина и селеноцистеина у ткивне протеине, односно ензиме. У Србији су извршена темељна испитивања садржаја селена у хранивима и домаћим животињама, посебно код економски значајних врста као што су живина, свиње, овце и говеда. Међутим, до сада нису детаљно испитани радни хладнокрвни коњи, посебно они који се хране искључиво локално узгајаним хранивима, или су на испаша. Услед специфичног начина држања они су идеални индикатори статуса селена моногастричних биљоједа на датом локалитету.

Циљ нашег истраживања је био да одредимо статус селена на основу активности GPx-1 и GPx-3 у узорцима крви несуплементираних радних коња на територији централне Србије.

У нашем истраживању укупно је испитано 12 узорака крви коња преузетих са локалитета општина Краљево, Зајечар, Ваљево и Димитровград, и то: 12 узорака крвне плазме и 12 узорака испраних еритроцита. Мерење активности GPx-3 и GPx-1 је вршено методом по Гунцлеру на таласној дужини од 366nm. Приликом узорковања за свако грло су евидентирани подаци о полу, старости, вакцинацији и дехелминтизацији, саставу и пореклу датих хранива.

Просечна активност *GPx-1* је  $502,02 \pm 91,77 \mu\text{Kat/l}$ , а *GPx-3*  $3,46 \pm 1,02 \mu\text{Kat/l}$  што указује на постојање маргиналног дефицита селена у популацији несуплементираних радних коња на територији централне Србије.

**Кључне речи:** *GPx*, коњи, селен, Србија.

## УВОД

Метаболизам селена је врло комплексан јер је овај микроелемент за организам есенцијалан, али и потенцијално врло токсичан. Домаће и дивље животиње уносе селен преко хране. Садржај селена у хранивима биљног порекла зависи од бројних фактора међу којима се истичу: састав и карактеристике земљишта, хемијског облика селена у земљишту, количине селена у земљишту, врсте биљке као и фазе раста саме биљке. У свету је дефинисано неколико селендефицирних подручја, а једно од њих је и део Балканског полуострва (Валчић и сар., 2013).

Основна улога селена се огледа у заштити од оксидативног стреса и неутрализацији насталих слободних кисеоничних радикала преко деловања *GPx*. *GPx* се састоји од четири идентичне субјединице чије се појединачне молекулске масе крећу од 18000 до 23000 уз постојање стехиометријског односа од четири грам-атома селена по молу ензима. *GPx* је врло специфична према донару водоника (редуковани глутатион), а неспецифична према супстрату који редукује. Осим у разлагању водоник пероксида, ензим учествује у редукцији хидропероксида различитих органских једињења (масних киселина, нуклеинских киселина, тимина, простагландина, итд.) у одговарајуће алкоhole.

Физиолошки ефектори функције селена су селенопротеини, односно селеноензими- глутатион пероксидазе (*GPx*-, *EC 1.11.19*), а поред глутатион пероксидаза селен је присутан у јодтиронин дејодинази која има улогу у конверзији тироксина (Т4) у биолошки активан 3,3', 5-тријодтиронин (Т3). Миодегенерација позната као болест белих мишића (White muscle disease - WMD) је најчешће обољење домаћих животиња, укључујући и коње, које настаје као последица изразитог дефицита селена. Маргинални дефицит код коња доводи до неплодности кобила и успореног раста ждребади (Savage и Lewis, 2002).

У свету и Европи су описана подручја изразитог дефицита овог микроелемента. Познато је да је дефицит селена најизраженији у Кини, северозападу и југоистоку САД, а у Србији на подручју Сјеничко-Пештерске висоравни. Истраживања спроведена у претходне две деценије у Србији (Валчић и сар., 2013) су показала да је просечан садржај селена у

биљним хранивима на подручју Републике Србије у интервалу од маргинално дефицитарног до дефицитарног, при чему је ситуација најповољнија у Војводини.

Статус селена код домаћих животиња може да се процени на основу директног одређивања селена у узорцима крви, или индиректно на основу активности ензима GPx.

GPx-1 је облигатни интрацелуларни ензим док је GPx-3 присутна у ванћелијском простору, посебно у крвној плазми. Бројни аутори су установили да су концентрација селена у крви и активност глутатион пероксидазе у пуној крви у високој корелацији која се креће у интервалу од  $r=0,70$  до  $r=0,93$  и то код свих врста домаћих животиња храњених хранивима која садрже селен у концентрацијама које су успод токсичних доза (Wolff и сар., 2017; Pavlata и сар., 2000; Maylin и сар., 1980; Blackmore и сар., 1982; Carle и сар., 1978).

Процена статуса селена коња на основу активности GPx у крви сматра се поузданом и осетљивом методом. Селен се уграђује у еритроците током еритропоезе и активност GPx-1 се сматра показатељем дуготрајног уноса селена, док активност плазматске GPx-3 је првенствено индикатор краткорочног статуса селена (Harris, 1998). Досадашња истраживања Maas и сар. (1996) и Blackmore и Brobst (1981) наводе да се могу сматрати физиолошким вредности активности GPx пуне крви коња у интервалу од 300 до 600  $\mu\text{Kat/l}$ .

На подручју Србије су вршена само спорадична испитивања статуса селена и активности GPx код пунокрвних спортских коња који су у интензивном узгоју (Михаиловић и сар., 1996). Међутим, до дана данашњег нису спроведена испитивања статуса селена радних несуплементираних коња.

Овај рад представља прво прелиминарно испитивање активности GPx-1 и GPx-3 у циљу одређивања статуса селена радних, несуплементираних, хладнокрвних коња на територији централне Србије.

## МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

У истраживању укупно је испитано 12 узорака крви коња из централне Србије (Краљево, Зајечар, Ваљево и Димитровград), и то: 12 узорака крвне плазме и 12 узорака испраних еритроцита. Узорковању крви је предходило клинички преглед, како би у студију била укључена само грла која су здрава и која у предходним месецима нису била под терапијом. Истовремено, одабрана су искључиво грла која нису у протеклих 12 месеци добијала витаминско-минералне суплементе пероралним или парентералним путем, а

храњена су искључиво локално узгајаним хранивима или напасана на локалним пашњацима.

Крвна плазма је издвојена центрифуговањем хепаринисаних узорака крви на 1000 x g у трајању од 20 минута. Узорци испраних еритроцита су добијени из узорака пуне крви након троструког испирања еритроцита физиолошким раствором и троструким центрифугирањем. Узорци су транспортовани у хладном ланцу, а одмах по пријему су складиштени у замрзивачу на -18°C.

Коњима је у сврху узимања узорака крви вршена венепункција *v. jugularis* уз пристанак власника и уз поштовање свих мера добре ветеринарске праксе.

Активност цитосолне глутатион пероксидазе (*GPx1*) и глутатион пероксидазе крвне плазме (*GPx3*) одређивана је методом по Günzler и сар. (1984) на спектрофотометру Cecil 2000, са воденим купатилом и термостатом који је одржавао константну температуру од 37°C. Принцип овог мерења је заснован на спектрофотометријском регистровању потрошње NADPH у куплованом ензимском систему.

Састав као и коначне концентрације реагенаса су приказане у Табели 1.

**Табела 1** Састав реагенаса који су коришћени 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	6 mmol/L
Глутатион редуктаза (GR)	50	0,375 IU/mL
Узорак крвне плазме	20	
или		
Узорак хемолизата еритроцита*	10	
10 минута преинкубација на 37 °C		
NADPH 3 mmol/L у 0,1% NaHCO <sub>3</sub>	200	0,3 mmol/L
TBH	550	1,575 mmol/L
Редестилована вода	480 (за узорак плазме); 490 (за узорак еритроцита)	-

\*Хемолизат се припрема додатком 10µl испраних еритроцита у 200µl Драбкиновог реагенаса

За статистичку обраду података коришћени су програми MS Excel 2007 и GraphPadPrism5.

Резултати су приказани коришћењем параметара дескриптивне статистике ( $\bar{X}$ , SD и CV%).

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Активност цитосолне глутатион пероксидазе (*GPx1*) у испраним еритроцитима испитиваних коња се кретала у интервалу од 288,48 до 632,12  $\mu\text{Kat/l}$ . Статистички посматрано испитивана група је била хомогена обзиром да је коефицијент варијације износио 21,7%. Просечна активност *GPx1* је била  $\bar{X}_{\text{cp}}=502,02 \mu\text{Kat/l}$ , а стандардна девијација  $SD=108,96$  (Табела 2).

Активност глутатион пероксидазе (*GPx3*) у крвној плазми испитиваних коња била је у интервалу од 2,42 до 5,35  $\mu\text{Kat/l}$ . Статистички посматрано испитивана група је била хомогена обзиром да је коефицијент варијације износио <30%. Просечна активност *GPx3* је била  $\bar{X}_{\text{cp}}=3,46 \mu\text{Kat/l}$ , а стандардна девијација  $SD=1,02$  (Табела 2).

Активност *GPx3* је показатељ статуса краткорочног уноса селена у организам. Поред селеноензима у плазми је присутно више од 20 различитих селенопротеина (Круиков и сар., 2003) који по својој функцији могу бити антиоксиданси, регулатори редокс реакција, учесници метаболизма тиреоидних хормона, транспортни протеини итд. Код домаћих животиња више од 98% активности *GPx* је смештено у еритроцитима, што је у складу са нашим резултатима.

