

UDK 619(05)

ISSN 1840-2887 Штампа-Print
ISSN 2303-4475 Online

ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ

Veterinary Journal of Republic of Srpska



Вол/Vol XIII, бр./No 2, стр./page 95-286, Бања Лука/Vanja Luka, 2013



МОТИВИ СА ЕРГЕЛЕ “ВУЧИЈАК” ПРЊАВОР

UDK 619 (05)

ISSN 1840-2887 – Штампа-Print

ISSN 2303-4475 - Online

ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ

VETERINARY JOURNAL OF REPUBLIC OF SRPSKA

Научно стручни часопис - Scientific and professional journal

Ветеринарски журнал Републике Српске, Вол. 13, број 2, стр. 95-286, Бања Лука, 2013
Veterinary Journal of Republic of Srpska, Vol. XIII, No 2, page 95- 286, Banja Luka, 2013

ОСНИВАЧ – FOUNDER:

ДРУШТВО ВЕТЕРИНАРА РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ

VETERINARY ASSOCIATION OF REPUBLIC OF SRPSKA

ИЗДАВАЧ – PUBLISHER:

ЈУ ВЕТЕРИНАРСКИ ИНСТИТУТ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ „Др Васо Бутозан“ БАЊА ЛУКА

PI VETERINARY INSTITUTE REPUBLIC OF SRPSKA „Dr. Vaso Butozan“ BANJA LUKA

ГЛАВНИ И ОДГОВОРНИ 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:

Балтић др Милан, Baltić dr Milan, Србија-Srbija,

Георгиев Бошков др Иван, Georgiev Bozhkov dr Ivan, Бугарска-Bulgaria,

Голубовић др Србољуб, Golubović dr Srboljub, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Цветић др Жељко, Cvetnić dr Željko, Хрватска-Croatia,

Иветић др Војин, Ivetić dr Vojin, Србија-Srbija,

Калаба др Весна, Kalaba dr Vesna, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Кубелка др Драго, Kubelka dr Drago, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Латиновић др Рајко, Latinović dr Rajko, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Лукаускас др Казимиерас, Lukauskas dr Kazimieras, Литванија-Lithuania

Матаругић др Драгутин, Matarugić dr Dragutin, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Мијачевић др Зора, Mijačević dr Zora, Србија-Srbija,

Надаждин др Миливоје, Nadaždin dr Milivoje, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Тешић др Милан, Tešić dr Milan, Србија-Srbija,

Тркуља др Родољуб, Trkulja dr Rodoljub, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Шарић др Миленко, Šarić dr Milenko, (БиХ-РС, В&Н-RS).

ЛЕКТОР - LECTOR: Мијана Кубурић - Мацура / Mijana Kuburić - Macura

РЕЦЕНЗИЈА:

Часопис се упућује на рецензију еминентним стручњацима оvisно о тематици рада

ГОДИШЊЕ СЕ ОБЈАВЉУЈЕ 2 БРОЈА ЧАСОПИСА

Часопис је бесплатан и штампа се у 300 примјерака.

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

Штампа: АТЛАНТИК, Бања Лука

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

Тел/факс: 051/229-210, Е-mail: drago.nedic@virsvb.com, Web Page: <http://www.virsvb.com>

Предговор овом броју

Поштовани читаоци,

Пред вама је нови број 2/2013. наше и наше научно-стручне часописа, „Ветеринарски журнал Републике Српске“.

Овај број излази пред годину јубилеја издавача, а то је 80 година од почетка рада Ветеринарске институције Републике Српске „Др Васо Буџозан“, Бања Лука. Мало је оваквих институција које имају континуиран рад иако дугој ери (1934–2014). Институција данас има 60 запослених, од којих је пет доктор наука, шест мајстара, четири специјалисте, још 15 са високом степеном, проје са вишом степеном, а остали су лаборанти и техничари. У Институцији ради више различитих образовних профила: ветеринари, технолози, хемичари, биолози, агрономи, санитарни инжењери, правници и економисти. У каталогу још може се видјети да се у лабораторијама обавља око 300 разних анализа, од којих је 65 акредитованих, а годишње се обави преко 300.000 анализа. Годину јубилеја обиљежићемо научно-стручним скуповима и манифестацијама које би требало да дају допринос развоју и Институције и ветеринарске службе уопште. На традиционалном годишњем савјешовању ветеринара Републике Српске, Институција ће се представити својим најновијим резултатима лабораторијских испитивања.

У овом броју дали смо ново упућивање ауторима, па вас молимо да на то обратите пажњу. Покренули смо процедуру за категоризацију часописа и надамо се да ће већ следећи број бити и званично категорисан од стране Министарства науке и технологије.

Молимо ауторе да се придржавају упутства за писање радова како би избјегли враћање радова на поновну обраду и примједбе рецензента.

Сви радови и у овом броју су лекторисани и индексирани.

Ускоро би требало да изградимо нову интернет страницу Институције, на којој ће овај часопис имати посебно мјесто.

Захваљујемо се ауторима реферата за одабир овог часописа за објављивање њихових радова и позивамо их на даљу сарадњу.

ГЛАВНИ И ОДГОВОРНИ УРЕДНИК
Проф. др Драго Н. Негић

САДРЖАЈ/CONTENTS

1. Nektarios D. Giadinis, Aikaterini Chaintarli, Jovan Bojkovski
SLOW VIRAL INFECTIONS OF SMALL RUMINANTS IN GREECE
 Nektarios D. Giadinis, Aikaterini Chaintarli, Јован Бојковски
ВИРУСНЕ ИНФЕКЦИЈЕ СПОРОГ ТОКА МАЛИХ ПРЕЖИВАРА
У ГРЧКОЈ 101

2. Д. Кировски, Х. Шаманц, Ж. Сладојевић, Р. Продановић, И. Вујанац
НУТРИТИВНИ СТАТУС ВИСОКОМЛЕЧНИХ КРАВА:
ПРОЦЕНА НА ОСНОВУ САСТАВА МЛЕКА
 D. Kirovski, H. Šamanc, Ž. Sladojević, R. Prodanović, I. Vujanac
NUTRITIONAL STATUS OF DAIRY COWS: ESTIMATION
BASED ON MILK COMPOSITION 109

3. Vitomir Ćupić, Biljana Antonijević, Vesna Matović, Zorica Bulat, Saša Vasilev
KLINIČKE MANIFESTACIJE I MEHANIZMI TOKSIČNOG
DELOVANJA HEMIJSKIH SUPSTANCIJA
 Vitomir Ćupić, Biljana Antonijević, Vesna Matović, Zorica Bulat, Saša Vasilev
CLINICAL MANIFESTATIONS AND TOXIC EFFECT MECHANISMS
OF CHEMICAL SUBSTANCES 117

4. Milanka Jezdimirović, Nevenka Aleksić, Mirjana Milovanović,
 Dragica Stojanović, Nemanja Jezdimirović
UTICAJ PRODUŽENE PERORALNE PRIMENE EUGENOLA NA
HEMATOLOŠKE I NEKE BIOHEMIJSKE PARAMETRE KRVИ
KOD PACOVA
 Milanka Jezdimirović, Nevenka Aleksić, Mirjana Milovanović, Dragica
 Stojanović, Nemanja Jezdimirović
EFFECT OF EXTENDED ORAL ADMINISTRATION OF
EUGENOL ON HEMATOLOGICAL AND SOME BIOCHEMICAL
BLOOD PARAMETERS IN RATS 131

5. М. Миловановић, М. Јездимировић, М. Јовановић, С. Ивановић
ФАРМАКОТЕРАПИЈА ИНФЛАМАТОРНОГ И ПОСТОПЕРАТИВНОГ
БОЛА КОД ЖИВОТИЊА

- Milovanović M., Jezdimirovic M., Jovanovic M., Ivanovic S.
PHARMACOTHERAPY OF INFLAMMATORY AND POSTOPERATIVE PAIN IN ANIMALS 143
6. V. Pavlović, M. Maletić, S. Vakanjac, M. Pavlović, M. Đurić, V. Magaš
PRIMENA HORMONA U INDUKCIJI I SINHRONIZACIJI ESTRUSA I OVULACIJE KOD KRAVA
 V. Pavlović, M. Maletić, S. Vakanjac, M. Pavlović, M. Đurić, V. Magaš
APPLICATION OF HORMONES IN THE INDUCTION AND SYNCHRONIZATION OF OESTRUS AND OVULATION IN COWS 154
7. Југослав Васић, Синиша Гатарић, Драгиша Урошевић
ИЛЕУС
 Jugoslav Vasić, Siniša Gatarić, Dragiša Urošević
ILEUS 161
8. Милан Ж. Балтић, Марија Бошковић, Наташа Павлићевић, Весна Ђорђевић, Славен Грбић, Радмила Марковић, Милица Тодоровић
КОНТРОЛНЕ МЕРЕ ТОКОМ МАНИПУЛАЦИЈЕ И ПРОЦЕСА ОБРАДЕ МЕСА РИБЕ У ЦИЉУ ПРЕВЕНЦИЈЕ ЗООНОТСКИХ ПАРАЗИТОЗА
 Milan Ž. Baltić, Marija Bošković, Nataša Pavličević, Vesna Đorđević, Slaven Grbić, Radmila Marković, Milica Todorović
CONTROL MEASURES OF HANDLING AND PROCESSING RAW FISH MEAT IN ORDER TO PREVENT FISH BORNE PARASITIC ZONOSSES 167
9. T. Ledina, Z. Mijačević, S. Bulajić, M. Babić
PROBIOTSKI STATUS BAKTERIJA MLEČNE KISELINE
 T. Ledina, Z. Mijačević, S. Bulajić, M. Babić
STATUS OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA 176
10. Ivan Pavlović, Ana Samokovlija, Milica Elezović, Jelena Marić
ZNAČAJ PARAZITOLŠKE KONTROLE KONTAMINIRANOSTI ZELENIH POVRŠINA U URBANIM SREDINAMA
 Ivan Pavlović, Ana Samokovlija, Milica Elezović, Jelena Marić
THE SIGNIFICANCE OF PARASITOLOGICAL CONTROL OF CONTAMINATION OF GREEN PLACES IN URBAN AREA 193

11. Б. Курељушић, Б. Иветић, Б. Савић, Н. Јездимировић, Ђ. Цветојевић,
 Ј. Курељушић, О. Радановић, Д. Јакић-Димић
**МИКОТИЧНИ РУМИНИТИС, ОМАЗИТИС И АБОМАЗИТИС КОД
 ВИСОКОМЛЕЧНЕ КРАВЕ**
 B. Kureljušić, V. Ivetić, B. Savić, N. Jezdimirović, Đ. Cvetojević,
 J. Kureljušić, O. Radanović, D. Jakić-Dimić
**MYCOTIC RUMINITIS, OMASITIS AND ABOMASITIS
 IN HIGH-YIELDING DAIRY COW 203**

12. Ж. Сладојевић, Д. Кировски, Х. Шаманц
**УТИЦАЈ ЕНЕРГЕТСКОГ ДОДАТКА НА БАЗИ ГЛИЦЕРОЛА НА
 ТЈЕЛЕСНУ КОНДИЦИЈУ ВИСОКОМЛИЈЕЧНИХ КРАВА**
 Ž. Sladojević, D. Kirovski, H. Šamanc
**EFFECT OF GLYCEROL BASED ENERGY SUPPLEMENTATION
 ON BODY CONDITION SCORE OF DAIRY COWS 211**

13. Р. Продановић, Х. Шаманц, Д. Кировски, И. Вујанац, Ж. Сладојевић
**НЕКИ АСПЕКТИ ЕТИОПАТОГЕНЕЗЕ ПОРЕМЕЋАЈА У ПОНАШАЊУ
 КРАВА У ФАРМСКИМ УСЛОВИМА ДРЖАЊА**
 R. Prodanović, H. Šamanc, D. Kirovski, I. Vujanac, Ž. Sladojević
**SOME ASPECTS OF THE ETIOPATHOGENESIS OF BEHAVIOUR
 PROBLEMS AMONG COWS IN INTESIVE HOUSING CONDITIONS 221**

14. Драгица Ђурђевић-Милошевић, Весна Калаба, Милка Стијепић
**ПРОЦЕНА МЕРНЕ НЕСИГУРНОСТИ ПРИ ОДРЕЂИВАЊУ БРОЈА
 БАКТЕРИЈА ENTEROBACTERIACEAE**
 Dragica Đurđević-Milošević, Vesna Kalaba, Milka Stijepić
**ESTIMATION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY OF
 ENTEROBACTERIACEAE COLONY COUNT 229**

15. К. Тошић, З. Мехмедбашић, А. Немет, М. Ауберт
**ORAL VACCINATION OF FOXES: PRINCIPLE AND
 FIELD APPLICATION**
 K. Tošić, Z. Mehmedbašić, A. Nemet, M. Aubert
**ОРАЛНА ВАКЦИНАЦИЈА ЛИЦИЦА: ПРИНЦИП
 И ДИСТРИБУЦИЈА НА ТЕРЕНУ 237**

16. С. Росић-Бањанин
**ОБЈЕКТИВАН ОСВРТ НА ВЕТЕРИНАРСКУ СЛУЖБУ
 РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ И КАНАДЕ**