**Табела 2** Активност *GPx-1* и *GPx-3* у узорцима крви радних коња на подручју централне Србије

	<b>Xsr</b>	<b>SD</b>	<b>CV%</b>	<b>Iv</b>
<i>GPx-1</i> ( $\mu\text{Kat/l}$ ) (n=12)	502,02	108,96	21,70	288,48-632,12
<i>GPx-3</i> ( $\mu\text{Kat/l}$ ) (n=12)	3,46	1,02	29,50	2,42-5,35

До данас нису успостављене прецизне референтне вредности активности *GPx* у крви животиња. Наиме, у литератури се наводе широки интервали активности *GPx* у крви коња, тако да Maas и сар. (1996) наводе вредности у интервалу од 80 до 500  $\mu\text{Kat/l}$  док Blood и Radostits (1989) сматрају да су референтне физиолошке вредности знатно више и износе од 500 до 2500  $\mu\text{Kat/l}$ . Додатни проблем приликом дефинисања препоручених референтних вредности активности *GPx* представља недостатак усаглашености јединица преко којих се одређује активност овог селеноензима, тако да се често активност *GPx* изражава и преко IU (интернационалних јединица),  $\mu\text{mol/ml/min}$ ,  $\text{Ug/Hb}$ ,  $\text{Ug/prot}$ , итд., што додатно отежава међулабораторијско поређење добијених вредности.



Приликом тумачења добијених вредности у нашем истраживању треба имати у виду да смо активност GPx-1 одређивали у узорцима испраних еритроцита, а не у узорцима пуне крви као што се често приказује у литератури, те је неопходно екстраполирати резултате на вредности пуне крви на основу хематокрита крви коња. Оваквav прилаз је у потпуности оправдан уколико имамо у виду да је учешће крвне плазме у активности GPx изузетно ниско (<1%) и да нема значајан утицај на укупну активност GPx у крви. Сва грла која су била укључена у наше истраживање су била клинички здрава, без знакова анемије, дехидратације, ендopаразитоза и других здравствених проблема који би могли да указују на евентуално постојање поремећаја хематокрита (хеморагије, дехидратација и сл.). Узимајући у обзир да је просечан физиолошки хематокрит крви одраслих коња 0,35 (Salamari и сар., 2009) можемо да на основу постављене математичке пропорције изведемо закључак да се вредности GPx у пуној крви коња на подручју централне Србије крећу у интервалу од 101-221  $\mu\text{Kat/l}$ , што јасно указује да се радни коњи на подручју централне Србије налазе у зони маргиналног дефицита овог микроелемента.

Слични резултати су забележени и на подручју Републике Чешке где је у узорцима пуне крви 159 одраслих коња измерена активност GPx износила 286,43  $\mu\text{Kat/l}$  (Ludvikova и сар., 2005). У наведеном истраживању аутори су одредили постојање високог коефицијента корелације ( $r= 0,84$ ) између измерених активности GPx и концентрације селена у крви, чиме се додатно потврђује валидност мерења активности GPx у циљу одређивања статуса селена коња. Истовремено, горе поменута група аутора је испитивала линеарност односа и корелацију између активности GPx и концентрације селена у циљу одређивања граничних вредности активности које указују на статус дефицита селена. Утврдили су да се вредности активности GPx које превазилазе 200  $\mu\text{Kat/l}$  могу сматрати адекватним, као и да се оне постижу при садржају селена у пуној крви >75  $\mu\text{g/l}$  вредности у интервалу од 100 до 200  $\mu\text{Kat/l}$  маргиналним, а вредности активности GPx <100  $\mu\text{Kat/l}$  аутори су дефинисали као неадекватним тј. дефицитарним.

Интересантно је овом приликом напоменути да су сви коњи који су били укључени у наше испитивање били несуплементирани радни коњи који су били редовно изложени одређеном степену физичког напора, било у раду под самаром, или као рекреативни или запрежни коњи. Бројни аутори (Ott и сар., 2022; Mami и сар., 2019; Gondim и сар., 2009) истичу да је физички напор један од окидача оксидативног стреса посебно код коња који су изложени интензивном напору приликом такмичења у издржљивости (ендјуранс трке). Једна од основних предности нашег истраживања се огледа

у чињеници да смо испитали статус GPx у категорији коња која до сада није проучавани у нашем поднебљу, а то су несуплементирани радни коњи који су храњени искључиво локално узгајаним хранивима, што нам омогућава увид у реално стање на терену. Свакако да би испитивања требало проширити на остала подручја у циљу обезбеђивања меродавних података на основу којих ћемо моћи да дамо препоруке о евентуалној суплементацији селеном радних коња на територији Републике Србије.

### Захвалница

Рад је подржан средствима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Уговор број 451-03-68/2022-14/200143).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

### ЛИТЕРАТУРА

- Blackmore D. J., Brobst D. (1981): Biochemical values in equine medicine. *The Animal Health Trust*, 108.
- Blackmore D. J., Campbell C., Dant C., Holden J. E., Kent J. E. (1982): Selenium status of thoroughbreds in the United Kingdom. *Equine Vet J.*, 14:139-143.
- Blood D.C., Radostits O. M. (1989): Veterinary medicine. A textbook of the disease of cattle, sheep, pigs and horses. 7th ED. Book Society/Balliere Tindall, 1502.
- Calamari L., Ferrari A., Bertin G. (2009): Effect of Selenium Source and Dose on Selenium Status of Mature Horses. *J. Anim. Sci.*, 87:167-178.
- Caple I. W., Edwards S. J. A., Forsyth W. M., Whiteley P., Selth R. H., Fulton L. J. (1978): Blood glutathione peroxidase activity in horses in relation to muscular dystrophy and selenium nutrition. *Aust Vet J.*, 54:57-60.
- Gondim F. J., Zoppi C. C., Silveira L. R., Silva D. P., Macedo D. V. (2009): Possible Relationship Between Performance and Oxidative Stress in Endurance Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(4):206-212.
- Günzler W. A., Steffens G. J., Grossman A., Kim S. M. A., Otting F., Wendel A., Flohe L. (1984): The aminoacid sequence of a bovine glutathione peroxidase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, 365(2):195-212.
- Harris A. P. (1998): Musculoskeletal Disease. In: Equine internal medicine. Eds. Reed S. M., Bayly W. M., W. B. Saunders Company, 371-426.
- Kryukov G. V., Castellano S., Novoselov S., Lobanov A., Zehtab O., Guigo R., Gladyshev V. (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300(5624):1439-43.
- Ludvikova E., Pavlata L., Vyskočil M., Jahn P. (2005): Selenium Status of Horses in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, 74:369-375.
-

- Maas J., Parish S. M., Hodgson D. R., Valberg S. J. (1996): Nutritional myodegeneration. In: Large animal internal medicine. Eds. Smith B. P., Mosby, 1513-1518.
- Mami S., Khoje G., Sharishiori A., Goozaninejad S. (2019): Evaluation of Biological Indicators of Fatigue and Muscle Damage in Arabian Horse after Race. *Journal of Equine Veterinary Science*, 78:74-78.
- Maylin G. A., Rubin D. S., Lein D. H. (1980): Selenium and vitamin E in horses. *Cornell Vet.*, 70(3):272-289.
- Mihailovic M., Ilić V., Lindberg P. (1996): Blood glutathione peroxidase activity, selenium and vitamin E concentrations of race horses in Serbia. *Acta Vet Beograd*, 46:27-32.
- Ott E. C., Cavinder C. A., Wang S., Smith., Lemley O. C., Dinh T. T. N. (2022): Oxidative stress biomarkers and free aminoacid concentrations in the blood plasma of moderately exercised horses indicate adaptive response to prolonged training. *Journal of Animal Science*, 100(4):skac 086.
- Pavlata L., Pechova A., Illek J. (2000): Direct and indirect assessment of status in cattle – a comparison. *Acta Vet Brno*, 69:281-287.
- Savage C. J., Lewis L. D. (2002): Selenium. In: Adams lameness in horses. Eds. Stashak T. S., Lippincott Williams & Wilkins, 380-382.
- Valčić O., Jovanović I., Milanović S., Gvozdić D. (2013): Selenium status of feedstuffs and grazing ewes in Serbia. *Acta veterinaria*, 63(5-6):665-675.
- Wolff F., Moschos A., Koller G., Bauer A., Vervuert I. (2017): Serum selenium concentration and whole blood glutathione peroxidase activity in healthy adult horses. *Tierarztl Prx Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 45(6):332-369.

Рад примљен: 27.07.2022.

Рад прихваћен: 29.08.2022.

---

DOI 10.7251/VETJEN2201186V

UDK 636.1:[616.15:577.152.1

### Original Scientific Paper

## ACTIVITY OF SELENENZYMES GPx-1 AND GPx-3 IN THE BLOOD OF WORKING HORSES IN THE TERRITORY OF CENTRAL SERBIA

**Olivera VALČIĆ\*, Petar MILOSAVLJEVIĆ, Ivan JOVANOVIĆ, Svetlana MILANOVIĆ**

University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

\* Corresponding author: Olivera Valčić, olja@vet.bg.ac.rs.

### Summary

Glutathione peroxidase (GPx) is an enzyme that has 8 isoenzyme forms, of which GPx-1 is an obligatory intracellular enzyme, while GPx-3 is active in extracellular fluids, especially in blood plasma. The main role of GPx is the protection of cells from oxidative stress induced by free oxygen radicals. GPx activity is taken as a reliable indicator of selenium status in the human and animal organism. Selenium is introduced in organism mainly through the food chain. Ingested selenium is incorporated in the form of selenomethionine and selenocysteine into tissue proteins, i.e. enzymes. Detailed investigation related to the content of selenium in feed and domestic animals were carried out in Serbia, especially in economically significant species such as poultry, pigs, sheep and cattle. However, working cold-blooded horses, especially those that are fed exclusively with locally grown feed, or are on pasture, have not been examined in detail so far. Due to their specific way of breeding, they are ideal indicators of the selenium status of monogastric herbivores in a given locality.

The goal of our study was to determine the status of selenium based on the activity of GPx-1 and GPx-3 in blood samples of non-supplemented working horses in the territory of central Serbia.

In our study, a total of 12 samples of horse blood taken from the localities of the municipalities of Kraljevo, Zaječar, Valjevo and Dimitrovgrad were tested as follows: 12 samples of blood plasma and 12 samples of washed erythrocytes. Measurement of GPx-3 and GPx-1 activity was carried out using the Guncler method at a wavelength of 366 nm. For each animal, during sampling, data on gender, age, vaccination and deworming, composition and origin of the given nutrients were recorded.

---

The average activity of GPx-1 was  $502.02 \pm 91.77$   $\mu$ Kat/l, and GPx-3  $3.46 \pm 1.02$   $\mu$ Kat/l, which indicates the existence of a marginal selenium deficit in the population of unsupplemented working horses in the territory of central Serbia.

**Keywords:** GPx, horses, selenium, Serbia.

## INTRODUCTION

The metabolism of selenium is very complex because this trace element is essential for the organism, but also potentially very toxic. Domestic and wild animals ingest selenium through food. The content of selenium in nutrients of plant origin depends on numerous factors, among which stand out: the composition and characteristics of the soil, the chemical form of selenium in the soil, the amount of selenium in the soil, the type of plant and the growth phase of the plant itself. Several selenium deficient areas have been defined in the world, and one of them is part of the Balkan Peninsula (Valčić et al., 2013).

The main role of selenium is the protection against oxidative stress and the neutralization of the generated free oxygen radicals through the action of GPx. GPx consists of four identical subunits whose individual molecular masses range from 18,000 to 23,000 with a stoichiometric ratio of four gram-atoms of selenium per mole of enzyme. GPx is very specific towards the hydrogen donor (reduced glutathione) and non-specific towards the reducing substrate. In addition to the decomposition of hydrogen peroxide, the enzyme participates in the reduction of hydroperoxides of various organic compounds (fatty acids, nucleic acids, thymine, prostaglandins, etc.) into the corresponding alcohols.

Physiological effectors of selenium function are selenoproteins, or selenoenzymes - glutathione peroxidase (GPx-, EC 1.11.19), and in addition to glutathione peroxidase, selenium is present in iodothyronine deiodinase, which plays a role in the conversion of thyroxine (T<sub>4</sub>) into biologically active 3,3',5 - triiodothyronine (T<sub>3</sub>). Myodegeneration known as White muscle disease (WMD) is the most common disease of domestic animals, including horses, which occurs as a result of a pronounced selenium deficiency. Marginal deficiency in horses leads to infertility in mares and slower growth in foals (Savage and Lewis, 2002).

Areas of pronounced deficit of this microelement have been described in the world and in Europe. It is known that the selenium deficit is most pronounced in China, the North-West and South-East of the USA, and in Serbia in the area of the Sjenica-Pešter Plateau. Research conducted in the previous two decades in Serbia (Valčić et al., 2013) showed that the average content of selenium in plant foods in the territory of the Republic of Serbia is in the interval from marginally deficient to deficient, where the situation is most favorable in Vojvodina.

---

Selenium status in domestic animals can be assessed based on the direct determination of selenium in blood samples, or indirectly based on the activity of the enzyme GPx.

GPx-1 is an obligatory intracellular enzyme, while GPx-3 is present in the extracellular space, especially in the blood plasma. Numerous authors have established that the concentration of selenium in the blood and the activity of glutathione peroxidase in whole blood are highly correlated, ranging from  $r=0.70$  to  $r=0.93$ , in all types of domestic animals fed with feed containing selenium in concentrations below toxic doses (Wolff et al., 2017; Pavlata et al., 2000; Maylin et al., 1980; Blackmore et al., 1982; Caple et al., 1978).

Assessment of selenium status of horses based on GPx activity in blood is considered a reliable and sensitive method. Selenium is incorporated into erythrocytes during erythropoiesis and GPx-1 activity is considered an indicator of long-term selenium intake, while plasmatic GPx-3 activity is primarily an indicator of short-term selenium status (Harris, 1998). Previous research by Maas et al. (1996) and Blackmore and Brobst (1981) state that physiological values of GPx activity in horse whole blood can be considered in the range of 300 to 600  $\mu\text{Kat/l}$ .

In the territory of Serbia, only sporadic tests of selenium status and GPx activity were performed in thoroughbred sports horses that are intensively bred (Mihailović et al., 1996). However, to date, no tests have been conducted on the selenium status of non-supplemented working horses.

This work represents the first preliminary examination of GPx-1 and GPx-3 activity in order to determine the selenium status of working, non-supplemented, cold-blooded horses in the territory of central Serbia.

## MATERIALS AND METHODS

In the study, a total of 12 horse blood samples from central Serbia (Kraljevo, Zaječar, Valjevo and Dimitrovgrad) were tested, as follows: 12 blood plasma samples and 12 washed erythrocyte samples. A clinical examination was obtained before the blood sampling, so that only animals that were healthy and that had not been under therapy in the previous months were included in the study. At the same time, only those animals that did not receive vitamin-mineral supplements orally or parenterally in the past 12 months were selected, and were fed exclusively with locally grown feed or grazed on local pastures.

Blood plasma was separated by centrifugation of heparinized blood samples at  $1000 \times g$  for 20 minutes. Samples of washed erythrocytes were obtained from whole blood samples after triple washing of erythrocytes with physiological

---

solution and triple centrifugation. The samples were transported to the laboratory in a cold chain, and immediately stored in a freezer at  $-18^{\circ}\text{C}$ .

In order to take blood samples, horses were subjected to venipuncture of the jugular vein with the owner's consent and in compliance with all measures of good veterinary practice.

The activity of cytosolic glutathione peroxidase (GPx1) and blood plasma glutathione peroxidase (GPx3) was determined by the method of Günzler et al. (1984) on a Cecil 2000 spectrophotometer, with a water bath and a thermostat that maintained a constant temperature of  $37^{\circ}\text{C}$ . The principle of this measurement is based on the spectrophotometric recording of NADPH consumption in the coupled enzyme system.

The composition and final concentrations of the reagents are shown in Table 1.

**Table 1** Composition of reagents used for spectrophotometric determination of GPx activity

Reagents	Volume ( $\mu\text{l}$ )	Final concentration
Potassium phosphate buffer (400 mmol/L, pH 7)	500	100 mmol/L
GSH (604 mmol/L)	200	6 mmol/L
Glutathione reductase (GR)	50	0.375 IJ/mL
Blood plasma sample	20	
or		
Erythrocyte hemolysate sample*	10	
10 minutes preincubation on $37^{\circ}\text{C}$		
NADPH 3 mmol/L in 0,1% $\text{NaHCO}_3$	200	0.3 mmol/L
TBH	550	1.575 mmol/L
Redistilled water	480 (for a plasma sample); 490 (for a erythrocyte sample)	-

\* Hemolysate is prepared by adding 10  $\mu\text{l}$  of washed erythrocytes to 200  $\mu\text{l}$  of Drabkin's reagent.

MS Excel 2007 and GraphPadPrism5 programs were used for statistical data processing.

Results are presented using descriptive statistics parameters (Mean, SD and CV%).

## RESULTS AND DISCUSSION

The activity of cytosolic glutathione peroxidase (GPx1) in the washed erythrocytes of the tested horses ranged from 288.48 to 632.12  $\mu$ Kat/l. Statistically, the examined group was homogeneous, given that the coefficient of variation was 21.7%. The average activity of GPx1 was Mean=502.02  $\mu$ Kat/l, and the standard deviation SD=108.96 (Table 2).

The activity of glutathione peroxidase (GPx3) in the blood plasma of the examined horses was in the interval from 2.42 to 5.35  $\mu$ Kat/l. Statistically, the examined group was homogeneous considering that the coefficient of variation was <30%. The average activity of GPx3 was Mean=3.46  $\mu$ Kat/l, and the standard deviation SD=1.02 (Table 2).

GPx3 activity is an indicator of the status of short-term selenium intake in the organism. In addition to selenoenzymes, more than 20 different selenoproteins are present in the plasma (Kryukov et al., 2003), which, according to their function can be antioxidants, regulators of redox reactions, participants in the metabolism of thyroid hormones, transport proteins, etc. In domestic animals, more than 98% of GPx activity is located in erythrocytes, which is consistent with our results.