S. Rosić-Banjanin

**VETERINARY SERVICES OF THE REPUBLIC OF
SRPSKA VS. CANADA**

245

17. Т. Марковић, М. Зеленовић, Н. Митровић, В. Кадирић, Б. Иванић,
З. Ђерић, Ј. Лучић
**КОНВЕРЗИЈА АФЛАТОКСИНА Б1 ИЗ СТОЧНЕ ХРАНЕ У М1
АФЛАТОКСИН МЛИЈЕКА И МОГУЋНОСТИ ЊЕНЕ РЕДУКЦИЈЕ**
T. Marković, M. Zelenović, N. Mitrović, V. Kadirić, Z. Đerić, J. Lučić
**CONVERSION OF AFLATOXIN B1 FROM FEED IN AFLATOXIN
M1 OF MILK AND THE POSSIBILITY OF ITS REDUCTION** 253
18. Горан Параш, Смиљана Параш, Огњен Вујиновић, Огњен Витковић,
Бојан Лукач, Игор Чегар
**ХИПОФУНКЦИЈА ТИРЕОИДНЕ ЖЛИЈЕЗДЕ КОД ПАСА:
ПРИКАЗ СЛУЧАЈА**
Goran Paraš, Smiljana Paraš, Ognjen Vujinović, Ognjen Vitković,
Bojan Lukač, Igor Čegar
**HYPOFUNCTION OF THE THYROID GLAND IN DOGS:
CASE REPORT** 261
19. Џено Хаџовић, Зорана Мехмедбашић Девеџић,
Александар Немет, Свјетлана Батинић
**КОНТРОЛА БРУЦЕЛОЗЕ У БОСНИ И ХЕРЦЕГОВИНИ
У ПЕРИОДУ ЈАНУАР 2009. – ДЕЦЕМБАР 2012. ГОДИНЕ**
Dženo Hadžović, Zorana Mehmedbašić Devedžić,
Aleksandar Nemet, Svjetlana Batinić
**CONTROL OF BRUCELLOSIS IN BOSNIA AND HERZEGOVINA
FOR THE PERIOD JANUARY 2009 – DECEMBER 2012** 265
20. Oliver Stevanović, Darko Marinković
**ZASTUPLJENOST I TIPOVI TUMORA MLEČNE ŽLEZDE KOD
KUJA U BIOPSIJSKOM MATERIJALU**
Oliver Stevanović, Darko Marinković
**PREVALENCE AND TYPES OF BITCH MAMMARY GLAND
TUMORS IN THE BIOPSY MATERIAL** 274

DOI: 10.7251/VJRS1302101D

UDK 619:616.988:636.38/.39(495)

Nektarios D. Giadinis,¹ Aikaterini Chaintarli,² Jovan Bojkovski³

SLOW VIRAL INFECTIONS OF SMALL RUMINANTS IN GREECE

Abstract

The slow viral infections are from the most important problems of sheep and goat production in Greece. Diseases as enzootic nasal tumor, Maedi-Visna, caprine arthritis-encephalitis, pulmonary adenomatosis and Scrapie can cause significant losses in sheep and goat flocks. They can be transmitted during grazing or with animal sales. Here are described the clinicopathological findings of the aforementioned diseases, as well as their diagnosis and control.

Key words: slow viral infections, small ruminants.

Nektarios D. Giadinis,¹ Aikaterini Chaintarli,² Јован Бојковски³

ВИРУСНЕ ИНФЕКЦИЈЕ СПОРОГ ТОКА МАЛИХ ПРЕЖИВАРА У ГРЧКОЈ

Кратак садржај

Вирусне инфекције спорог тока су врло значајан проблем код оваца и коза у Грчкој. Обољења као што су *Maedi-Visna*, артритис и енцефалитис код коза (CAEV), аденоматоза и скрепи могу да узрокују значајне губитке у запатима оваца и коза. Могу да се пренесу у току испаше или продајом животиња. У овом раду је описан клиничко-патолошки налаз наведених болести, као и њихова дијагностика и контрола.

Кључне речи: вирусне инфекције спорог тока, мали преживари.

¹ Clinic of Farm Animals, School of Veterinary Medicine, Aristotle University, Thessaloniki, Greece.

² Private Veterinarian, Larissa, Greece.

³ Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia.

INTRODUCTION

Chronic viral diseases of small ruminants are from the most important problems in Greek small ruminant industry, because they are not treatable, as well as no effective vaccines are available against them. The repercussions resulting from this are the loss of production and of whole flocks and consequently the loss of farmers' income. Of crucial importance is also that other related professions are affected (veterinarians, feedstuffs, drugs, farm supplementation), while this impact is reflected to the National Economy (Giadinis, 2012).

These diseases are sheep progressive pneumonia, goat arthritis-encephalitis, pulmonary adenomatosis, enzootic nasal tumor and Scrapie.

SHEEP PROGRESSIVE PNEUMONIA (MAEDI-VISNA)

Sheep progressive pneumonia (Maedi-Visna) is caused by a non-oncogenic, exogenous retrovirus, which belongs to the lentivirus family (Pritchard and McConnell, 2007). It is transmitted with suckling (colostrum, milk) and horizontally animal to animal (Eltahir et al., 2006), while some researchers believe that vertical transmission via placenta also exists (Cortez-Romero et al., 2011). The virus causes a chronic disease with clinical demonstration mainly from the respiratory and the central nervous system. During the last years the disease

has been diagnosed many times in sheep with non-suppurative arthritis and with mastitis. Usually animals older than 2 years old are infected, although it has been observed in younger ones (Belknap 2002; Pritchard and McConnell, 2007). It is useful to mention, that sheep progressive pneumonia is very commonly diagnosed in Greece, although a systematic epidemiological study has not been conducted to date.

Maedi-Visna is usually observed in animals older than 2 years old, although clinical symptoms of this disease in younger animals have been observed. The respiratory form is characterized by chronic weight loss, dyspnea and tachypnea worsening with time and exercise. At the final stages the animals can have orthopnoic stance and they die from dyspnea or secondary bacterial infections. Lung auscultation reveals reduction or absence of the alveolar sound. As far as the nervous form, the infected animals develop monoparesis, ataxia and proprioceptive deficits, while at the later stages they have paraparesis or tetraparesis, they become comatose and die. The arthritic form is characterized by non-purulent chronic arthritis, especially in the carpal joints and more rarely in the tarsal ones. The mastitic form (hard udder, hardbag) is evident with the reduction of milk production or of milk flow. In the case of mastitic and arthritic form the animals can have normal body condition. Maedi-Visna infection can predispose to pregnancy toxemia (Bel-

knap, 2002; Pritchard and McConnell, 2007; Giadinis, 2012a).

The clinical forms of Maedi-Visna can be diagnosed by necropsy, although many times histopathological confirmation or immunohistochemistry are necessary. Serology or PCR (blood, tissues) contribute to the detection of viral infection, but are not enough to confirm the clinical diagnosis (Pritchard and McConnell, 2007).

Maedi-Visna is a non-treatable condition. The disease can be prevented in non-infected flocks mainly by buying animals that are free of the virus and by avoiding the co-existence of healthy and infected animals, e.g. grazing. Also, it is useful in regular time intervals to examine serologically a number of animals. In infected flocks eradication is difficult. A number of control protocols have been suggested, but they have many disadvantages:

I) Slaughtering of the whole flock is difficult, as it has severe economic impact. However, sometimes (mastitis, high mortality) it seems to be the only solution (Pritchard and McConnell, 2007; Giadinis, 2012a).

II) Removal of neonatal lambs from their mothers after birth and use of artificial suckling or suckling of seronegative mothers. This protocol has been used in experimental flocks, but it is difficult to be approved in commercial ones. The factors which could lead to the failure of this protocol are the contact with their

mother and the suspected vertical transmission of the disease (Pritchard and McConnell, 2007).

III) All the adult animals of the flock are examined every 3–6 months and seropositives are slaughtered, as well as their progeny. Eradication has been completed, when 2 consecutive serological examinations are negative. For the already aforementioned reasons this protocol is ineffective, while it has high cost and is time-consuming (Pritchard and McConnell, 2007).

IV) An economical and relatively easy protocol is the one performed by our Clinic:

If the disease has been diagnosed in a flock, every animal with signs of the disease is slaughtered, as well as their progeny. The rest flock is regularly dewormed and the animals are fed with vitamins and trace elements for the whole year. Furthermore, good hygiene measures and husbandry are necessary. In this way, many flocks in Greece have become economically profitable (Giadinis, 2012).

CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS (CAEV)

Caprine arthritis-encephalitis (CAEV) is caused by a retrovirus, antigenically similar to the Maedi-Visna agent and is transmitted in a similar way. The disease has 2 clinical forms, the arthritic and the nervous. The arthritic form causes ancyrotic arthritis in animals older than 2

years old, while the nervous one can cause myelitis (less often encephalitis) in goat kids aged 2–6 months old. During the last years other forms of the disease have been diagnosed, as chronic inducive mastitis and interstitial pneumonia. Diagnosis, treatment and prevention are similar to sheep Maedi-Visna (Smith and Sherman, 2009).

PULMONARY ADENOMATOSIS

Pulmonary adenomatosis is caused by an exogenous retrovirus that is different from the Maedi-Visna virus and the disease is transmissible. It is a chronic cachexiogenic disease that concerns mainly sheep and rarely goats, whereas it does not affect cattle (Sharp and De lasHeras, 2007). In Greece it is not as widespread as Maedi-Visna is, although sometimes they do co-exist in the same animal (Giadinis, 2012). The annual losses are 2–10%, although in Iceland, where the disease was observed for the first time, the annual losses reached the level of 80 % (Sharp and De lasHeras, 2007). In Greece the disease is observed sporadically.

Pulmonary adenomatosis is transmitted with the respiratory secretions of the infected animals and usually animals infected early in their life (younger than 10 months) are getting sick. Also, recent studies have shown that the virus is excreted through colostrum and milk (Sharp and De lasHeras, 2007). Usually it infects animals at the age of 2–4 years

old, but the disease has been diagnosed also in lambs aged 1–2 months old. These are usually the progeny of infected dams (Sharp and De lasHeras, 2007; Scott, 2007). Sick animals lose weight, although their appetite is normal. Moreover, they have a progressively deteriorated dyspnea and tachypnea which are increased after exercise. The most important sign of the disease is the copious nasal discharge. If the infected animal is kept from its hind-legs ("wheelbarrow test"), the discharge is excreted. Its volume can be 30–50 ml, but it can sometimes reach 300 ml (equal to the quantity of a full glass). This finding is pathognomonic but it is not always a clinical symptom. It is common in Greece, while pulmonary adenomatosis usually co-exists with Maedi-Visna. Increased crackles are heard over a wide area of the chest during auscultation in the typical form of the disease. Infected animals die in 1–4 months due to bacterial infections (Sharp and De lasHeras, 2007; Scott, 2007; Sargison, 2008; Giadinis 2012).

Diagnosis is based, upon history, on clinical findings and necropsy, but it can be confirmed by histopathological examination or immunohistochemistry (Sharp and De lasHeras, 2007). Also, ultrasound can be helpful for clinical diagnosis (Scott, 2007). During the last years, a PCR technique has been developed. The last detects the virus in the blood and tissues not only of the host but also of the carrier animals (Sharp and De lasHeras, 2007).

The disease is non-treatable. The affected animals should be slaughtered immediately, while good nutrition and regular deworming increase the resistance to the disease. PCR and embryo transfer could help in the eradication of the disease in the future. However, in Iceland where the disease was endemic, it was eradicated after slaughtering the whole infected flocks. In the case that Maedi-Visna co-exists, then the best solution is slaughtering the whole flock (Sharp and De lasHeras, 2007; Sargison, 2008; Giadinis, 2012a).

ENZOOTIC NASAL ADENOCARCINOMA (TUMOR)

Enzootic nasal adenocarcinoma (tumor) is a contagious disease of the nasal cavities that focuses on mucosal glands and can be uni- or bilateral. The disease is sporadic (0,5–2 %), although morbidity in some flocks is up to 15 %. Nowadays, the disease is very common in Greece due to the uncontrolled animal sales. The infected animals have low production and the disease is always fatal (Giadinis, 2012a).

The disease is caused by a retrovirus which is homologous but different to pulmonary adenomatosis virus. Also, the virus is different between sheep and goats and consequently there is not inter-species contamination. Reproduction of the disease is difficult. Usually, animals 2-4 years old are infected, although the disease has been reported in lambs 4 months old and goat kids 7 months old.

The animals have seromucous or mucopurulent nasal discharge, that is uni- or bilateral, stridor, that progressively becomes evident from a distance, exercise intolerance and inspiratory dyspnea which deteriorate gradually. At the final stages the animals have their mouth open when breathing. During the nasal auscultation a stridor is heard, which is intense at larynx but it is reduced and disappears lower. Furthermore, although it is rare, facial deformation and exophthalmus can be observed. The animals become cachectic and finally die from bacterial infections or asphyxia (Belknap, 2002; Sharp and De lasHeras, 2007; Giadinis, 2012).

Diagnosis is based upon clinical and necropsy findings, but is confirmed by histopathology or cytology. The disease should be differentiated from oestrosis, pararhinocolpitis, actinobacillosis and actinomycosis (Loukopoulos et al., 2010; Ioannou et al., 2011; Giadinis, 2012a).

Animals of high reproductive value could be treated with surgical excision that is usually ineffective. The best choice is to slaughter the infected animals before they lose weight. Prevention is also difficult. It is suggested to buy animals only from healthy flocks (Belknap, 2002; Giadinis., 2012).

SCRAPIE

Scrapie is a progressive degenerative encephalopathy of sheep and goats. The disease was known since 19th century in UK, while in Greece it was diagnosed for

the first time in the 80s (Argiroudís et al., 1987) and today it is widespread throughout the country. As it belongs to spongiform encephalopathies, it has zoonotic interest and it is intensively investigated. Scrapie, although is not zoonotic, it is a notifiable disease (Scott, 2007; Sargison, 2008).

Scrapie is caused by a modified glucoprotein (prion) that is self-reproduced in animal tissues, although it has not DNA or RNA. The disease has been reproduced. Transmission is horizontal and vertical. It can be transmitted with animal sales and during grazing. The last years it has been pointed out that prion is abundant in fetal fluids, is secreted through milk and it can be transmitted with endo- and ectoparasites. A genetic susceptibility to the prion is accepted (Jeffrey and González, 2007, Giadinis, 2012).