**Table 2** Activity of GPx-1 and GPx-3 in blood samples of working horses in central Serbia

	Mean	SD	CV%	Iv
GPx-1 ( $\mu$ Kat/l) (n=12)	502.02	108.96	21.70	288.48-632.12
GPx- 3 ( $\mu$ Kat/l) (n=12)	3.46	1.02	29.50	2.42-5.35

To date, precise reference values for GPx activity in animal blood have not been established. Namely, the literature indicates wide intervals of GPx activity in horse blood, as Maas et al. (1996) gave values in the interval from 80 to 500  $\mu$ Kat/l, while Blood and Radostits (1989) believe that the reference physiological values are significantly higher and amount to 500 to 2500  $\mu$ Kat/l. An additional problem when defining the recommended reference values of GPx activity is the lack of conformity of the units through which the activity of this selenoenzyme is determined, so that GPx activity is often expressed through IU (international units),  $\mu$ mol/ml/min, Ug/Hb, Ug/prot, etc., which further complicates the inter-laboratory comparison of the obtained values.

When interpreting the values obtained in our study, it should be considered that GPx-1 activity was determined in washed erythrocyte samples, not in whole blood samples as is often shown in the literature, and it is necessary to extrapolate the results to whole blood values based on blood hematocrit in a horse. This approach is fully justified if we understand that the participation of blood plasma in GPx



activity is extremely low (<1%) and that it has no significant effect on the overall activity of GPx in the blood. All the animals that were included in our study were clinically healthy, without signs of anemia, dehydration, endoparasitosis and other health problems that could indicate the possible existence of hematocrit disorders (hemorrhages, dehydration, etc.). Taking into account that the average physiological hematocrit of the blood of adult horses is 0.35 (Calamari et al., 2009), we can conclude, based on the set mathematical proportion, that GPx values in the whole blood of horses in central Serbia range from 101 to 221  $\mu\text{Kat/l}$ , which clearly indicates that working horses in the area of central Serbia are in the zone of marginal deficit of this microelement.

Similar results were recorded in the territory of the Czech Republic, where the GPx activity measured in whole blood samples of 159 adult horses was 286.43  $\mu\text{Kat/l}$  (Ludvikova et al., 2005). In the aforementioned study, the authors determined the high correlation coefficient ( $r= 0.84$ ) between measured GPx activity and blood selenium concentration, which further confirms the validity of measuring GPx activity in order to determine the selenium status of horses. At the same time, the aforementioned group of authors examined the linearity of the relationship and the correlation between GPx activity and selenium concentration in order to determine the limit values of activity that indicate the status of selenium deficiency. They determined that GPx activity values exceeding 200  $\mu\text{Kat/l}$  can be considered adequate, as well as that they are achieved with selenium content in whole blood  $>75 \mu\text{g/l}$ . According to those authors, values in the interval from 100 to 200  $\mu\text{Kat/l}$  are marginal, and GPx activity values  $<100 \mu\text{Kat/l}$  are inadequate, i.e. deficient.

It is interesting to note that all the horses that were included in our study were non-supplemented working horses that were regularly exposed to a certain degree of physical effort, either in work under saddle, or as recreational or harness horses. Numerous authors (Ott et al., 2022; Mami et al., 2019; Gondim et al., 2009) point out that physical effort is one of the triggers of oxidative stress, especially in horses that are exposed to intense effort during endurance competitions i.e. endurance races. One of the main advantages of our study is the fact that we examined the status of GPx in a category of horses that has not been studied so far in our climate, namely non-supplemented working horses that are fed exclusively with locally grown feed, which allows us to understand the real situation in the field. Certainly, the tests should be extended to other areas in order to provide more reliable data on the basis of which we will be able to make recommendations on possible selenium supplementation of working horses on the territory of the Republic of Serbia.

---

## Acknowledgments

The study is supported by the funds of the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Contract number 451-03-68/2022-14/200143).

Conflict of interest statement: The authors declare that there is no conflict of interest.

## REFERENCES

- Blackmore D. J., Brobst D. (1981): Biochemical values in equine medicine. *The Animal Health Trust*, 108.
- Blackmore D. J., Campbell C., Dant C., Holden J. E., Kent J. E. (1982): Selenium status of thoroughbreds in the United Kingdom. *Equine Vet J.*, 14:139-143.
- Blood D.C., Radostits O. M. (1989): Veterinary medicine. A textbook of the disease of cattle, sheep, pigs and horses. 7th ED. Book Society/Balliere Tindall, 1502.
- Calamari L., Ferrari A., Bertin G. (2009): Effect of Selenium Source and Dose on Selenium Status of Mature Horses. *J. Anim. Sci.*, 87:167-178.
- Caple I. W., Edwards S. J. A., Forsyth W. M., Whiteley P., Selth R. H., Fulton L. J. (1978): Blood glutathione peroxidase activity in horses in relation to muscular dystrophy and selenium nutrition. *Aust Vet J.*, 54:57-60.
- Gondim F. J., Zoppi C. C., Silveira L. R., Silva D. P., Macedo D. V. (2009): Possible Relationship Between Performance and Oxidative Stress in Endurance Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(4):206-212.
- Günzler W. A., Steffens G. J., Grossman A., Kim S. M. A., Otting F., Wendel A., Flohe L. (1984): The aminoacid sequence of a bovine glutathione peroxidase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, 365(2):195-212.
- Harris A. P. (1998): Musculoskeletal Disease. In: Equine internal medicine. Eds. Reed S. M., Bayly W. M., W. B. Saunders Company, 371-426.
- Kryukov G. V., Castellano S., Novoselov S., Lobanov A., Zehtab O., Guigo R., Gladyshev V. (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300(5624):1439-43.
- Ludvikova E., Pavlata L., Vyskočil M., Jahn P. (2005): Selenium Status of Horses in the Czech Republic. *Acta Vet. Brno*, 74:369-375.
- Maas J., Parish S. M., Hodgson D. R., Valberg S. J. (1996): Nutritional myodegeneration. In: Large animal internal medicine. Eds. Smith B. P., Mosby, 1513-1518.
- Mami S., Khoje G., Sharishiori A., Goozaninejad S. (2019): Evaluation of Biological Indicators of Fatigue and Muscle Damage in Arabian Horse after Race. *Journal of Equine Veterinary Science*, 78:74-78.
-

- Maylin G. A., Rubin D. S., Lein D. H. (1980): Selenium and vitamin E in horses. *Cornell Vet.*, 70(3):272-289.
- Mihailovic M., Ilić V., Lindberg P. (1996): Blood glutathione peroxidase activity, selenium and vitamin E concentrations of race horses in Serbia. *Acta Vet Beograd*, 46:27-32.
- Ott E. C., Cavinder C. A., Wang S., Smith., Lemley O. C., Dinh T. T. N. (2022): Oxidative stress biomarkers and free aminoacid concentrations in the blood plasma of moderately exercised horses indicate adaptive response to prolonged training. *Journal of Animal Science*, 100(4):skac 086.
- Pavlata L., Pechova A., Illek J. (2000): Direct and indirect assessment of status in cattle – a comparison. *Acta Vet Brno*, 69:281-287.
- Savage C. J., Lewis L. D. (2002): Selenium. In: Adams lameness in horses. Eds. Stashak T. S., Lippincott Williams & Wilkins, 380-382.
- Valčić O., Jovanović I., Milanović S., Gvozdić D. (2013): Selenium status of feedstuffs and grazing ewes in Serbia. *Acta veterinaria*, 63(5-6):665-675.
- Wolff F., Moschos A., Koller G., Bauer A., Vervuert I. (2017): Serum selenium concentration and whole blood glutathione peroxidase activity in healthy adult horses. *Tierarztl Prx Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 45(6):332-369.

Paper received: 27.07.2022.

Paper accepted: 29.08.2022.

---

## УПУТСТВО АУТОРИМА И РЕЦЕНЗЕНТИМА

### Пријављивање

Подношењем рукописа аутори гарантују да је њихов достављени рад часопису *Ветеринарски журнал Републике Српске* њихово оригинално дјело, да раније није објављен, да се не разматра за објављивање на другим мјестима, као и да су његово објављивање одобрили сви коаутори, ако их је било, као и одговорни органи, прећутно или експлицитно, у установи у којој је дјело изведено. Аутори су искључиво одговорни за садржај својих поднесака, исправност експерименталних резултата и морају да се увјере да имају дозволу свих укључених страна да податке јавно објаве. Аутори који желе да укључе податке или текстуалне одломке који су већ објављени на другим мјестима, морају да добију дозволу од носилаца ауторских права и да укључе доказе да је таква дозвола дата приликом подношења њихових радова. Претпостављаће се да било који материјал примљен без таквих доказа потиче од аутора.

Пријављивањем рукописа *Ветеринарском журналу Републике Српске* аутори се слажу с одредбама и условима часописа. Сва преписка је, укључујући и обавјештење о одлуци уредника и захтјевима за рецензију, путем електронске поште (e-mail). Текст рукописа се пише на једном од језика у службеној употреби у Босни и Херцеговини и добром енглеском језику (америчка или британска употреба је прихваћена, али не и мјешавина ових). Уредник задржава право да измијени поднијете рукописе по одговарајућем стандарду формалног језика који је у службеној употреби у Босни и Херцеговини и енглеског језика. Рукописи се унапријед процјењују у уредништву како би се провјерило да ли испуњавају основне захтјеве за објављивање и стандарде квалитета. Они се такође провјеравају због плагијата. Аутори ће бити обавијештени путем е-поште о пријему поднеска. Само они рукописи који су у складу с упутством ауторима, могу бити прихваћени за рецензију. У супротном, рукописи ће бити враћени ауторима са запажањима и коментарима.

### Процедура рецензије

*Ветеринарски журнал Републике Српске* нуди брзу online и штампану публикацију за све чланке који нису објављени на другим мјестима, а рецензија се води електронским путем. Од аутора се може тражити да дају контакт податке три потенцијална рецензента, али коначна одлука о избору рецензента почива на уредништву, без икакве обавезе да контактира било ког од рецензента које препоручује аутор. Уредник именује најмање два рецензента на препоруку чланова уредништва. Просљеђени рукописи се шаљу рецензентима заједно са упутствима за рецензију и пратећим обрасцима за оцјењивање рукописа. Прихватање рукописа се заснива на рецензијама и на коначним одлукама рецензента у вези са прихватљивошћу рукописа. Одлука рецензента је једна од следећих: "Прихватљиво за објављивање", "Прихватљиво након исправки" или "Неприхватљиво за објављивање". Ако постоји неусаглашеност у одлукама између рецензента, уредник може послати рукопис другом рецензенту за додатне коментаре и даљу одлуку или ће рад бити одбијен. Имена рецензента се не преносе аутору и обрнуто (обострано слијепа рецензија). Очекује се да ће процес рецензије, генерално гледано, почети у року од двије недјеље од подношења рукописа, а да ће исправљени рукописи бити враћени у року од четири недјеље. Чланак се објављује на веб страни *Ветеринарског журнала Републике Српске*, на веб страни Агенције DOI Српска и као штампани примјерак издања.

---

## КАТЕГОРИЈЕ И УСЛОВИ ЗА РУКОПИСЕ

Пажљиво прочитајте упутство. Рукопис који није припремљен у складу с упутством ауторима, неће бити прихваћен за разматрање. Рукопис мора бити откуцан коришћењем фонта Times New Roman 12 тачака са обостраним поравнавањем, линијама са једним размаком на страници А4 величине, са маргинама странице 3,0 цм (као MS Word files, .doc). Наслови текста треба да буду откуцани великим словима и кратким поднасловима, гдје је неопходно, само са почетним великим словом.

*Ветеринарски журнал Републике Српске* објављује радове из области ветеринарске медицине и сродних области, који су од широког интереса за циљну публику.

Категорије рукописа које објављује *Ветеринарски журнал Републике Српске* су:

- Оригинални научни рад
- Прегледни научни рад
- Кратко или претходно саопштење
- Приказ случаја.

### ***Оригинални научни рад***

Оригинални научни рад је рад у ком се први пут публикује текст о резултатима сопственог истраживања оствареног примјеном научних метода, које су текстуално описане и које омогућавају да се истраживање по потреби понови, а утврђене чињенице провјере. Оригинални научни рад садржи следеће дијелове: насловна страна, сажетак, кључне ријечи, увод, материјали и методе, резултати, дискусија, закључак, литература. Стил писања треба да буде сажет, али довољно јасан да читаоцима омогући репродукцију експерименталне методологије како је описано. Чланак мора представити јасну хипотезу и податке изражене према одговарајућем експерименталном дизајну. Дискусија узима у обзир познате податке или чињенице само у вези са добијеним резултатима и пружа основ за доношење закључака на основу резултата. Дискусија не укључује општа знања о истраживаној теми. Оригинални научни рад обично садржи највише 4000 ријечи и 30 референци.

### ***Прегледни научни рад***

Прегледни научни рад представља преглед најновијих радова о одређеном предметном подручју с циљем да се већ објављене информације сажму, анализирају, евалуирају или синтетизују, те доноси нове синтезе које такође обавезно укључују резултате сопственог истраживања аутора. Прегледни научни радови су обично по позиву. Аутори који препознају потребу и желе да пријаве рад су добродошли и савјетује им се да контактирају уредништво прије почетка писања како би се увјерили да слична тема већ није пријављена и дата неком аутору. Аутори треба да буду експерти за предмет прегледног научног рада, што доказују цитирањем својих објављених научних радова у пријављеном раду (најмање пет научних радова, који се баве истом темом као и пријављени чланак). Прегледни научни рад садржи следеће дијелове: насловна страна, сажетак, кључне ријечи, увод, закључак, литература. Прегледни научни рад обично садржи највише 4000 ријечи и 30 референци.

### ***Кратко или претходно саопштење***

Кратко или претходно саопштење је рад мањег обима или прелиминарног карактера, у којем се ради о сажетом изношењу резултата завршеног изворног истраживачког рада или чланка који је у настајању (енгл. Working Paper). Кратко или претходно саопштење садржи

---

следеће дијелове: насловна страна, сажетак, кључне ријечи, увод, материјали и методе, резултати, дискусија, закључак, литература. Кратко саопштење обично садржи највише 3000 речи и 15 референци.

### **Приказ случаја**

Приказ случаја је прилог у коме аутор процјењује правилност/неправилност неког научног или стручног рада, критеријума, поставке или полазишта, уз посебан нагласак на квалитет оцјењиваног рада. Приказ случаја садржи следеће дијелове: насловна страна, сажетак, кључне ријечи, увод, дискусија, литература. Приказ случаја обично садржи највише 2500 ријечи и 15 референци.

### **ИЗГЛЕД РУКОПИСА, СТИЛА И ОБЛИКА**

Рукописи су подијељени у следеће уређене дијелове:

- Насловна страна
- Сажетак
- Кључне ријечи
- УВОД
- МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ
- РЕЗУЛТАТИ\*
- ДИСКУСИЈА\*
- ЗАКЉУЧАК
- Захвалница\*\*
- Сукоб интереса
- ЛИТЕРАТУРА
- Наслови табела и / или Легенде слика
- Табеле и / или слике

\* Резултати и дискусија могу да буду у једном поглављу

\*\* Није обавезно

### **Насловна страна**

*Насловна страница* укључује наслов рукописа, као и пуна имена и институционалне припадности свих аутора. Коресподентни аутор мора бити наведен.

*Наслов:* Наслов не садржи више од 110 знакова (укључујући размаке) и специфичан је за студију. Требао би бити разумљив широком спектру читалаца.

*Аутори и припадности.* То укључује имена, средње иницијале (ако се користе), презимена и припадности према следећем редослиједу: универзитет или организација / институција, град и држава за све ауторе. Надређени бројеви (1,2,3) користе се у случајевима када су аутори из различитих институција.

*Коресподентни аутор.* Један од аутора мора бити означен као коресподентни аутор (поред имена аутора додати симбол \*). Мора се навести име, презиме и e-mail коресподентног аутора.

### **Сажетак**

Сажетак садржи до 250 ријечи. Дијелови кратког садржаја не смију бити одвојени насловима него само новим пасусом.

Структурисан сажетак обавезан је за *оригинални научни рад* и *кратко или претходно саопштење* и подијељен је у следеће дијелове: увод, материјали и методе, резултати и закључак. Коришћене технике морају се поменути без уласка у методолошке детаље, а најважнији налази морају се резимирати.

Сажетак за *прегледни научни рад* је структурисан и подијељен на следеће дијелове: позадина, обим и приступ, кључни налази и закључци.

Приказ случаја не захтијева структурисан сажетак, али он укључује резиме случаја.

Цитати, табеле, специјалне скраћенице и нивои значајности (нпр.  $P < 0,05$ ) нису укључени у сажетак.

### **Кључне ријечи**

Испод кратког садржаја мора се навести три до пет кључних ријечи по абecedном реду, избјегавајући опште, појмове у множини и више појмова (нпр. „И“, „од“). Ове кључне ријечи ће се користити за индексирање.

### **УВОД**

У овом дијелу треба указати на суштину проблема и сврху студије. Кључне аспекте објављене литературе и истраживања требало би прегледати с циљем да се укаже на то зашто се овај рукопис сматра оригиналним доприносом тренутним научним сазнањима. Треба избегавати детаљно испитивање литературе или резиме резултата. Последњи дио увода мора да садржи специфичне циљеве студије. Увод не прелази 400 ријечи.

### **МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ**

Овај дио укључује, према потреби, опис дизајна студије, експерименталних животиња, аналитичких метода и статистичких анализа. Утврдите методе и поступке са довољно детаља да омогуће другима да репродукују студију. Ако су методе широко познате, нису описане, али се морају навести одговарајуће референце. За нове методе треба укључити протоколе за методу. Аутори морају пружити референце за успостављене методе, укључујући статистичке методе. Наведите било који општи рачунарски програм који се користи. Идентификујте све лијекове и хемикалије који се користе са генеричким или хемијским именима, дозама и начином примјене. Наведите произвођача, број производа, град и државу, где је то могуће. Дајте етичку изјаву о добробити животиња ако је примјењиво.

### **РЕЗУЛТАТИ**

Резултати су представљени у логичном редослиједу и паралелно са методама (за сваку методу треба да постоји резултат), користећи табеле и / или слике без дуплирања резултата између ова два формата. Да би се побољшала јасноћа, ово поглавље може се подијелити на подпоглавља, свако с концизним поднасловом, које пружа детаље о налазима који су потребни у прилог закључцима из рукописа.