Scrapie is found in animals older than 2 years old, but there are also strains which infect younger animals (5–12 months old). Initially, the animals change their behavior and sometimes they deny to be milked. Then, they lose weight and have progressively deteriorated ataxia and other neurological signs, as muscular tremor, salivation, tympany, blindness and paresis. A characteristic symptom is pruritus at the back and hind legs. Sometimes the animals lick these areas and scrape them at fences. A slight pressure at the lumbar area causes reflexive motions of their lips (nibbling reflex). Pruritus in goats is absent or minimized.

The animals die after 1–6 months (Sofianidis et al., 2006, Jeffrey and González 2007, Giadinis, 2012).

Scrapie should be differentiated from other brain encephalopathies, like chronic coenurosis, Visna, CAEV. As far as the pruritus, it should be differentiated between chorioptic mange and pseudorabies (Giadinis, 2012). In goats, pruritus is minimized or missing. Diagnosis of Scrapie can be confirmed only in dead animals. The 3 most reliable diagnostic methods are brain histopathology, immunohistochemistry and Western blot (Jeffrey and González, 2007).

During the last years atypical forms of Scrapie have been diagnosed (Norvegic type or Nor-98). They are observed in animals older than 3 years old and they usually have similar clinical signs to the other two types, although pruritus can be absent or the animals can be asymptomatic (Benetsad et al., 2003; Jeffrey and González, 2007).

Prognosis for Scrapie is poor, as the disease is untreatable and the flocks often have high mortality. As far as prevention, it is suggested to buy animals which come from flocks that are not infected by Scrapie and also have animals resistant to the disease (ARR/ARR is the most resistant genotype for sheep). During the last years also resistant genotypes have been found in goats. In flocks where Scrapie has been diagnosed the existing legislation is followed (notifiable disease). In case of Scrapie outbreaks, it is

necessary all the infected animals to be killed. Moreover, other measures that increase the animal survival and decrease the infection rate (disinfections, dewormings, good nutrition, special places for parturition) would be useful. Last but not least, resistant genotypes are necessary for the flock reproduction (Jeffrey and González, 2007; Fragkiadaki et al., 2011; Giadinis, 2012).

CONCLUSION

In Greece slow viral infections seem to be common. These conditions are not treatable, as well as no vaccines are available and so preventive biosecurity measures seem to be necessary for avoidance of infections.

REFERENCES

1. Argiroudis S., Psychas V., Christopoulos C., Leontides S., Papasteriades A. (1987): *The first cases of Scrapie in a sheep flock in Greece*. In: Proceedings of the 4th Greek Veterinary Congress, Athens, pp. 141–142.
2. Belknap E. B. (2002): *Diseases of the Respiratory System*. In: Sheep and Goat Medicine, D. G. Pugh (editor), Saunders, USA, pp. 107–128.
3. Benestad S. L., Sarradin P., Thu B., Schönheit J., Tranulis M. A., Bratberg B. (2003): *Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type*, Nor98. Veterinary Record, 153: 202–208.
4. Cortez-Romero C., Fieni F., Russo P., Pepin M., Roux C., Pellerin J. L. (2011): *Presence of MaediVisna virus (MVV)-proviral DNA in the genital tissues of naturally infected ewes*. Reproduction in Domestic Animals, 46:1–6.
5. Eltahir Y. M., Dovas C. I., Papanastassopoulou M., Koumbati M., Giadinis N., Verghese-Nikolakaki S., Koptopoulos G. (2006): *Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirusproviral DNA*. Journal of Virological Methods, 135: 240–246.
6. Fragkiadaki E. G., Vaccari G., Ekateriniadou L. V., Agrimi U., Giadinis N. D., Chiappini B., Esposito E., Conte M., Nonno R. (2011): *PRNP genetic variability and molecular typing of natural goat scrapie isolates in a high number of infected flocks*. Veterinary Research 42: 104.
7. Giadinis N.D. (2012): *Chronic viral infections of small ruminants*. In: Proceedings of the 12th Greek Veterinary Congress, Athens, April, pp. 1–7.
8. Giadinis N. D. (2012a): *Diseases of Small Ruminants*, A Textbook for the Students of the Veterinary School in Thessaloniki.
9. Ioannou I., Giadinis N. D., Dovas C. I., Konstantinou P., Georgiadou S., Psychas V., Apostolidi E., Kaldry-

- midou E., Loukopoulos, P. (2011): *Enzootic nasal tumour of sheep in Cyprus and Greece*. In: Proceedings of the 29th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the European College of Veterinary Pathologists, and 9th European Congress of Toxicologic Pathology of the European Society of Toxicologic Pathology, Uppsala, Sweden 7–10 September, pp. 84.
10. Jeffrey M., González L. (2007): *Scrapie*. In: Diseases of Sheep, 4th edition, I. D. Aitken (editor), Blackwell Publishing, UK, pp. 241–250.
11. Loukopoulos P., Giadinis N. D., Psychas V., Dovas C. I., Kaldrymidou, E. (2010): *Enzootic nasal tumour of goats in Greece*. In: Proceedings of the 28th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the European College of Veterinary Pathologists, Belgrade, Serbia, 8–11 September, pp. 50.
12. Pritchard G. C., McConnell I. (2007): *Maedi-Visna*. In: Diseases of Sheep, 4th edition, I.D. Aitken (editor), Blackwell Publishing, UK, pp. 217–223.
13. Sargison N. (2008): *Sheep Flock Health*, Blackwell Publishing, UK.
14. Scott P. R. (2007): *Sheep Medicine*, Manson Publishing, UK.
15. Sharp J. M., De las Heras M. (2007): *Contagious respiratory tumors*. In: Diseases of Sheep, 4th edition, I.D. Aitken (editor), Blackwell Publishing, UK, pp. 211–217.
16. Sofianidis G., Psychas V., Billinis C., Spyrou V., Argyroudou S., Papaioannou N., Vlemmas I. (2006): *Histopathological and immunohistochemical features of natural goat scrapie*. Journal of Comparative Pathology 135: 116–129.



DOI: 10.7251/VJRS1302109K

UDK 637.12:616-074

Д. Кировски,¹ Х. Шаманц,² Ж. Сладојевић,² Р. Продановић,¹ И. Вујанац¹

НУТРИТИВНИ СТАТУС ВИСОКОМЛЕЧНИХ КРАВА: ПРОЦЕНА НА ОСНОВУ САСТАВА МЛЕКА

Кратак садржај

За испитивање је узорковано млеко добијено од сто крава 30. дана лактације током јутарње и вечерње муже. Анализом резултата установљено је да су краве биле у стању негативног биланса енергије. Није било значајне разлике у концентрацији масти и протеина између јутарње и вечерње муже, али је концентрација уреје била значајно виша током јутарње муже, указујући да су јединке током ноћи гладовале односно да је распон између вечерњег и јутарњег храњења био значајно дужи. Због тога, протеини хране нису могли да буду искористићени за синтезу високовредних протеина, већ су се њихови производи разлагања конвертовали у уреу, која се излучивала путем млека.

Кључне речи: краве, нутритивни статус, састав.

D. Kirovski,¹ H. Šamanc,¹ Ž. Sladojević,² R. Prodanović, I. Vujanac

NUTRITIONAL STATUS OF DAIRY COWS: ESTIMATION BASED ON MILK COMPOSITION

Abstract

Investigation was done using morning and evening milk samples from 100 cows that were 30 days in lactation. Obtained results showed that all cows were in state on negative energy balance. There was no significant difference between morning and evening milk samples in fat and protein concentrations, but urea concentration was significantly higher in morning compared to evening milk samples, indicating that cows were exposed to over-night starvation, meaning that period

¹ Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Београд, Србија.

² Ветерина систем Сладојевић, д.о.о., Градиште, Република Српска.

between evening and morning feeding were to long. Therefore, dietary proteins were not used for synthesis of animal proteins but were converted to urea that was excreted by milk.

Key words: cows, nutritional status, milk composition.

УВОД

Валидни показатељи нутритивног статуса крава оцена су телесне кондиције: концентрација биохемијских параметара крви, хормонални статус и/или концентрација органских састојака (масти, протеина и урее) у млеку (Кировски и сар., 2012; Продановић и сар., 2012). За процену нутритивног статуса крава може се узети збирни узорак млека од свих или појединих музних крава или појединачни узорак од појединих или свих крава у лактацији на једној фарми (Задник и сар., 2000). Физиолошка основа употребе наведених параметара млека (масти, протеина и урее) у процени нутритивног статуса крава заснива се превасходно на интеракцији енергетског метаболизма и метаболизма протеина током искоришћавања састојака хране за производњу млека. Наиме, протеини који се користе у исхрани говеда највећим делом су разградиви у бурагу. Само мали део протеина хране не подлеже разградњи од стране бактерија бурага већ доспева непромењен у танко црево, где се користи. При разлагању протеина хране, у бурагу се ослобађа амонијак, који се делом ресорбује и порталним крвотоком

доспева у јетру, где се у орнитинском циклусу детоксикује преласком у уреу (Broderic и Clauton, 1997). При појачаном интензитету тог процеса, концентрација урее у крви расте. С обзиром на то да је уреа лако дифузибилни молекул који пролази кроз ћелијску мембрану, њена концентрација у млеку ће такође врло брзо порасти. Интензитет овог процеса зависи од снабдевености организма енергијом и протеинима. Смањен садржај енергије у obroку смањује број и активност бактерија бурага. На тај начин, амонијак који настаје у бурагу разградњом протеина не може у потпуности да се искористи од бактерија за синтезу бактеријских протеина, које ће касније у танком цреву бити даље искоришћене. Тада количина амонијака расте и последично се повећава и концентрација урее у крви и млеку (Johnson и Young, 2003). С друге стране, смањен је опсег синтезе бактеријских протеина у бурагу, због чега се снижава концентрација аминокиселина и протеина крви. С обзиром на то да се аминокиселине крви користе за синтезу протеина млека, смањење њихове концентрације доводи до смањене синтезе протеина у млечној жлезди и последично мање концен-

трације протеина у млеку (Westwood, 1998). Треба напоменути да је енергија, која се добија разлагањем глукозе, значајан фактор који доприноси синтези протеина млека (Rius и сар., 2010). Масти млека потичу превасходно из нижих масних киселина ресорбованих у бурагу, али и делом из масних киселина из крвотока. Од масних киселина бурага, посебан значај у синтези масти млека има сирћетна киселина, која претежно настаје дигестијом сирових влакана из оброка, али делом и бутерна киселина, која се у зиду бурага преводи у бета-хидроксид-бутерну киселину, која се користи за синтезу млечне масти. Масне киселине присутне у циркулацији, које се користе за синтезу млечне масти, потичу делом из масти мобилисаних из телесних депоа, делом из масних киселина ресорбованих из дигестивног тракта, а делом из масних киселина метаболисаних у јетри (Bauman и Griinari, 2003).

Циљ овог рада био је да се на основу концентрације протеина, масти и урее у млеку одреди нутритивни статус крава.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Испитивања су обављена на 100 крава Холштајн расе 30. дана лактације, на фарми комерцијалног типа. Исхрана крава заснивала се на оброку који је био препоручен за ту категорију крава. Одређена је млечност крава током јутарње (7 часова) и вечерње муже (17 часова). У узорцима млека

узетим током јутрање и вечерње муже одређивани су концентрација масти, протеина, док је за одређивање урее издвојен млечни серум. Млечни серум је добијен на следећи начин: најпре је центрифугирањем (15 минута/ 3000 обртаја) узорка млека (2 мл) издвојена млечна маст уз помоћ вакуум пумпе. Затим је у тако обрађене узорке млека додато 10 микролитара лаб-фермена. Након инкубирања у трајању од 30 минута на 37°C извршено је поновно центрифугирање узорка (15 минута/ 3000 обртаја) и издвојен супернатант. Концентрације протеина и масти у млеку одређене су апаратом Milcoscan. Концентрација урее у млечном серуму утврђена је уз помоћ спектрофотометра CECIL 2021, коришћењем MUN (Milk Urea Nitrogen) теста.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Млечност крава током јутрање муже 30. дана лактације је била $33,00 \pm 4,14$ литара, док је током вечерње муже била $31,12 \pm 3,81$ литара и ова разлика је била статистички значајна ($p < 0,01$). За оптималну прозводњу млека неопходно је да разлика између јутарње и вечерње муже не буде статистички значајна (Quiest и сар., 2008). Уколико се ова разлика појави, као у нашем случају, вероватно се ради о грешкама у технолошком процесу производње које доводе до ове разлике. Највероватније је да размак између јутарње и вечерње муже који је краћи од 12 сати, колико је опти-

мално, условљава ову разлику у млечности.

Средње вредности концентрације протеина, масти и урее у млеку крава

узетом током јутарње и вечерње муже, као и статистичка значајност разлике приказани су у табели 1.