### **ДИСКУСИЈА**

О резултатима треба разговарати и повезати их са другим релевантним студијама и тренутним сазнањима тамо где је то потребно. Међутим, дискусија се не користи за сумирање тренутног знања. Дискусија треба јасно да идентификује главне закључке

студије. Аутори треба да пруже јасно објашњење важности и релевантности ових закључака. Све нове информације треба разликовати од претходних налаза и могу се створити релевантне хипотезе.

### **ЗАКЉУЧАК**

Закључак се састоји од кратке интеграције резултата који се директно односе на наведене циљеве студије и изјаве о практичним импликацијама резултата. Закључци су повезани са циљем студије, избегавајући неквалификоване изјаве и закључке који нису поткријељени вашим подацима. Ово поглавље не би требало да прелази један кратак одломак. Не резимирајте дискусију или тренутно знање у овом поглављу.

### **Захвалница**

Извор финансирања студије може бити наведен у овом поглављу. У овом поглављу могу се поменути сви они који су дали значајан допринос студији у погледу дизајна, извођења, анализе или израде / ревизије рукописа, али не одговарају критеријумима за ауторство.

### **Сукоб интереса**

Сукоб интереса постоји када на тумачење података или презентацију информација може утицати лични или финансијски однос с људима или организацијама. Од аутора се тражи да попуне изјаву о сукобу интереса. Сви пријављени сукоби интереса биће наведени на крају објављених чланака. Тамо гдје аутор не наводи сукоб интереса, навешће се „Аутор (и) изјављују да не постоји сукоб интереса.

### **ЛИТЕРАТУРА**

Потребно је обезбиједити да свака референца наведена у тексту буде присутна и на списку литературе (и обрнуто).

Препоручује се да референце не буду старије од 20 година и да преко 80% референци буде из научних часописа, а остало из других научних извора.

Цитати у тексту, као што су личне комуникације, необјављени подаци или у штампи (ако нема DOI броја), нису прихватљиви. Радови са научних скупова могу се цитирати само ако су објављени у цјелости. У текст треба уврстити само основне референце, а оне су ограничене на неопходни минимум. Наведите референце у тексту према презимену и години у загради (нпр. Ковачевић, 2014). У случају два аутора, користите „и“ (нпр. Стевановић и Недић, 2015). Скраћеница „и сар.“ мора се користити у свим случајевима гдје се наводи више од два аутора (нпр. Marasas и сар., 2016). Више референци унутар заграда у тексту наводи се обрнутим хронолошким редом (нпр. Стевановић и сар., 2016; Голић и Недић, 2015; Теодоровић, 2014). У случају да исти аутор има више публикација у истој години, поред године се додају додатне словне ознаке (Ђоковић и сар., 2008а; Петровић и сар., 2008б).

У случају помињања организација или стандарда користе се скраћенице (нпр. EFSA, 2016; ISO, 2017) а код закона и правилника термин пропис (нпр. Пропис, 2012).

Листа референци поредана је по абедици (помоћу алата за сортирање А-З на траци MS Word Home, ако је потребно) према презименима првих аутора.

*Примјери:*



---

*Часописи:*

Stevanović O., Nedić D. (2019): Clinical presentation of bluetongue and the malignant form of contagious ecthyma in sheep: description of cases. *Veterinarski Glasnik*, 73(1):57-63.

*Књиге, монографије и приручници:*

Stockham L.S., Scott A. M. (2008): *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Blackwell Publishing, 415.

Тешић М., Недић Д. (2011): Менаџмент ветеринарске праксе. Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, 286.

FDA (2006): *Managing Food Safety: A Manual for the Voluntary Use of HACCP Principles for Operators of Food Service and Retail Establishments*. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.

*Књиге са ауторским поглављима:*

Marasas W. F. O. (1996): Fumonisin: History, worldwide occurrence and impact. In *Fumonisin in food, advances in experimental medicine and biology*. Eds. L. S. Jackson, J. W. DeVries, L. B. Bullerman, Plenum Press, 118.

*Закони и прописи:*

Пропис, (2013): Commission Regulation (EU) No 1019/2013 amending Annex I to Regulation (EC) No 2073/2005 as regards histamine in fishery products. *Official Journal of the European Union*, L 282:46-47.

Пропис, (2012): Правилник о микробиолошким критеријумима за храну. Службени гласник Републике Српске, 109/12.

*Научни скупови:*

Vasilev D., Aleksic B., Tarbuk A., Dimitrijevic M., Karabasil N., Cobanovic N., Vasiljevic N. (2015): Identification of lactic acid bacteria isolated from Serbian traditional fermented sausages sremski and lemeski kulen. In the 58th International Meat Industry Conference (MeatCon2015), *Procedia Food Science*, 5:300-303.

*Цитати са организацијама као ауторима:*

EFSA. (2016): Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance benzoic acid. *European Food Safety Authority, EFSA Journal*, 14(12):4657-n/a

*Web Links:*

OIE. (2020): *Animal Diseases*. Available at: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/>. Accessed 31.12.2020.

*Стандарди:*

ISO. (2017): *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. - Part 1: Detection method*. International Organisation for Standardization, ISO 11290-1.

---

ИСБИХ. (2018): Микробиологија ланца хране – Хоризонтална метода за детекцију и одређивање броја Enterobacteriaceae – Дио 2: Метода бројања колонија. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 21528-2.

### **Захтјеви**

*Ветеринарски журнал Републике Српске* препоручује употребу тачних и утврђених јединица, скраћеница, формула и номенклатуре кад год је то могуће.

Јединице. Све спецификације морају бити наведене у складу са Међународним системом јединица (СИ). Ако су поменуле друге јединице, наведите њихов еквивалент у СИ. Символи за јединице изведене дељењем дати су као негативни експоненти (нпр. 10 g L<sup>-1</sup>; 250 V cm<sup>-2</sup>).

Скраћенице. Све скраћенице хемијских, биолошких, медицинских или других израза треба користити само ако је сигурно да су међународно познате. Скраћенице се не користе у кратком садржају и морају се дефинисати у заградама када се први пут користе у главном тексту. Не започињите реченицу скраћеницом.

Математичке формуле. Предајте математичке једначине као текст који се може уређивати, а не као слике. Представите једноставне формуле у складу са нормалним текстом, где је то могуће, и користите солидус (/) умјесто хоризонталне линије за мале разломљене појмове (нпр. А / Б). Узастопно нумеришите све једначине које морају бити приказане одвојено од текста (ако су у тексту изричито наведене).

Номенклатура и таксономија. Сви медицински, хемијски, биолошки или други изрази треба да се користе у складу са најновијим препорукама одговарајуће међународне номенклатуре. Имена родова и врста микроорганизама и зоолошка имена су у курзиву (нпр. *Aeromonas hydrophila*). Тамо где се род појављује у наслову, то треба у потпуности исписати. У главном тексту, род би требало на први начин поменути, а потом и скраћено (нпр. *A. hydrophila*). Аутори морају осигурати да не буде забуне са осталим родовима поменутих у тексту. Правопис и таксономија имена треба да прате међународно прихваћену номенклатуру. Имена бактерија морају бити у складу са најновијим издањем Берцеј-евог Приручника за систематику бактерија и / или мишљењем у Међународном часопису за систематску и еволуциону микробиологију, а вирусима треба дати класификацију и називе које препоручује Међународни комитет за таксономију вируса. Ензимске потенције су дате у И.Ј. (Међународне јединице) и према ензимској номенклатури. Гени, мутације, генотипови и алели су укошени и аутори би требало да консултују одговарајуће базе података генетске номенклатуре. Протеини обично нису у курзиву. Треба навести препоручени међународни заштићени назив лијекова (rINN). Комерцијална имена других производа треба користити само тамо где за производ не постоји други одговарајући термин. У таквим случајевима, име, град и државу произвођача треба навести у заградама при првом помињању производа.

### **Табеле и слике**

Слике не смију бити интегрисане у главни текст, него се достављају као додатни документ (свака слика засебно).

Табеле се достављају на крају рукописа, као текст који се може уређивати (свака табела на посебној страници).

Табеле и слике нумеришу се узастопно помоћу арапских бројева (Слика 1, Слика 2, Слика 3, Табела 1, Табела 2, Табела 3 итд.). За идентификацију дијелова вишедјелне фигуре треба користити велика слова А, Б, Ц итд. Сlike морају бити у резолуцији 300 dpi. Дозвољени формати - JPG, TIFF. За микрофотографије се морају обезбедити скале са одговарајућим јединицама. Символи, стрелице или слова коришћени на фотографијама требају бити у контрасту са позадином.

Резултати који се у тексту могу описати као кратки наводи не приказују се као слике или табеле. Подаци се не смију копирати у табеле и слике.

Наслови и легенде помажу да табеле и слике буду разумљиви, а да читалац не мора да се позива на главни текст. Међутим, они такође морају бити сажети и не користе се за поновни опис методологије. Одговарајући бројеви и наслови табела, као и бројеви, наслови и легенде слика наводе се у новом реду и стављају поред релевантног текста у чланку.

Свака табела је припремљена на посебној страници и прикладно нумерисана кратким описним насловом табеле који је постављен горе. Табеле могу да садрже фусноте које се налазе испод табеле и објашњавају све скраћенице. Користите натписне арапске бројеве (1, 2, 3 итд., у правилном редоследу читања табеле, одозго лево доле десно) да бисте сваку фусноту повезали са одговарајућом ставком у табели која захтијева објашњење.

Легенде слика се не појављују на сликама. Приликом достављања слика потребно је осигурати да су датотеке на одговарајући начин идентификоване као слика 1, слика 2 итд. Легенде слика укључују број и наслов слике и објашњења свих кориштених симбола, линија или ознака, а постављају се на одговарајуће мјесто у оквиру главног текста.

### **Ауторско право**

Аутори задржавају ауторска права на објављене радове и дају издавачу право да објави чланак, да се у случају поновне употребе наведе као његов изворни издавач и да га дистрибуише у свим облицима и медијима. Ако часопис не прихвати за објављивање предати рукопис, сва права на рукопис задржаће аутор (и).

Чланци објављени у *Ветеринарском журналу Републике Српске* биће чланци са отвореним приступом дистрибуисани под Creative Commons Attribution (CC BY) 4.0 International License.

### **Изјава о приватности**

Имена и адресе е-поште користиће се искључиво у наведене сврхе овог часописа и неће бити доступне у било које друге сврхе или било којој другој страни.

Ажурирано упутство за ауторе: 07. фебруара 2022.

### **АДРЕСА ЧАСОПИСА:**

Јавна Установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука  
Бранка Радичевића 18, 78000 Бања Лука

Телефон/факс: +387 51 229-210

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>

---

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS AND REVIEWERS

### Submission

By submitting the manuscript, the authors guarantee that their article submitted to the *Veterinary Journal of Republic of Srpska* is their original research, that it was not published earlier, that it is not considered for publication elsewhere, and that its publication was approved by all co-authors, if any, as well as responsible authorities, tacitly or explicitly, in the institution where the study was obtained.

Authors are entirely responsible for the content of their submissions, the accuracy of the experimental results and must ensure that they have the permission of all parties involved to make the data public. Authors wishing to include data or textual parts already published elsewhere must obtain permission from the copyright holders and include evidence that such permission was given when submitting their manuscript. It will be assumed that any material received without such evidence originates from the author.

By submitting the manuscript to the *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, the authors agree with the terms and conditions of the journal. All correspondence, including notification of the editor's decision and review requests, is by e-mail. The text of the manuscript is written in one of the languages in official use in Bosnia and Herzegovina and in good English (American or British English is accepted, but not a mixture of these). The Editor reserves the right to change the submitted manuscripts in accordance with the standards of formal language which is in official use in Bosnia and Herzegovina, or in accordance with English language. Manuscripts are pre-evaluated by the editorial board to verify that they meet basic publishing requirements and quality standards. They are also checked for plagiarism. Authors will be notified by email of receipt of the submission. Only those manuscripts that are in accordance with the Instructions for authors can be accepted for review. Otherwise, the manuscripts will be returned to the authors with observations and comments.

### Review procedure

*The Veterinary Journal of Republic of Srpska* offers a fast *online* and printed publication for all articles that have not been published elsewhere, and the review is conducted electronically. The author may be asked to provide contact information of three potential reviewers, but the final decision on the selection of the reviewer is made by the editorial board, without any obligation to contact any of the reviewers recommended by the author. The editor appoints at least two reviewers on the recommendation of editorial board members. Submitted manuscripts are sent to reviewers along with Review instructions and accompanied Manuscript evaluation forms. Acceptance of the manuscript is based on the review and on the final decisions of the reviewers regarding the acceptance decision. The reviewer's decision is one of the following: "Acceptable for publication", "Acceptable after corrections" or "Unacceptable for publication". If there is a nonconformity in the decisions between the reviewers, the Editor may send the manuscript to another reviewer for further comment and further decision or the article will be rejected. Reviewers' identity are unknown to the authors and vice versa (the double blind review system). The review process is generally expected to begin within two weeks of submitting the manuscript and that the revised manuscripts will be returned within four weeks. The article is published on the website of the *Veterinary Journal of the Republika of Srpska*, on the website of the Agency DOI Srpska and as a printed copy of the publication.

---

---

## CATEGORIES AND CONDITIONS FOR MANUSCRIPTS

Read the instructions carefully. A manuscript not prepared in accordance with the Instructions for authors, will not be accepted for consideration. Manuscript must be typed using the Times New Roman 12-point font with both left and right margins fully justified, single-spaced lines on A4 size pages, with 3.0 cm margins (such as MS Word files, .doc). Headings of the text should be typed in capital letters and short subtitles, where necessary, only with the initial capital letter.

*The Veterinary Journal of Republic of Srpska* publishes articles in the field of veterinary medicine and related fields, that are of wide interest to the target audience.

The categories of manuscripts published by the *Veterinary Journal of Republic of Srpska* are:

- Original research article
- Review article
- Short communication or Working paper
- Case report.

### ***Original research article***

Original research article is a article in which the text is published for the first time on the results of own research achieved by applying scientific methods, which are textually described and replicable if necessary, and the established facts are verified. The original research article should be subdivided in the following sections: Title page, Summary, Keywords, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusion, References. The writing style should be concise but clear enough to allow readers to reproduce the experimental methodology as described. The article must present a clear hypothesis and data expressed according to the appropriate experimental design. The discussion takes into account known data or facts only in relation to the obtained results and provides a basis for drawing conclusions based on the results. The discussion does not include general knowledge of the research topic. An original research article usually contains no more than 4000 words and 30 references.

### ***Review article***

A review article summarizes the latest studies in a particular research area in order to summarize, analyze, evaluate or synthesize already published information, and bring new syntheses that also necessarily include the results of the author's own research. Review articles are usually by invitation. Authors who recognize the need and want to submit an article are welcome and are advised to contact the editorial board before writing to make sure that a similar topic has not already been submitted and given to an author. Authors should be experts in the subject of a review article, as evidenced by citing their published scientific papers in the submitted article (at least five scientific papers, which deal with the same topic as the submitted article). The review article should be subdivided in the following sections: Title page, Summary, Keywords, Introduction, Conclusion, References. A review article usually contains no more than 4000 words and 30 references.

### ***Short communication or Working paper***

A Short communication or Working paper is a concise research artical or a preliminary work, which is a summary of the results of the completed original research work or an work in progress.

---

---

The Short communication or Working paper should be subdivided in the following sections: Title page, Summary, Keywords, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusion, References. A Short communication usually contains no more than 3000 words and 15 references.

### ***Case report***

A case report is an contribution in which the author assesses the regularity/irregularity of a scientific or professional work, criteria, settings or starting point, with special emphasis on the quality of the evaluated work. The Case report should be subdivided in the following sections: Title page, Summary, Keywords, Introduction, Discussion, References. The Case report usually contains no more than 2500 words and 15 references.

### **MANUSCRIPT LAYOUT, STYLE AND FORMATING**

The manuscripts are divided into the following edited sections:

- Title page
  - Summary
  - Keywords
  - INTRODUCTION
  - MATERIALS AND METHODS
  - THE RESULTS\*
  - DISCUSSION\*
  - CONCLUSION
  - Acknowledgment \*\*
  - Conflict of interest
  - REFERENCES
  - Table titles and/or Figures legends
  - Tables and/or Figures
- \* Results and discussion can be in one chapter
- \*\* Optional

### **Title page**

*The title page* includes the title of the manuscript, as well as the full names and institutional affiliations of all authors. Corresponding author must be listed.

*Title:* The title contains no more than 110 characters (including spaces) and is specific to the study. It should be understandable to a wide range of readers.

*Authors and affiliations.* This includes names, middle initials (if used), surnames and affiliations in the following order: University or Organization/Institution, City and Country for all authors. Superscripts (1,2,3) are used in cases when the authors are from different institutions.

---

---

*Corresponding author.* One of the authors must be marked as a corresponding author (add the symbol \* next to the author's name). The name, surname and email of the corresponding author must be stated.

### **Summary**

The summary contains up to 250 words. Sections of the summary should not be separated by titles but only by a new paragraph.

A structured summary is required for an *Original research article* and a *Short communication or Working paper* and is subdivided into the following sections: Introduction, Materials and methods, Results and Conclusion. The methods used must be mentioned without going into methodological details, and the most important findings must be summarized.

The summary for the *Review article* is structured and subdivided into the following sections: Background, Scope and approach, Key findings and Conclusions.

The *Case report* does not require a structured summary, but it does include a summary of the case.

Citations, tables, special abbreviations and significance levels (eg  $P < 0.05$ ) are not included in the summary.

### **Keywords**

Below the Summary, three to five keywords must be listed in alphabetical order, avoiding general, plural and multiple terms (eg "and", "from"). These keywords will be used for indexing.

### **INTRODUCTION**

In this part, the essence of the problem and the purpose of the study should be pointed out. Key aspects of published literature and research should be reviewed to indicate why this manuscript is considered an original contribution to current scientific knowledge. A detailed description of the literature or a summary of the results should be avoided. The last part of the introduction must contain the specific objectives of the study. The introduction contains no more than 400 words.

### **MATERIALS AND METHODS**

This section includes, as appropriate, a description of study design, experimental animals, analytical methods and statistical analyzes. Establish methods and procedures in sufficient detail to enable others to reproduce the study. If the methods are widely known, they are not described, but appropriate references must be given. For novel methods, method protocols should be included. Authors must provide references to established methods, including statistical methods. List any general computer program used. Identify all medications and chemicals used with generic or chemical names, dosages, and routes of administration. Indicate the manufacturer, product number, city and country, where applicable. Provide an Ethical statement on animal welfare if applicable.