Табела 1. Средње вредности концентрације протеина, масти и урее у млеку крава узетом током јутарње и вечерње муже, као и статистичка значајност разлике

	Масти млека (г/л)		Протеини млека (г/л)		Уреа млека (ммол/л)	
	Јутарња мужа	Вечерња мужа	Јутарња мужа	Вечерња мужа	Јутарња мужа	Вечерња мужа
Ср ±	33,20 ±	34,84 ±	30,99 ±	31,17 ±	5,79 ±	4,46 ±
СД	8,36	9,04	2,94	9,13	1,47	1,19***

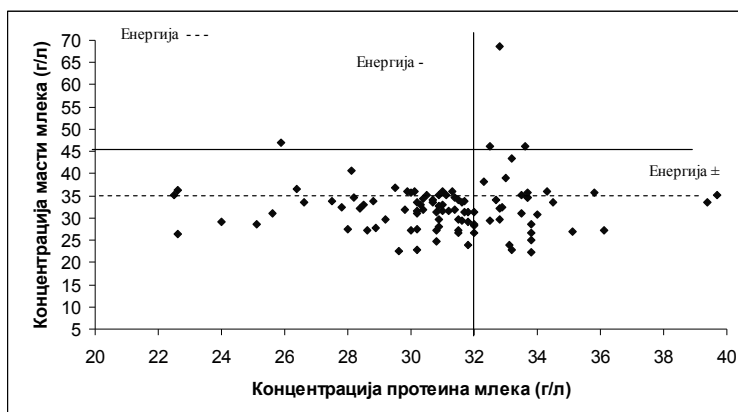
*** $p < 0,001$ статистичка значајност разлике у односу на вредност истог параметра одређену у јутарњој мужи

Концентрације масти како током јутарње тако и током вечерње муже биле су у границама физиолошких вредности за Холштајн расу крава, док су концентрације протеина биле нешто ниже од препоручених. Концентрација урее у млеку крава је била у складу са очекиваним вредностима за ову расу говеда. Међутим, концентрација урее у јутарњим узорцима млека је била значајно виша него у вечерњим. Ова разлика је највероватније последица тога што је интервал неуношења хране код крава дужи у периоду од вечерње до јутарње муже него од јутарње до вечерње муже. Због тога, током ноћи, дефицит енергије у исхрани крава долази до пуног изражаја и одражава се и на састав млека. Тиме се објашњава виша концентрација урее током јутарње муже (Шаманц и сар., 2008). Наиме, многи

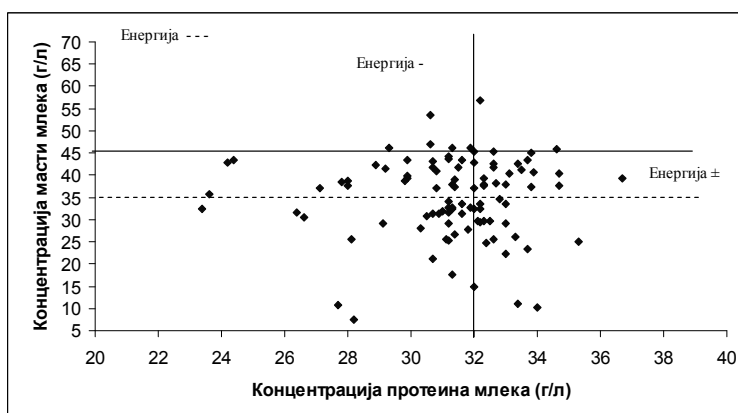
аутори за правилну оцену нутритивног статуса крава препоручују да се анализира млеко и јутарње и вечерње муже (Quiest и сар., 2008; Smith и сар., 2002). Недостатак енергије у obroку условљава смањену активност бактеријске флоре бурага, због чега она не може у целости да искористи амонијак, настао разграђивањем протеина, за синтезу сопствених протеина. Тиме количина амонијака у бурагу расте, он се ресорбује и доспева у јетру, где се ствара повећана количина урее. То прати повећање концентрације урее у млеку. Истовремено је смањен и опсег синтезе бактеријских протеина у бурагу. Тиме је смањена могућност синтезе протеина, па је и њихова концентрација у млеку нешто нижа него што је физиолошка вредност.

Добијени резултати су приказани и графички. Однос концентрација урее и протеина у млеку крава узрокованом током јутарње муже приказан је на графикону 1, а током вечерње му-

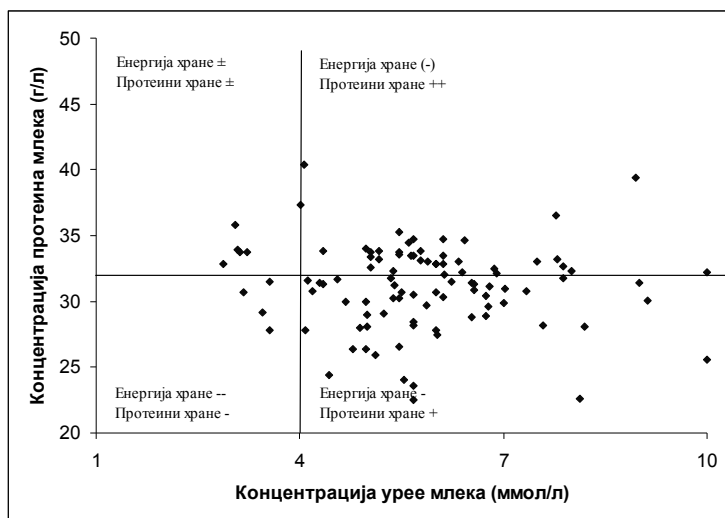
же на графикону 2. Однос концентрација масти и протеина у млеку крава узоркованом током јутарње муже приказан је на графикону 3, а током вечерње муже на графикону 4.



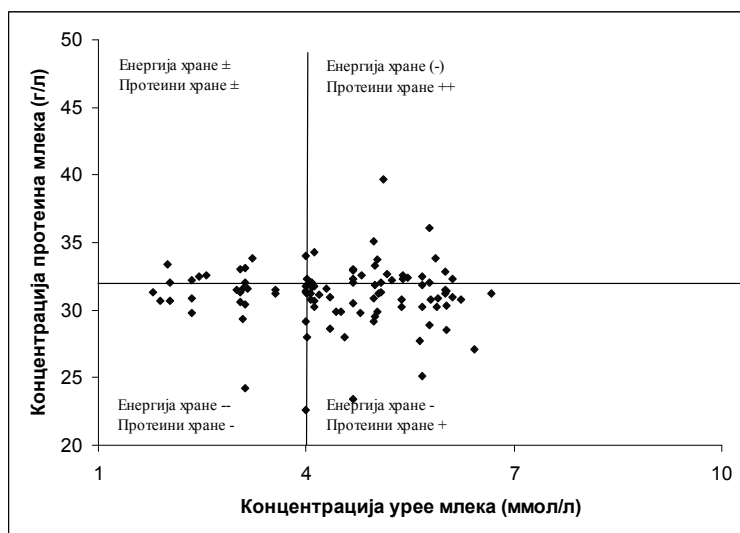
Графикон 1. Однос концентрација масти и протеина млека у појединачним узорцима млека узетим током јутарње муже 30. дана лактације



Графикон 2. Однос концентрација масти и протеина млека у појединачним узорцима млека узетим током вечерње муже 30. дана лактације



Графикон 3. Однос концентрација протеина и урее млека у појединачним узорцима млека узетим током јутарње muže 30. дана лактације



Графикон 4. Однос концентрација протеина и урее млека у појединачним узорцима млека узетим током вечерње muže 30. дана лактације

Из графика 1. запажа се да се већина тачака налази у доњем левом квадранту, што указује на изражен негативан биланс енергије на почетку лактације. Претпоставља се да је то последица тога што оброци у исхрани крава не задовољавају у погледу садржаја енергије и протеина или су животиње болесне и не једу довољно хране. Неуношење довољно хране у раној фази лактације још више продубљује негативан биланс енергије на почетку лактације и смањује производне способности испитиваних јединки (Grummer, 1993; Tamminga, 2006). Ситуација је слична, али у мало блажој форми изражена, у узорцима млека узетим током вечерње муже.

Из графика 3. и 4. запажа се да је највећи број тачака у доњем десном квадранту, поготово у узорцима млека добијеним током јутарње муже. То указује на то да се, највероватније, код тих крава ради о дефициту енергије уз релативан суфицит протеина у оброку. Овај резултат је донекле потврђен нешто вишом концентрацијом урее у утврђене у млеку крава током јутарње муже.

Приказане концентрације масти, протеина и урее у млеку су релативно поуздани показатељи нутритивног статуса крава у најранијој фази лактације. На основу добијених резултата могу да се дају препоруке које би отклониле евентуално утврђене поремећаје у нутритивном статусу крава. С обзиром на то да је установљен дефицит енергије код испитиваних крава,

може да се препоручи корекција obroка повећањем количине енергетских хранива у исхрани крава. Уз то, с обзиром на то да су све испитиване краве у првој фази лактације, када су иначе у стању негативног биланса енергије, сматра се да у оваквим случајевима краве нису на одговарајући начин припремљене за наступајућу лактацију. Одређивањем концентрације урее у узорцима млека јутарње и вечерње муже утврђено је да дефицит енергије, који долази до пуног изражаја током ноћи, има као последицу вишу концентрацију урее у млеку јутарње у односу на млеко вечерње муже.

ЗАКЉУЧАК

До сада коришћени дијагностички поступци нашли су ограничену примену у свакодневной пракси, како због своје недовољне поузданости (оцењивање телесне кондиције) или неекономичности (метаболички профил и хормонални статус крава). Поступак одређивања концентрације урее, масти и протеина у млеку, као показатеља нутритивног статуса, поуздана је и рационална метода за дијагностиковање одступања у нутритивном статусу крава, финансијски прихватљива за произвођаче, без обзира на то да ли се примењује на мини или великим фармама говеда.

НАПОМЕНА: Овај рад је урађен у оквиру Пројекта III 46002, финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bauman D. E., Griinari J. M. (2003): *Nutritional regulation of milk fat synthesis*, Anu Rev Nutr 23: 203–227.
2. Broderick G. A., Clayton M. K., (1997): *A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen*, J Dairy Sci, 80: 2964–2971.
3. Grummer R. R. (1991): *Effect of feed on the composition on milk fat*, J Dairy Sci 74: 3244–57.
4. Johnson R. G., Young A. J., (2003): *The association between milk urea nitrogen and DHI production variables in commercial dairy herds*, J Dairy Sci 86: 3008–15.
5. Kirovski Danijela, Šamanc H., Prodanović R. (2012): *Procena energetskog statusa krava na osnovu koncentracije masti, proteina i uree u mleku*, Veterinarski glasnik 66: 97–110.
6. Prodanović R., Kirovski Danijela, Šamanc H., Vujanac I., Ivetić V., Savić B., Kureljušić B. (2012): *Estimation of herd-basis energy status in clinically healthy Holstein cows: practical implications of body condition scoring and shortened metabolic profiles*, African Journal of Agricultural Research 7: 418–425.
7. Quiest M. A., LeBlanc S. J., Hand K. J., Lazenby D., Miglior F., Kelton D. F. (2008): *Milking to milking variability for milk yield, fat and protein percentage, and somatic cell count*, J Dairy Sci 91: 3412–3423.
8. Rius A. G., Appuhamy J. A., Cyriac J., Kirovski D., Becvar O., Escobar J., McGilliard M. L., Bequette B. J., Akers R. M., Hanigan M. (2010): *Regulation of protein synthesis in mammary glands of lacting dairy cows by starch and aminoacids*, J Dairy Sci 93: 3114–27.
9. Smith J. W., Ely L. O., Graves W. M., Gilson W. D., 2002, *Effect of milking frequency on DHI performances measures*, J Dairy Science, 85, 12, 3526–33.
10. Šamanc H., Kirovski Danijela, Dimitrijević B., Vujanac I., Damjanović Z., Polovina M. (2006): *Procena energetskog statusa krava u laktaciji određivanjem koncentracije organskih sastojaka mлека*, Veterinarski glasnik 60: 5–6, 283–297.
11. Tamminga S. (2006): *The effect of the supply of rumen degradable protein and metabolisable protein on negative energy balance and fertility in dairy cows*, Anim Reprod Sci 96: 227–239.
12. Westwood C. T., Lean I. J., Kellaway R. C. (1998): *Indications and implications for testing of milk urea in dairy cattle: A Quantitative review. Part 1. Dietary protein sources and metabolism*, New Zeland Veterinary Journal 46: 87–96.
13. Zadnik T., Klinkon M., Nemec M., Mesarić M. (2000): *Dijagnosticiranje pojedinih bolesti goveda iz zajedničkih uzoraka mlijeka*, Praxix veterinaria 48: 55–63.

DOI: 10.7251/VJRS1302117C

UDK 612.014.46:541.41

Vitomir Ćupić,¹ Biljana Antonijević,² Vesna Matović,² Zorica Bulat,² Saša Vasilev³

KLINIČKE MANIFESTACIJE I MEHANIZMI TOKSIČNOG DELOVANJA HEMIJSKIH SUPSTANCIJA

Kratak sadržaj

Kada određena supstanca uđe u organizam, njeno toksično delovanje se klinički može manifestovati na razne načine, zavisno od vrste poremećaja prouzrokovano na nivou ćelije. Vezivanjem za određene endogene molekule, toksična jedinjenja mogu prouzrokovati poremećaj genske ekspresije (neoplazija, teratogeneza), poremećaj tekućih ili trenutnih aktivnosti ćelije (tremor, konvulzije, spazam, aritmija), poremećaj integriteta ćelije (poremećaj sinteze proteina, poremećaj funkcije ćelijske membrane, smrt ćelije) i poremećaj odnosa sa drugim ćelijama (poremećaj u hemostazi – krvarenje).

Najteži poremećaji, koji nastaju usled vezivanja hemijskih supstancija sa takozvanim „kritičnim proteinima” (DNK, RNK), klinički se mogu manifestovati kao: mutageneza, karcinogeneza, teratogeneza i imunotoksičnost.

Ključne reči: mutageneza, karcinogeneza, teratogeneza, imunotoksičnost.

Vitomir Ćupić,² Biljana Antonijević,² Vesna Matović,² Zorica Bulat,² Saša Vasilev³

CLINICAL MANIFESTATIONS AND TOXIC EFFECT MECHANISMS OF CHEMICAL SUBSTANCES

Abstract

When chemical compound enter the body, its toxic effect may clinical to demonstrate in different way, depend from kind of disturbance, what that substance induced in the cell. Binding for endogenous molecules toxic substances

¹ Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

² Katedra za toksikološku hemiju, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu.

³ Institut za primenu nuklearne energije, INEP, Zemun.

can induced disturbance of gens expression (neoplasia, teratogenesis), disturbance of curently activities of cell (tremor, convulsions, spasm, aritmia), disturbance of integrity of cell (disturbance of sinthesis of proteins, disturbance of function of cell membrane, death of cell) and disturbance of relation with other cells (disorders of hemostasis – bleeding).

The most serious disturbances which may to begin because of binding chemical substances for so-called “critical proteins” (DNA, RNA) clinical may to demonstrate as: mutagenesis, carcinogenesis, teratogenesis and as immunotoxicity.

Key words: mutagenesis, carcinogenesis, teratogenesis and immunotoxicity.

UVOD

Mogućnost trovanja ljudi, a posebno domaćih životinja, danas je izuzetno velika. Pored mnogobrojnih hemijskih supstancija, kao što su razni insekticidi (ovicidi, larvicidi, adulticidi, atraktanti i repelenti), rodenticidi (raticidi i muricidi), fungicidi, limacidi (moluskicidi), herbicidi (silvicidi, desikanti i defolianti), trovanje kod životinja mogu uzrokovati i neke biljke (odnosno alkaloidi, glikozidi i saponini – toksične materije sadržane u njima), koje životinje mogu konzumirati, naročito kada su gladne (Bruere i sar., 1990; Plumlee, 2004).

Bez obzira na veliku upotrebu pesticida, naročito u razvijenim zemljama, u današnje vreme hronična trovanja nisu tako čest uzrok bolesti kod životinja. Jedva da se desi u više od jednog slučaja na 100 životinja, bilo koje vrste (Bandal i sar., 1981).

Međutim, kada su u pitanju akutna trovanja, broj trovanih životinja je daleko veći. Posebno je broj pozitivnih dija-

gnoza povećan tamo gde postoje dokazi o kontaktu ili povezanosti bolesti sa potencijalnim toksičnim agansom ili dokazi da je životinja viđena da konzumira, odnosno da je bila izložena specifičnom otrovu (Lorgue i sar., 1996).

MEHANIZMI TOKSIČNOG DELOVANJA HEMIJSKIH SUPSTANCIJA

Da li će se određeni simptomi toksičnog delovanja hemijskih supstancija ili pak trovanja razviti i u kolikom stepenu, zavisice od količine apsorbovane supstancije (otrova), zatim vrste i starosti životinje, njenog opšteg zdravlja, individualnih varijacija i drugih potencirajućih ili predisponirajućih faktora (Andrews i Humphrey, 1982).

Takođe, stepen toksičnosti nekog jedinjenja zavisi i od toga da li se neka supstancija u organizmu metabolizuje, kakvi su metaboliti po toksičnosti u odnosu na izvorno jedinjenje, da li ta supstancija i/ili metabolit deluje toksično bez reagovanja sa endogenim mole-

kulima ili pak ulazi u ćelije i u njima (reagujući sa specifičnim receptorima, nukleinskim kiselinama, proteinima, odnosno raznim enzimima) remeti određene bioхемијске процесе значајне за живот ћелије, па самим тим i организма (Vojvodić, 1997). Наравно, u свему овоме велику улогу имају i механизми репарације на молекуларном, ћелијском i tkивном nivou. Уколико су заштитни механизми којим располажу биолошки системи недовољни да отклоне све последице деловања тоksičnih супстанција, тада настају различити облици тровања (Jokanović, 2001).

POSLEDICE TOKSIČNOG DELOVANJA HEMIJSKIH SUPSTANCIJA NA ĆELIJE

Ћелије за своје текуће активности, деобу, диференцијацију или програмiranу смрт (apoptozu), те метаболisanje разних хранљивих састојака, користе бројне синтетичке, метаболичке, кинетичке, транспортне i енергетске системе (Buja i sar., 1993). Ови системи су организовани u макромолекулске комплексе, u облику органа или ћелијске мембране, помоћу којих ћелије одржавају унутрашњи интегритет i однос према другим ћелијама. Какав ће поремећај ћелијске функције настати, зависи пре свега од тога са којим је молекулом тоksiчна хемијска супстанција (отров) stupila u интеракцију (Gregus, 1996). Уколико је тај молекул био укључен u регулацију функције ћелије, тада може доћи до *porемећаја genske експресије i porемећаја u trenutnoj активности ћелија*. С друге стране, ако је молекул са којим је stupio u интеракцију отров, укључен u

održavanje интегритета ћелије, тада може настати *porемећај унутрашњег интегритета i porемећај u односу са другим ћелијама* (Nelson i Pearson, 1990).

U оквиру *porемећаја genske експресије* може доћи до поремећаја u транскрипцији генетских информација са DNK на RNK, затим поремећаја u трансдукцији (преношењу сигнала), као i поремећаја u продукцији сигнала. Кад је u питању *porемећај текућих активности ћелија*, тада може настати поремећај u екситабилности ћелије, затим може доћи до промена u количини излученог neurotransmitera, поремећаја usled интеракције отрова i neurotransmitersких receptora, промена u intracelularном преносу сигнала, као i заустављању преноса сигнала usled dejstva nekog отрова (Coles, 1984).

U оквиру *porемећаја интегритета ћелија* могу настати поремећаји u очувању унутрашњег интегритета ћелије, поремећаји u синтези ATP-a, те поремећаји u концентрацији јона калцијума (Nicotera i sar., 1992). Такође, неке хемијске супстанције, познати отрови, могу да делују на ћелије i да доведу до *porемећаја функционалног односа истих са другим ћелијама*. Тако smanjena синтеза фактора коагулације u јетри, под uticajem кумарина, не изазива директне тоksiчне ефекте на јетру, али може да узрокује смрт организма због крварења (Albert, 1979).

KLINIČKE MANIFESTACIJE TOKSIČNOG DELOVANJA HEMIJSKIH SUPSTANCIJA

Како ће се клинички манифестовати тоksiчно деловање појединих тоksičnih

hemijskih supstancija, odnosno otrovnih materija, zavisi, u prvom redu, od toga do kakvih je poremećaja na nivou ćelije doveo određeni otrov.

Poremećaj genske ekspresije. Aktivnosti ćelija regulišu molekuli koji aktiviraju specifične ćelijske receptore, koji su povezani sa sistemom za prenošenje signala do regulatornih regiona na genima i/ili do funkcionalnih proteina. Ukoliko je kao posledica dejstva otrova na specifične receptore došlo do poremećaja ekspresije gena i drugih poremećaja u transdukciji i produkciji signala, tada može doći do poremećaja u deobi ćelija (*neoplazija* i *teratogeneza*), zatim apoptoze (*involutija tkiva*, *teratogeneza*), kao i poremećaja u sintezi proteina (Gregus, 2008).

Poremećaj tekućih aktivnosti ćelije. Mnoge funkcije u ćeliji zavise od koncentracije jona kalcijuma ili, preciznije rečeno, od ulaska jona kalcijuma u citoplazmu i stimulisanja sinteze intracelularnih sekundarnih glasnika, kao što su ciklični AMP i inozitol trifosfat. Tako, usled dejstva nekog otrova, može doći do poremećaja u koncentraciji jona kalcijuma, a usled toga do poremećaja neke fiziološke funkcije, na primer mišića (*tremor*, *konvulzije*, *spazam*, *aritmije* itd.) (Nicotera i sar., 1992).

Poremećaj unutrašnjeg integriteta ćelija. Brojne toksične hemijske supstancije mogu da utiču na održavanje integriteta ćelije. U viševićijskim organizmima, neophodno je da ćelije sačuvaju svoju funkciju i odnos sa drugim će-

lijama. Usled poremećaja unutrašnjeg integriteta ćelija, može doći do poremećaja u sintezi proteina, poremećaja u funkcionisanju ćelijske membrane, a usled toga i povrede, odnosno smrti ćelija (Buja i sar., 1993).

Poremećaj odnosa sa drugim ćelijama. U okviru ovog poremećaja, može doći do poremećaja u hemostazi, odnosno dolazi do krvarenja.

Od svih navedenih poremećaja ili, preciznije rečeno, kliničkih manifestnih znakova toksičnog delovanja supstancija, za kliničku praksu su najvažniji: *mutageneza*, *karcinogeneza*, *teratogeneza* (Lorgue, 1996; Klaunig i Kamendulis, 2008) i *imunotoksičnost* (Descote, 1999).

MUTAGENEZA

Mutageneza (*mutare* – promena) jeste proces formiranja promena u genetskom kodu ili šifri. Postoje tri vrste genetskih oštećenja. To su *genske mutacije*, koje se još nazivaju i mikrolezije, zatim promene u strukturi hromozoma (*hromozomske aberacije*) i broju hromozoma (*aneuploidija*), koje se još nazivaju i makrolezijama. Supstancije koje izazivaju mutacije, nazivaju se mutagenima, dok se one supstancije koje menjaju strukturu, odnosno broj hromozoma nazivaju klastogenima, odnosno aneugenima (Anđelković i Savković, 1990).

Genske mutacije. Genske mutacije (ili tačkaste mutacije) predstavljaju promene u redosledu baznih parova u DNK, koje mogu biti ograničene na jedan ili

mali broj baznih parova. Posle deobe ćelije, ove promene DNK sekvenci se prenose na „ćelije ćerke” tj. ulaze u proces nasleđivanja (Preston i Hoffman, 2008).

Kao što je poznato, DNK se formira od dve purinske (adenin i guanin) i dve pirimidinske baze (citozin i timin), pri čemu se guanin iz jednog lanca uvek vezuje za citozin iz drugog lanca DNK, odnosno adenin za timin. Ukoliko dođe do promene u redosledu vezivanja unutar jednog tipa baza, na primer, umesto guanina vezuje se adenin, ili umesto timina vezuje se citozin, takva mutacija se naziva *tranzicija*. Međutim, ako promena bude takva da, umesto pirimidinske, obuhvati purinsku bazu, takva mutacija se naziva *transverzija*. Genske mutacije mogu da nastanu spontano u molekularnim procesima, za vreme replikacije ili očuvanja DNK pod uticajem različitih gena ili pod dejstvom mutagena iz spoljašnje sredine, kada dolazi do poremećaja u sintezi i rasporedu aminokiselina ili do stvaranja nefunkcionalnog gena. Poseban tip mutacija su tzv. *vanfazne („frameshift”) mutacije*, kod kojih dolazi do dodavanja (insercije) ili gubljenja (delecije) jednog ili dva para baza u molekulu DNK (Preston i Hoffman, 2008).

Hromozomske aberacije. Pod hromozomskim aberacijama se podrazumevaju promene u strukturi hromozoma, koje se mogu posmatrati svetlosnom mikroskopijom. Te promene obuhvataju prekidanje hromozoma, do koga može doći na jednom ili obe hromatide i gru-

pisanjem prekinutih delova hromozoma. Aberacije u kojima učestvuje samo jedna od dve hromatide u replikovanom hromozomu nazivaju se *aberracije tipa hromatida*, a one koje obuhvataju obe hromatide, *aberracije tipa hromozoma*. Jonizujuće zračenje izaziva oba tipa aberacija, i to aberacije tipa hromozoma nastaju kada se ćelije izlože zračenju pre replikacije DNK, a aberacije tipa hromatida, kada se to dogodi posle replikacije DNK. Većina hemijskih jedinjenja (klastogena) indukuje samo hromatidne aberacije (Anđelković i Savković, 1990).

Aneuploidija. Kada ćelije imaju različit broj hromozoma u odnosu na normalan broj, karakterističan za određenu vrstu, takve ćelije se nazivaju *aneuploidne* i *poliploidne*. Aneuploidija označava gubitak ili dobijanje jednog ili više hromozoma, dok se poliploidija odnosi na kompletnu grupu hromozoma iz jedne ćelije. Aneuploidi kojima nedostaje jedan hromozom su monozomni, a oni koji imaju jedan hromozom u višku su trizomni. Ovakve promene u broju hromozoma su odgovorne i za nastajanje raznih naslednih bolesti, što je naročito izraženo u humanoј medicini.

Genetska oštećenja mogu nastati na polnim i somatskim ćelijama, a mogu ih izazvati brojni hemijski, fizički ili biološki agensi. Koje će od navedenih mutacija nastati zavisi od toga na kojim mestima, odnosno sa kojim funkcionalnim grupama DNK je došlo do vezivanja određene hemijske supstancije. Sve genotoksične supstancije se dele na jedi-

njenja prirodnog porekla (*alkaloidi, aflatoksin*), jedinjenja koja se koriste ili nastaju u industrijskim procesima (*alkilirajući agensi, organski rastvarači, organska jedinjenja metala, teški metali, zagađivači vode i vazduha, aldehidi, epoksidi, neorganska i organska jedinjenja arsena, berilijuma, hroma, kobalta, kadmijuma, nikla i olova*), farmaceutske proizvode (*antibiotici, citostatici, anestetici, kontraceptivna sredstva, supstancije koje ulaze u sastav kozmetičkih preparata*), pesticide (*piretrini – aletrin, organohlorna jedinjenja*) i genotoksične agense koji se nalaze u hrani i vodi (*mikotoksini, proizvodi metabolizma bakterija, nitrati, nitriti, saharin i ciklamati*) (Zimonjić, 1990).

KARCINOGENEZA

Karcinogeneza je proces stvaranja neoplazija, poznatih pod imenom kancer, rak ili tumor. Neoplazija u stvari predstavlja nasledno izmenjen i relativno autonoman rast tkiva sa dugim latentnim periodom između prve ekspozicije nekom hemijskom karcinogenu i konačne pojave neoplazije. Danas postoji veliki broj različitih hemijskih supstancija (preko 100.000), koje mogu (preko hrane, vode ili vazduha) ući u ljudski, odnosno životinjski organizam i izazvati stvaranje raznih neoplazija. Neoplazme mogu biti benigne i maligne, koje, za razliku od benignih, imaju metastatski rast i mogu se prenositi na udaljene organe (Anttila, 1993).