### **THE RESULTS**

The results are presented in a logical order and in accordance with the methods (there should be a result for each method), using tables and/or figures without duplicating the results between the two formats. To improve clarity, this section can be divided into subsections, each with a concise subtitle which provides details of the findings needed to support the conclusions of the manuscript.

---

---

## DISCUSSION

The results should be discussed and linked to other relevant studies and current knowledge where needed. However, discussion is not used to summarize current knowledge. The discussion should clearly identify the main conclusions of the study. The authors should provide a clear explanation of the importance and relevance of these conclusions. All new information should be distinguished from previous findings and relevant hypotheses can be created.

## CONCLUSION

The conclusion consists of a brief integration of the results directly related to the stated objectives of the study and a statement of the practical implications of the results. The conclusions are related to the goal of the study, avoiding unqualified statements and conclusions that are not supported by your data. This section should not exceed one short paragraph. Do not summarize the discussion or current knowledge in this section.

### *Acknowledgements*

The source of funding for the study can be listed in this section. This section may list all those persons who have made significant contributions to the study in terms of design, conducting, analysis or providing/revision of manuscripts, but do not meet the authorship criteria.

### *Conflict of interest*

Conflicts of interest exist when the interpretation of data or the presentation of information may be affected by personal or financial relationships with people or organizations. Authors are required to complete a conflict of interest statement. All reported conflicts of interest will be listed at the end of the published articles. Where the author does not state a conflict of interest, it will state "The author (s) declare that there is no conflict of interest".

## REFERENCES

It is necessary to ensure that each reference mentioned in the text is present in the reference list (and vice versa).

It is recommended that references are not older than 20 years and that over 80% of references are from scientific journals, and the rest from other scientific sources.

Citations in the text, such as *personal communications*, *unpublished data* or *in the press* (if there is no DOI number), are not accepted. Articles from scientific conferences can be cited only if they are published in full. Only essential references should be included in the text, and they are limited to the minimum necessary. Include references in the text as author's surname and year in brackets (eg Kovačević, 2014). In the case of two authors, use "and" (eg Stevanović and Nedić, 2015). The abbreviation "et al." must be used in all cases where more than two authors are cited (e.g. Marasas et al., 2016). Several references within parentheses in the text are listed in reverse chronological order (e.g. Stevanović et al., 2016; Golić and Nedić, 2015; Teodorović, 2014). In case the same author has several publications in the same year, additional letter marks are added in addition to the year (Đoković et al., 2008a; Petrović et al., 2008b).

In the case of references to organizations or standards, abbreviations are used (eg EFSA, 2016; ISO, 2017) and in the case of laws and regulations, the term regulation (eg Regulation, 2012).

---



---

The list of references is arranged alphabetically (using the A-Z sorting tool on the MS Word Home bar, if necessary) according to the surnames of the first authors.

*Examples:*

*Journals:*

Stevanović O., Nedić D. (2019): Clinical presentation of bluetongue and the malignant form of contagious ecthyma in sheep: description of cases. *Veterinarski Glasnik*, 73(1):57-63.

*Books, Monographs and Manuals:*

Stockham L.S., Scott A. M. (2008): *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Blackwell Publishing, 415.

Тешић М., Недић Д. (2011): Менаџмент ветеринарске праксе. Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, 286.

FDA (2006): *Managing Food Safety: A Manual for the Voluntary Use of HACCP Principles for Operators of Food Service and Retail Establishments*. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition.

*Books with author`s chapters:*

Marasas W. F. O. (1996): Fumonisin: History, worldwide occurrence and impact. In *Fumonisin in food, advances in experimental medicine and biology*. Eds. L. S. Jackson, J. W. DeVries, L. B. Bullerman, Plenum Press, 118.

*Laws and regulations:*

Regulation, (2013): Commission Regulation (EU) No 1019/2013 amending Annex I to Regulation (EC) No 2073/2005 as regards histamine in fishery products. *Official Journal of the European Union*, L 282:46-47.

Regulation, (2012): Правилник о микробиолошким критеријумима за храну. Службени гласник Републике Српске, 109/12.

*Scientific conferencess:*

Vasilev D., Aleksic B., Tarbuk A., Dimitrijevic M., Karabasil N., Cobanovic N., Vasiljevic N. (2015): Identification of lactic acid bacteria isolated from Serbian traditional fermented sausages sremski and lemeski kulen. In the 58th International Meat Industry Conference (MeatCon2015), *Procedia Food Science*, 5:300-303.

*Citations with organisations as authors:*

EFSA. (2016): Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance benzoic acid. *European Food Safety Authority, EFSA Journal*, 14(12):4657-n/a

*Web Links:*

OIE. (2020): *Animal Diseases*. Available at: <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/>. Accessed 31.12.2020.

*Standards:*

---

ISO. (2017): Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method. International Organisation for Standardization, ISO 11290-1.

ISBIH. (2018): Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony-count technique. Institute for standardization of Bosnia and Herzegovina, BAS EN ISO 21528-2.

### **Requirements:**

*The Veterinary Journal of Republic of Srpska* recommends the use of accurate and established units, abbreviations, formulas and nomenclatures whenever possible.

Units. All specifications must be listed in accordance with the International System of Units (SI). If other units are mentioned, indicate their equivalent in SI. Symbols for divisible units are given as negative exponents (eg 10 g L<sup>-1</sup>; 250 V cm<sup>-2</sup>).

Abbreviations. All abbreviations of chemical, biological, medical or other terms should be used only if it is certain that they are internationally known. Abbreviations are not used in the summary and must be defined in parentheses when first used in the main text. Do not start a sentence with an abbreviation.

Math formulas. Submit mathematical equations as editable text, not as images. Present simple formulas in accordance with normal text, where possible, and use forward slash (/) instead of a horizontal line to separate terms (e.g. A / B). Sequentially number all equations that must be shown separately from the text (if they are explicitly stated in the text).

Nomenclature and taxonomy. All medical, chemical, biological or other terms should be used in accordance with the latest recommendations of the relevant international nomenclature. Names of genera and species of microorganisms and zoological names are in italics (e.g. *Aeromonas hydrophila*). Where the genus appears in the title, it should be written in full. In the main text, the genus should be mentioned first, and then abbreviated (eg *A. hydrophila*). Authors must ensure that there is no confusion with other genera mentioned in the text. Spelling and taxonomy of names should follow internationally accepted nomenclature. Bacterial names must be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology and/or opinion in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, and viruses should be given the classification and names recommended by the International Committee on Taxonomy of Viruses. Enzymatic potencies are given in I.U. (International Units) and by enzyme nomenclature. Genes, mutations, genotypes and alleles are in italics and the authors should consult the appropriate databases of genetic nomenclature. Proteins are not usually in italics. The recommended International Nonproprietary Name (rINN) should be provided. Commercial names of other products should be used only where there is no other appropriate term for the product. In such cases, the name, city and country of the manufacturer should be given in brackets when the product is first mentioned.

### **Tables and figures**

Figures must not be integrated into the main text, but are submitted as an additional document (each figure separately).

Tables are submitted at the end of the Manuscript, as editable text (each table on a separate page).

---

Tables and figures are numbered consecutively using Arabic numerals (Figure 1, Figure 2, Figure 3, Table 1, Table 2, Table 3, etc.). Capital letters A, B, C, etc. should be used to identify parts of a multi-part figure. Images must be at a resolution of 300 dpi. Allowed formats are JPG, TIFF. Scales with appropriate units must be provided for microphotographs. Symbols, arrows or letters used in images should contrast with the background.

Results that can be described in the text as short statements are not shown as figures or tables. Data must not be copied into tables and figures.

Titles and legends help to make tables and figures understandable without the reader having to refer to the main text. However, they also need to be summarized and not used to re-describe the methodology. The corresponding numbers and titles of the tables, as well as the numbers, titles and legends of the figures are listed in a new line and placed next to the relevant text in the Article.

Each table is prepared on a separate page and appropriately numbered with the short descriptive title of the table set out above. Tables can contain footnotes below the table and explain all abbreviations. Use Arabic numerals (1, 2, 3, etc., in the correct order of reading the table, from top left to bottom right) to link each footnote to the corresponding item in the table that requires explanation.

Figure legends do not appear in figures. When submitting figures, it is necessary to ensure that the files are properly identified as Figure 1, Figure 2, etc. Figure legends include the number and title of the figure and explanations of any symbols, lines or markings used, and are placed in the appropriate place within the main text.

### **Copyright**

Authors retain the copyright to published articles and give the publisher the right to publish the article, to be listed as its original publisher in case of re-use and to distribute it in all forms and media. If the journal does not accept the submitted manuscript for publication, all rights to the manuscript will be retained by the author (s).

Articles published in the *Veterinary Journal of Republic of Srpska* will be open access articles distributed under the Creative Commons Attribution (CC BY) 4.0 International License.

### **Privacy Statement**

The names and e-mail addresses will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be available for any other purpose or to any other party.

Updated instructions for authors: February 7, 2022.

### **JOURNAL ADDRESS:**

Public Institution Veterinary Institute of Republic of Srpska "Dr Vaso Butozan" Banja Luka  
Branka Radičevića 18, 78000 Banja Luka

Phone/fax: +387 51 229-210

Editor-in-Chief: Prof. Dr. Drago N. Nedić: 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>

---