Većina hemijskih supstancija, pa tako i otrova, kada uđu u organizam, po-

dležu metaboličkim promenama. Upravo za vreme tih metaboličkih reakcija, neke supstancije postaju karcinogene, dok neki već poznati karcinogeni mogu postati neaktivni. Tako se uvođenjem hidroksilne grupe u neke policiklične ugljovodonike gubi njihov karcinogeni efekat. Isto tako, ukoliko se karcinogeni u organizmu vezuju za neke proteine, može doći do smanjenja njihovog karcinogenog efekta. Jedino ako se vežu sa takozvane kritične proteine, kao što su DNK i RNK, može doći do indukcije kancera. Među reakcijama prve faze biotransformacije za karcinogene supstancije značajne su reakcije aromatične i alifatične hidroksilacije, epoksidacija, N-dealkilacija i redukcija azo i nitro-grupe. U toku druge faze biotransformacije, najčešće se vrši detoksikacija karcinogena, iako ima primera da nastaju jedinjenja koja imaju izraženiji karcinogeni potencijal.

Tako etilen-dibromid i druga halogena alifatična jedinjenja reaguju sa glutatonom u prisustvu glutation S-transferaze, pri čemu se formira veoma reaktivan karcinogen S-episulfonijum etilglutination koji alkiluje DNK i izaziva neoplastične promene u bubrezima.

Takođe, u reakcijama biotransformacije mogu nastati i reaktivni molekuli, usled konverzije u elektrofile i slobodne radikale. Elektrofilni su molekuli koji sadrže atom kome nedostaje jedan elektron sa pozitivnim naelektrisanjem, što mu omogućava da, deleći zajednički elektronski par, reaguje sa nukleofilima, koji imaju atom sa jednim elektronom

вишка. Међу јединjenjima која се метаболічки трансформишу у карциногене електрофиле су полициклични угљоводонци и ароматични амини бензидин, нафтиламин и 4-аминобифенил.

Слободни радикали су веома реактивни молекули или делови молекула који имају један или више неспарених електрона у спољашњој орбитали. Слободни радикали се формирају приликом биотрансформације хемијских карциногена, као што су нитрозамини, нитро јединjenja, диетилstilbestrol, и нафтиламин. Стварање слободних радикала, а самим тим и стварање великог броја карциногена, спречавају антиоксиданси – витамини C и E (Guengerich, 2000). Сви данас познати карциногені могу се поделити на супстанције органског и неорганског порекла, карциногена влакна, hormone, као и на разна друга јединjenja познатог и непознатог састава (Vainio и сар., 1985).

Карциногені органског порекла. Још одавно је познато да одређене супстанције изоловане из сировог катрана поседују карциногена својства. То су полициклични ароматични угљоводонци, као што су деривати антрацена и бензо (a) пирена (или 3,4-бензо-пирен). Зapaжено је да ова и njима слична јединjenja (3-метилхолантрен, дибензокарбазол и бензоантрацен), када се у току дућег времена наносе на кожу животиња испољавају карциногена дејства. Поред јединjenja катрана, утврђено је да карциногена својства поседују и азо-јединjenja, која после уношења храном у организам, могу испољити карциногенo дејство на јетру. Код људи је зapaжено да карциногенo

деловање на мокраћну бешику имају ароматични амини, док 2-ацетаминoфлуорен код животиња делује карциногенo на млечну жлезду, ушни канал и јетру. Поред тога, код људи карциногенo делује бензидин, етил карбамат, азотни и сumpорни ipерит и други алкилирајући агенси, а изразит карциногені потенцијал код људи и животиња поседују деривати нитрозаминa (диметилнитрозамин, нитрозамин) (Lijinsky, 1977). Утврђено је да чак и неки састојци хране у присуству већих концентрација нитрита (пре свега у анаеробној средини) могу да формирају мале количине нитрозаминa и сличних јединjenja. Један од најснажњих карциногена и за људе и животиње је афлатоксин B₁, производ гљивице *Aspergillus flavus* (Ćupić, 1999). Значајно је споменути и то да се у нормалним метаболічким реакцијама у организму могу формирати карциногені. Један од примера је етионин, који представља производ физиолошког метаболизма аминoкиселине метионина. Иначе, етионин је снажан hepatокарциноген код pacова (Williams and Wisburger, 1986).

Карциногені неорганског порекла. Запaжено је да и неки метали могу да буду карциногені за људе и животиње. Код људи који раде у индустрији и топоницима, за сада су карциногенo дејство испољили арсен (карцином које и плућа и leukemija), кадмијум (карцином prostate и плућа), хром и никал (карцином плућа и digestивног тракта). Код експерименталних животиња су карциногенo деловање показали берилијум, кобалт,

гвожђе, олово, титан и цинк (Klaunig и Kamendulis, 2008).

Карциногенни ефекти влакана. Познато је да азбестна влакна код људи и животиња могу узроковати појаву канцера. Сличне ефекте испољавају и неке пластичне материје, које се користе за израду медицинских средстава (Jokanović, 2001).

Хормонски карциногени. Хормони су најчешће аминске, стероидне и полипептидне грађе и имају значајну улогу у одржавању унутрашњег интегритета организма. Неки облици канцера могу настати после поремећене продукције хормона или промена у регулацији функције периферних ендокриних жлезда под утицајем предњег режња хипофизе. Код људи је до сада описан значајан број неоплазми штитне жлезде, које настају инхибицијом синтезе или секретије хормона штитне жлезде или услед поремећаја механизма контроле секретије ових хормона под утицајем хипофизе и хипоталамуса. Код пачова је на сличан начин карцином штитне жлезде изазвао и фенобарбитон, који је познати индуктор ензима јетре, који метаболишу тироидни хормон T_3 . Услед тога, овог хормона је било мање у циркулацији, па је због тога долазило до поремећаја у контролним механизмима. Поређ тога, код људи је запажено да карциногенни потенцијал имају неки природни хормони (хумани хормон раста, естрогени) и синтетски хормони (диетилstilbestrol, етинил естрадиол и тамоксифен), док мушки полни хормони имају мањи карциногенни потенцијал (Henderson, 1982).

Карциногенни ефекти смеша познатог или непознатог састава. Често се дешава да људи или животиње буду изложени дејству више карциногенних супстанција, што је нарочито случај приликом пушења дувана, удишања издувних гасова аутомобила, удишања производа спаљивања или неких отрова који се налазе у ваздуху. Такође, врло важна хемијска смеша коју људи и животиње свакодневно носе у организму и која може да исполји карциногенно деловање јесте храна. Ово дејство је нарочито карактеристично за веома калоричну храну, етанол, ниско контаминаната хране (афлататоксин B_1), и неке адитиве (нитрити, боје, разни конзервansi). Уколико у храни постоји дефицит антиоксидантних материја (каротени, селен, витамини А, С и Е), учесталије ће се јављати и неоплазије (Miller и сар., 1994).

TERATOGENEZA

Тератогенеza се бави проучавањем настајања малформација на плоду за време gravidитета. Штетни ефекти отровних материја, до којих може доћи услед излагања организма мајке за време ембрионалног и феталног развоја, најчешће су изражени као структурне деформације, успорен раст појединих органа или целог организма, ментална ретардираност и смрт. Све ове промене у највећем броју случајева су иреверзбилне. Агенси који изазивају успорен раст целог ембриона или појединих органа називају се *ембриотоксичним*, они који изазивају угинјавање као *ембриоletalни*, а они који изазивају деформације односно структурне и функционалне поремећаје код живих младунца називају се

teratogenima (Clegg и сар., 1986; Bartik и Piskac, 1981).

Токсиčni ефекти који могу да настану после излагања ембриона/ фетуса одређеним супстанцијам са тоksiчним деловањем зависе од степена њиховог развоја, односно старости и од хемијске структуре супстанција (отрова). После експозиције ембриона непосредно након оплођења, а пре имплантације у ендометријум материце (6–7. дан трудноће код људи или 5–6. дан код пасова), тоksiчне ефекте (углавном угинјавање) изазивају DDT, никотин и неке супстанције које утичу на синтезу ДНК. Период органогенезе односно формирања органа и ткива, који код људи траје између 21. и 56. дана трудноће, а код пасова од 6. до 15. дана, карактерише се брзом деобом ћелија, њиховим миграцијам, интеракцијам и морфолошким обликовањем. После органогенезе настаје фетални период, који одликују диференцијација ткива, раст и физиолошко sazревање. У тој фази формирање органа није завршено, али они већ тада постоје и могу се препознати. Период феталног развоја је посебно осетљив на дејство отрова, па могу настати функционалне промене у нервном систему и репродуктивним органима. Ови ефекти се могу видети пре рођења. Функционалне промене које се испољавују после порођаја могу да представљају осетљиве индикаторе који указују на тоksiчне ефекте настале у ранијим фазама gravidитета и развоја организма (Dixon и Hall, 1982).

У групу јединjenja која испољавују тоksiчне ефекте на развој фетуса спадају

супстанције као што су етанол (Blot, 1992), који изазива фетални алкохолни синдром, кокаин, који изазива перфорацију плаценте, прерани порођај, микроцефалију и деформације уrogenиталног тракта, органохлорни инсектициди и хлордекон, неки herbicidi, fungicidi, полихлоровани бifenili и микотоксини (Faster и Gray, 2008). Међу лековима који могу да утичу на развој фетуса су диетилstilbestrol, nesteroидни estrogen који се примењује у хуманој и ветеринарској медицини, и за који је поуздано утврђено да изазива vaginalни adenokarcinom и друге врсте тумора код деце чије су мајке узимале овај лек током трудноће, затим retinoidи и витамин А, ukoliko се узима у већој дози током gravidитета, talidomid и valproinska kiselina, која се користи као antikonvulziv, односно antiepileptik, и која може да изазове деформације прстију и kardiоваскуларног система код фетуса (Jokanović, 2001; Ćupić и сар., 2007). Такође, познато је да се у току gravidитета код животиња не смеју применјивати tetraciklinи, albendazol и бројни други лекови (Campbell и Hodgson, 1993; Ćupić и сар., 2007).

ИМУНОТОКСИЧНОСТ

Бројне хемијске супстанције, а међу њима и лекови, могу деловати штетно на органе и имунокомпетентне ћелије (Т и В лимфоците) имунолошког система. Пошто такве супстанције, приликом тоksiчног деловања, доводе до имunosупресије, називају се и имunosупресивима, па се због тога нека од ових јединjenja (лекови) могу користити и у терапијске сврхе. То су лекови који се користе за супри-

miranje сва четири типа (I, II, III i IV) реакција преосетљивости, укључујући i специфичне аутоимуне болести. Они се могу користити, такође, i против канцера, а испољавaju одређену корист i у спречавању одбацивања трансплантата. Познато је да имunosупресивно дејство поседују глукокортикостероиди, циклоспорин, азатиоприн, антинеопластичне супстанције (цитостатици), истамин, антилимфocитни глобулин и L-аспариганза (Ћупић, 1988; Ћупић и сар., 2007). Наравно, поред ових, постоји велики број отровних материја које, између осталих органа i органских система, оштећују i имунолошки систем i које се због своје велике тоksičnosti не могу користити i у терапијске сврхе, ради постизања имunosупресије.

Глукокортикостероиди. Глукокортикостероиди делују лимфocитички. Они смањују величину лимфних чворова i слезине, као i садржај лимфocита у њима, а да при томе немају тоksiчно деловање на пролиферацију мијелoидних i еритроидних матичних ћелија костне сржи. Глукокортикостероиди делују на ћелијски циклус активираних лимфocитних ћелија. Врло је важно споменути да се ендогени глукокортикостероиди ослобађају за време стреса i доводе до јакoг инхибитoрног ефекта на имуни систем код животиња (Brander и сар., 1994; Adams, 2001; Ћупић и сар., 2007).

Циклоспорин. Циклоспорин (или циклоспорин А) јесте циклични пептид (антибиотик) изолован из гљива *Cylindrocarpum lucidum* i *Trichoderma polysporum*. Овај лек високоспецифично i селективно инхибише активацију Т-лимфocита, без дејства на

експресију супресорских Т-лимфocита. Овај свој ефект циклоспорин постиже на тај начин што инхибира одговор Т-лимфocита на интерлеукин-1, тако да ови не могу продуковати, односно стварати i отпуштати интерлеукин-2. Циклоспорин не делује на функцију В-ћелија. Лек није цитотоксичан у уобичајеним концентрацијама i мора се апликовати пре пролиферације Т-ћелија, односно пре излагања специфичном антигену. Циклоспорин је показао импресивну ефикасност у превенiranju одбацивања калема, после извршене трансплантације органа код људи. Нажалост, ова имunosупресија изазива нефротоксичност i може проузроковати благо повишење нивоа креатинина у крви, па чак i озбиљну олигурију (White, 1986). Поред класичног објашњења да *циклоспорин А* имуномодулаторни ефект остварује пре свега инхибицијом синтезе интерлеукина-2, резултати новижих експеримената указују на то да овај ефект настаје i услед инхибитoрног деловања овог антибиотика на мононуклеарне фагоците. Клиничка примена циклоспорина у ветеринарској медицини је углавном ограничена на аутоимуне болести.

Азатиоприн. Азатиоприн је имидазолски дериват пуринског антагонисте 6-меркаптопурина (6-MP). У организму се конвертује скоро у потпуности у 6-MP, али је око 10 пута активнији као имunosупресор, што указује на његову интерференцију са одговором лимфocита на антиген. По механизму деловања, азатиоприн припада групи структурних аналога или антиметаболита. Иако највероватније делује посредством меркаптопури-

на, азатиоприн се ипак дaleко више употребљава као имunosупресив него сам меркаптопурин. Азатиоприн је мање ефикасан као имunosупресивни лек од циклофосфамида, а поред тога има и неколико нежељених ефеката. Главна тоksičnost азатиоприна је повезана са депресијом костне сржи, која се обично манифестује као леукопенија, тромбоцитопенија, а могу настати и крварења. Вишке дозе изазивају и гастроинтестиналне поремећаје. Перорална доза азатиоприна за pse износи 2,2 mg/kg/дневно (Rosenthal, 1985).

Antineoplastične supstancije. Неколико антиметаболита синтезе нуклеинских киселина, као и многи цитотоксични алкилирајући агенси могу се користити као хемијски имunosупресивни лекови. Цитотоксични лекови су вероватно активни у следећим фазама имуног одговора. Фаза I – препознавање и/или обрада антигена (макрофази, активирани B и T-ћелије): циклофосфамид и цитимун (безбедан аналог циклофосфамида). Фаза II – амплификација (лимфоцити у blastogeneзи, макрофази, B-ћелије и T-ћелије): циклофосфамид, цитимун, 5-fluorouracil, 6-меркаптопурин, citarabin. Фаза III – продукција антитела: циклофосфамид и цитимун. Фаза IV – имуни ефект или одговор (плазма ћелије, мали лимфоцити, B-ћелије и T-ћелије): циклофосфамид, цитимун, метотрексат, citarabin, хлорамбучил и мelfalan. Клиничке индикације за примену антинеопластичних агенаса као имunosупресора су следеће:

Циклофосфамид и цитимун се могу користити у леchenju multiplog мијелома,

макроглобулинемije, аутоимуне хемолитичке анемије и реуматоидног артритиса. Хлорамбучил и мelfalan су ефикасни код multiplog мијелома и макроглобулинемije (Brander и сар., 1994; Ćupić и сар., 2007).

Histamin. Мada је од ограниченог клиничког значаја, треба свакако споменути да histamin има инхибиторни ефект на активност мастоцитних ћелија и базофила. Такође, histamin депримира ослобађање лизозомалних ензима из неутрофила и секрецију имуноглобулина и лимфокина из лимфоцита. На тај начин histamin може деловати као умерени модулатор имунолошки посредованих инфламаторних реакција углавном преко H_2 -рецептора (Varagić и Milošević, 2012).

Antilimfocitni globulin (ALG). Антилимфоцитни serum се добија инкулацијом разних врста животиња са пурификованом суспензијом лимфоцита који потичу од друге врсте животиња. Касније се добије ни serum pročисти, да буде активан само против лимфоцита. Антилимфоцитни глобулин супримира ћелијски имуни одговор, док на хуморални нема ефекта. У ствари, антитела из овог антисерума делују пре свега на мале периферне лимфоците који циркулишу између крви и лимфе. Антитела се везују за површину ових малих T-лимфоцита, који иначе служе за препознавање антигена. Његова примена је ограничена, јер индукује имуни одговор против самог себе, а поред тога може изазвати и реакције преосетљивости (Varagić и Milošević, 2012).

L-Asparaginaza. Ova antineoplastična supstancija se sada dobija iz *Escherichia coli*, korišćenjem DNK rekombinantne tehnologije. Ona suprimira fazu amplifikacije imunog odgovora (limfocitnu blastogenezu, makrofage, kao i B i T-limfocite) (Medleau, 1983).

Pored svih navedenih jedinjenja, poznato je da određeni antibiotici, kao što su tetraciklini, aminoglikozidi, hloramfenikol, te određena antimikotična sredstva (amfotericin B, ketokonazol i niridazol) imaju takođe imunosupresivno delovanje (Ćupić, 1988; Ćupić i sar., 2007).

LITERATURA

- Adams R. H. (2001): *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 8th edition, Iowa State University Press/Ames, Iowa, Eight Edition.
- Andrews A. H. and Humphrey, D. J. (1982): *Poisoning in Veterinary Practice*, National Office of Animal Health. Enfield, Middlesex, England.
- Albert A. (1979): *Selective toxicity*. London, Chapman & Hall.
- Anđelković M., Savković N. (1990): *Principi detekcije i evaluacije efekta genotoksičnih agenasa*. U knjizi: Zimonjić D., Savković N. i Anđelković. Genotoksični agensi –efekti, principi i metodologija detekcije, Beograd: Naučna knjiga 158–171.
- Anttila A., Salmen M., Hemminki K. (1993): *Carcinogenic chemicals in the occupational environment*. Pharmacol. Toxicol, 72: 69–76.
- Bandal K. S., Marco J. G., Leng L. M. (1981): *The pesticide chemist and modern toxicology*. Washington DC: ACS symposium series: 160.
- Bartik M. and Piskac A. (1981): *Veterinary Toxicology*. Elsevier. Amsterdam.
- Blot W. J. (1992): *Alcohol and cancer*. Cancer Res 52: 2119–2123.
- Brander G. C., Pugh D. M., Bywater R. J., Jenkins W. L. (1994): *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*. Bailliere Tindall. London, Philadelphia, Toronto.
- Bruere A. N., Cooper B. S. and Dillon A. E. (1990): *Veterinary Clinical Toxicology*. Veterinary Continuing Education. Palmerston North. New Zealand.
- Buja L. M., Eigenbrodt M. L., Eigenbrodt E. H. (1993): *Apoptosis and necrosis: Basic types and mechanisms of cell death*. Arch Pathol Lab Med 117: 1208–1214.
- Campbell A. and Hodgson L. (1994): *The Veterinary Poisons Information Service an outline of the service and review of enquires in 1993*. In: Proceedings of the 6th International Congress, p. 112. Blackwell Scientific. Oxford.
- Clegg E. D., Sakai C. S., Voytek P. (1986): *Assessment of reproductive risks*. Biol Reprod 34: 5–16.
- Coles B (1984): *Effects of modifying structure on electrophilic reactions with*

- biological nucleophiles*. Drug Metab Rev 15: 1307–1334.
15. Ćupić V. (1998): *Imunomodulacija pod dejstvom lekova*. Veterinarski glasnik 52: 57–69.
16. Ćupić V. (1999): *Najčešća trovanja u veterinarskoj medicini*, Beograd: Stručna knjiga.
17. Ćupić V., Muminović M., Kobal S., Velez R. (2007): *Farmakologija za studente Veterinarske medicine*. Beograd, Sarajevo, Ljubljana, Skoplje: Heleta.
18. Descote J. (1999): *An introduction to Immunotoxicology*. Taylor Francis. Lyon.
19. Faster M. D., Gray L. E. J. R. (2008): *Toxic responses of the reproductive system*. In: Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons. Seventh edit. New York: McGraw-Hill 762–807.
20. Dixon R. L., Hall J. L. (1982): *Reproductive toxicology*. In: Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press 107–140.
21. Gregus Z. (2008): *Mechanisms of toxicity*. In: Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons. Seventh edit. New York: McGraw-Hill, 2008: 45–107.
22. Guengerich F. P. (2000): *Metabolism of chemical carcinogenesis*. Carcinogenesis 21: 345–351.
23. Henderson B. E., Ross R. K., Pike M. C., Casagrande J. T. (1982): *Endogenous hormones as a major factor in human cancer*. Cancer Res 42: 3232–3239.
24. Jokanović M. (2001): *Toksikologija*. Beograd: Elit Medica.
25. Klaunig J. E., Kamendulis L. M. (2008): *Chemical carcinogens*. In: Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons. Seventh edit. New York: McGraw-Hill, 329–381.
26. Lijinsky W. (1977): *Nitrosamines and nitrosamides in the etiology of gastrointestinal cancer*. Cancer 40: 2446–2449.
27. Lorgue G., Lechenet J., Riviere A. (1996): *Clinical Veterinary Toxicology*. Oxford, London: Blackwell Science.
28. Medleau L., Dawe D. L., Calvert C. A. (1983): *American Journal of Veterinary Research* 44: 176–180.
29. Miller A. B., Berrino F., Hill M. (1994): *Diet in the aetiology of cancer: A review*. Eur J Cancer 30A: 207–220.
30. Nelson S. L., Pearson P. G. (1990): *Covalent and noncovalent interactions in acute lethal cell injury caused by chemicals*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 30: 169–195.
31. Nicotera P., Bellomo G., Orrenius S. (1992): *Calcium mediated mechanisms in chemically induced cell death*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 32: 449–470.
32. Plumlee H. K. (2004): *Clinical Veterinary Toxicology*. St. Louis: Copyright. Mosby Inc.

33. Preston J. R., Hoffman G. R. (2008): *Genetic toxicology*. In: Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons. Seventh edit. New York: McGraw-Hill, 381–415.
34. Rosenthal R. C. (1985): *Handbook of Small Animal Therapeutics*. New York: Churhill Livingstone, 175–188.
35. Lehman-McKeeman L. D. (2008): *Absorption, distribution, and excretion of toxicants*. In: Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons. Seventh edit. New York: McGraw-Hill, 131–161.
36. Varagić V. M., Milošević M. (2012): *Farmakologija*. Beograd: Elit Medica.
37. Vojvodić V. (1997): *Toxicology: Issues, Problems and Challenges*. Arch Toxicol Kinet Xenobiot Metab 5(3): 305–370.
38. Vainio H., Hemminki V., Wilbourn J. (1985): *Data on the carcinogenicity of chemicals in the IARC Monoographs programme*. Carcinogenesis 6: 1653–1665.
39. White J. V. (1986): JAVMA; 189: 566–569.
40. Zimonjić D. (1990): *Hemijski genotoksični agensi i njihovo dejstvo*. U knjizi: Zimonjić D., Savković N., Anđelković M. *Genotoksični agensi: efekti, principi i metodologija detekcije*. Beograd: Naučna knjiga, 88–122.



DOI: 10.7251/VJRS1302131J

UDK 619:615.076.9

Milanka Jezdimirović,¹ Nevenka Aleksić,¹ Mirjana Milovanović,¹ Dragica Stojanović,² Nemanja Jezdimirović³

UTICAJ PRODUŽENE PERORALNE PRIMENE EUGENOLA NA HEMATOLOŠKE I NEKE BIOHEMIJSKE PARAMETRE KRVИ KOD PACOVA

Kratak sadržaj

Ispitivano je moguće hematotoksično, hepatotoksično i nefrotoksično dejstvo eugenola kod pacova posle dvonedeljne i četvoronedeljne kontinuirane p.o. primene. Ogled je izveden na 72 mužjaka pacova soja Wistar podeljenih u šest grupa. Četiri grupe tretirane su različitim dozama eugenola (10 mg/kg tm/dan, 50 mg/kg tm/dan, 200 mg/kg tm/dan i 400 mg/kg tm/dan). Peta, kontrolna grupa dobijala je vehikulum (0,5% metil-celuloza, 20% propilen-glikol i voda), a šesta je bila apsolutna, netretirana kontrola. Eugenol i vehikulum aplikovani su gastričnom sondom, svakodnevno tokom četiri nedelje u količini od 1 ml/100 g telesne mase pacova. Krv je uzorkovana kardijalnom punkcijom anestetisanih pacova 14. i 28. dana ogleda u cilju određivanja hematoloških i biohemijskih parametara krvi: hematokrit, broj eritrocita, leukocita i trombocita, leukocitna formula, koncentracija hemoglobina, MCV, MCH, koncentracija proteina, albumina, uree, kreatinina, kao i aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP) i kreatin-kinaze (CK).

Rezultati su pokazali da eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje u dozama od 10, 50, 200 i 400 mg/kg tm/dan ne ispoljava hematotoksično, hepatotoksično niti nefrotoksično dejstvo. Eugenol davan tokom četiri nedelje ne utiče značajno na broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, zapreminu eritrocita, broj leukocita i leukocitnu formulu. Primenjivan tokom dve nedelje, prouzrokuje značajno povećanje mase hemoglobina po eritrocitu. Ovaj efekat je nespecifičan i ne zavisi niti doze, niti od dužine tretmana. Doze eugenola od 10 i 200 mg/kg/dan primenjivane tokom četiri nedelje prouzrokuju značajno smanjenje broja trombocita, dok najviša ispitivana doza (400 mg/kg/dan) prouzrokuje značajno povećanje, u poređenju sa brojem trombocita kod pacova tretiranih dozom od 10 i 200 mg/kg/dan. Promene broja trombocita izazvane eugenolom kvalitativno su različite i ne zavise od doze, niti od dužine tretmana. Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno

¹ Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.

² Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu.

³ Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd.

na proteinemiju, albuminemiju, koncentraciju uree i kreatinina, kao i aktivnost ALP u serumu pacova.

Tri ispitivane doze eugenola (10, 50 i 200 mg/kg/dan) značajno smanjuju, dok najviša doza povećava aktivnost ALT. Eugenol aplikovan tokom četiri nedelje u dozi od 200 i 400 mg/kg prouzrokuje statistički značajno smanjenje aktivnosti CK.

Кljučне речи: eugenol, hematotoksičnost, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost, pacov.

Milanka Jezdimirović,¹ Nevenka Aleksić,¹ Mirjana Milovanović,¹ Dragica Stojanović,² Nemanja Jezdimirović³

EFFECT OF EXTENDED ORAL ADMINISTRATION OF EUGENOL ON HEMATOLOGICAL AND SOME BIOCHEMICAL BLOOD PARAMETERS IN RATS

Abstract

The possible haematotoxic, hepatotoxic and nephrotoxic effects of eugenol in rats after two-week and the four-week continuous use were tested. The experiment was conducted on 72 male Wistar rats divided into six equal groups. Four were treated with different doses of eugenol (10 mg/kg bw/day, 50 mg/kg/d, 200 mg/kg bw/d and 400 mg/kg bw/d), the control group received the vehikulum (0.5% methyl cellulose, 20% propylene glycol and water), and the sixth group was the absolute, untreated control. Eugenol and the vehikulum were administered with a gastric probe, on a daily basis, for four weeks at a rate of 1 ml/100 g body weight of rats. Blood was collected by cardiac puncture of the anesthetised rats on days 14 and 28 in order to assess the haematological and biochemical blood parameters: haematocrit, red blood cell count, white blood cell and platelet counts, leukocyte formula, hemoglobin, MCV, MCH, total protein concentration, albumin, urea, creatinine, and the activity of the alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and creatine kinase (CK).

The results showed that, having been applied for two and four weeks at doses of 10, 50, 200 and 400 mg/kg bw/day, eugenol did not show any haematotoxic, hepatotoxic or nephrotoxic effects. Eugenol administered for four weeks does not significantly affect the number of erythrocytes, haemoglobin concentration, haematocrit, red blood

cell volume, leukocyte count and leukocyte formula. Applied for two weeks it caused a significant increase in the mass of haemoglobin in erythrocytes. This effect is not specific and does not depend on the dose or the treatment duration. Eugenol in doses of 10 and 200 mg/kg/day applied for four weeks caused a significant reduction in the number of platelets, whilst the highest dose tested (400 mg/kg/day) caused a significant increase in comparison to the number of platelets in rats treated with 10 and 200 mg/kg/day. Changes in the number of platelets induced by eugenol qualitatively different and are not related to dose or length of treatment.

Eugenol applied for two and four weeks does not significantly affect proteinaemia, albuminaemia, serum urea and creatinine concentrations, and serum ALP activity in rats. Three assessed doses of eugenol (10, 50 and 200 mg/kg/d) significantly decreased, whereas the highest dose increased the ALT activity. However, eugenol applied for four weeks at a dose of 200 and 400 mg/kg/d caused a statistically significant decrease in CK activity.

Key words: eugenol, haematotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity, rat.

UVOD

Iako se začinske i lekovite biljke (žalfija, karanfilić, majčina dušica, ruzmarin, cimet, origano, slačica, đumbir, pelen i dr.), njihovi ekstrakti i aktivne komponente već decenijama koriste u medicinske i nutritivne svrhe, kao zooaditivi ili pesticidi, još uvek su nedovoljna saznanja o njihovim mogućim neželjenim i toksičnim dejstvima na pojedine sisteme organa kod životinja i ljudi.

Esencijalno ulje karanfilića, origana, mirođije, bosiljka, ruzmarina, cimeta, lovora dr. sadrži tri (eugenol, 4-alilfenol, eugenil-acetat), od ukupno sedam poznatih bioaktivnih hidroksi-alil-benzenskih jedinjenja (Nijsseni sar., 2004; EPSA, 2006). Esencijalno ulje karanfilića (*Caryophylli aetheroleum*) sadrži čak od 80% do

90% eugenola, koji ima brojna farmakološka dejstva (EMEA, 1998).

Nedovoljna su saznanja o toksikološkom profilu eugenola i njegovom afinitetu prema organima posle dugotrajne p.o. primene kod laboratorijskih životinja. Procena stepena njegove toksičnosti i sistemske podnošljivosti posle primene rastućih doza u pretkliničkom ispitivanju ima za cilj da definiše najmanju dozu koja je bezbedna za primenu i ne prouzrokuje neželjene efekte (No Observed Adverse Effect Level – NOAEL), kao i najmanju dozu koja prouzrokuje značajane neželjene (Lowest Observed Adverse Effect Level – LOAEL) ili toksične efekte (Spoo, 2004). Rezultati ovakvih ispitivanja predstavljaju polaznu osnovu za procenu rizika primene eugenola kod ciljnih vrsta životinja.

MATERIJAL I METODE RADA

Ispitivanje uticaja eugenola na hematološke i neke biohemijske parametre krvi izvedeno je na 72 pacova soja Wistar, starosti oko tri meseca i prosečne telesne mase od 227 g. Životinje su podeljene u šest jednakih grupa. Četiri grupe pacova dobijale su gastričnom sondom eugenol u dozi od 10, 50, 200 i 400 mg/kg svakodnevno tokom četiri nedelje, peta je tretirana vehikulom (0,5% metil-celuloza, 20% propilen-glikol i voda), a šesta je bila apsolutna kontrola (netretirana). Volumen rastvora odgovarajuće koncentracije eugenola i vehikuluma aplikovani su u količini od 1 ml/ 100 g telesne mase pacova tokom četiri nedelje.

Od svih pacova, prethodno anestetisanih etrom, uzimano je po 2 ml krvi punkcijom srca 14. i 28. dana ogleda. Uzorci krvi za hematološka ispitivanja sakupljani su u epruvete sa dodatkom EDTA. Parametri krvi (eritrociti, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, leukociti, leukocitna formula i trombociti) određivani su aparatom Arcus (automatski digitalni analaj-

zer 18 hematoloških parametara proizvođača Diatron, Austrija). Biohemijski parametri krvi (ALT, ALP, CK, proteini, albumini, urea i kreatin) određivani su u serumu, spektrofotometrijskom metodom (poluautomatski analajzer Basic proizvođača Secomam, Francuska).

Statistička obrada podataka urađena je primenom Excell 2007 (MS Office 2007).

REZULTATI I DISKUSIJA

Uticaj eugenola na broj eritrocita

Broj eritrocita kod kontrolnih grupa pacova (AK, K) i grupa tretiranih eugenolom ustanovljen dve i četiri nedelje od početka eksperimenta nije se značajno razlikovao (tabele 1. i 2). Sve testirane doze eugenola prouzrokovalе su neznatno povećanje broja eritrocita, kako posle dvonedeljne, tako i posle četvonedeljne primene. Posle četiri nedelje tretmana, najniža doza eugenola prouzrokovalа je najveće povećanje broja eritrocita, a nešto manje najviša doza. Povećanje broj eritrocita nije zavisilo od veličine doze, niti od dužine tretmana.

Tabela 1. Vrednosti hematoloških parametara kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 14 dana

Tretman	Apsolutna kontrola	Kontrola	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Broj eritrocita ($\times 10^{12}/l$)	4,05 $\pm$ 0,23	4,29 $\pm$ 0,16	4,41 $\pm$ 0,28	4,23 $\pm$ 0,44	3,90 $\pm$ 0,48	4,31 $\pm$ 0,31
Koncentracija hemoglobina (g/l)	74,00 $\pm$ 5,00	74,33 $\pm$ 6,01	81,33 $\pm$ 5,48	75,20 $\pm$ 8,51	74,60 $\pm$ 8,95	81,25 $\pm$ 6,49
MCH (pg)	18,35 $\pm$ 0,25	17,30 $\pm$ 0,78	18,50 $\pm$ 0,29	17,74 $\pm$ 0,40	19,24 $\pm$ 0,28*	18,82 $\pm$ 0,22
MCV (fl/l)	61,65 $\pm$ 0,45	58,63 $\pm$ 1,74	58,85 $\pm$ 0,93	57,82 $\pm$ 1,04	59,48 $\pm$ 0,45	58,78 $\pm$ 0,85
Broj trombocita ($\times 10^9/l$)	325,00 $\pm$ 5,00	583,67 $\pm$ 77,57	354,25 $\pm$ 31,28	419,60 $\pm$ 68,97	357,60 $\pm$ 47,76	468,67 $\pm$ 72,36
Broj leukocita ($\times 10^9/l$)	8,00 $\pm$ 1,90	7,97 $\pm$ 1,65	6,25 $\pm$ 0,60	6,44 $\pm$ 0,77	7,32 $\pm$ 0,52	5,80 $\pm$ 0,00
Limfociti ($\times 10^9/l$)	6,90 $\pm$ 2,40	6,57 $\pm$ 1,20	5,50 $\pm$ 0,50	6,28 $\pm$ 0,59	5,90 $\pm$ 0,36	6,13 $\pm$ 0,88

Monociti ($\times 10^9/l$)	0,85 $\pm$ 0,35	1,07 $\pm$ 0,34	0,60 $\pm$ 0,09	0,50 $\pm$ 0,50	0,50 $\pm$ 0,17	1,13 $\pm$ 0,19
Granulociti ($\times 10^9/l$)	0,200 $\pm$ 0,10	0,200 $\pm$ 0,10	0,225 $\pm$ 0,06	0,120 $\pm$ 0,05	0,350 $\pm$ 0,03	0,383 $\pm$ 0,08

* $P < 0,05$ značajnost razlika u poređenju sa kontrolnim grupama i grupom tretiranom eugenolom u dozi od 50 mg/kg/dan

Tabela 2. Vrednosti hematoloških parametara kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 28 dana

Tretman	Apsolutna kontrola	Kontrola	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Broj eritrocita ($\times 10^{12}/l$)	3,90 $\pm$ 0,16	3,90 $\pm$ 0,20	4,61 $\pm$ 0,20	4,25 $\pm$ 0,17	4,35 $\pm$ 0,28	4,58 $\pm$ 0,17
Koncentracija hemoglobina (g/l)	73,00 $\pm$ 2,48	74,25 $\pm$ 2,25	86,25 $\pm$ 6,36	74,80 $\pm$ 6,93	74,67 $\pm$ 6,98	83,90 $\pm$ 3,41
MCH (pg)	19,10 $\pm$ 0,58	18,78 $\pm$ 0,50	18,53 $\pm$ 0,60	18,76 $\pm$ 0,32	19,98 $\pm$ 0,59	19,17 $\pm$ 0,37
MCV (fl/l)	63,05 $\pm$ 1,38	63,45 $\pm$ 2,00	61,70 $\pm$ 2,03	60,54 $\pm$ 1,04	60,93 $\pm$ 1,57	59,07 $\pm$ 0,50
Broj trombocita ($\times 10^9/l$)	555,75 $\pm$ 15,2	515,26 $\pm$ 47,6	394,75 $\pm$ 36,49**	485,60 $\pm$ 30,11	403,00 $\pm$ 21,0**	528,60 $\pm$ 18,79** ^a
Broj leukocita ($\times 10^9/l$)	8,15 $\pm$ 0,39	7,15 $\pm$ 0,77	6,95 $\pm$ 0,39	7,86 $\pm$ 0,46	7,98 $\pm$ 0,34	8,36 $\pm$ 0,45
Limfociti ($\times 10^9/l$)	7,30 $\pm$ 0,76	6,20 $\pm$ 0,86	6,10 $\pm$ 0,25	6,24 $\pm$ 0,48	6,38 $\pm$ 0,26	6,63 $\pm$ 0,44
Granulociti ($\times 10^9/l$)	0,400 $\pm$ 0,11	0,350 $\pm$ 0,09	0,275 $\pm$ 0,08	0,320 $\pm$ 0,03	0,550 $\pm$ 0,07	0,390 $\pm$ 0,08

** $P < 0,01$ značajnost u odnosu na AK grupu, ^A $P < 0,01$ u poređenju sa grupom tretiranom eugenolom u dozi od 10 i 200 mg/kg/dan

Dobijeni rezultat ispitivanja uticaja eugenola na broj eritrocita u našem ogledu u saglasnosti je sa podacima koji pokazuju da eugenol primenjivan u hrani u koncentraciji od 0,1% do 1,0% tokom četiri meseca kod pacova ne menja broj eritrocita i druge hematološke parametre, i nema hemolitičku aktivnost (Hagan i sar., 1967). Noviji rezultati dobijeni ispitivanjem uticaja vodenog ekstrakta karanfilića (eugenol u dozi od 300 i 700 mg/kg) na broj eritrocita kod pacova pokazuju da tromesečna prime-

na u dozi od 300 mg/kg/dan ne utiče na vrednost ovog parametra, dok doza od 700 mg/kg izaziva značajno prolazno povećanje broja eritrocita koje nestaje već druge nedelje po prekidu tretmana (Agbaje i sar., 2009).

Uticaj eugenola na koncentraciju hemoglobina u krvi

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje neznatno povećava koncentraciju hemoglobina. Najizraženiji porast zabeležen 14. i 28. dana ogleda bio

je u grupi pacova tretiranoj najnižom dozom eugenola, a nešto manji u grupi tretiranoj najvišom dozom. Povećanje nije zavisilo od veličine doze eugenola, niti od dužine tretmana (tabele 1. i 2).

Naši rezultati ispitivanja uticaja eugenola na koncentraciju hemoglobina kod pacova posle četvonedeljnog tretmana slični su sa nalazima dobijenim posle primene u hrani u dozi >1000 mg/kg/dan tokom 133 dana (Hagan i sar., 1967), i dozama od 1400 do 4000 mg/kg hrane tokom mesec dana (Hagan i sar., 1965, 1967). Ovi rezultati ukazuju na to da eugenol ne menja značajno koncentraciju hemoglobina. Međutim, naši rezultati nisu u saglasnosti sa nalazima Agbaje i sar. (2009) koji su utvrdili da tromesečna p.o. primene ekstrakta karanfilića (*Syzygium aromaticum*) u dozi od 300 i 700 mg/kg/dan prouzrokuje značajno povećanje koncentracije hemoglobina.

Uticaj eugenola na prosečnu masu hemoglobina u eritrocitima

Posle dvonedeljne primene, eugenol prouzrokuje značajno povećanje prosečne mase hemoglobina po eritrocitu (MCH) kod pacova tretiranih dozom od 200 mg/kg/dan u odnosu na kontrolne i u odnosu na životinje tretirane dozom od 50 mg/kg/dan ($P < 0,05$) (tabela 1). Međutim, eugenol posle četvonedeljne primene ni u jednoj dozi nije ispoljio ovaj efekat (tabela 2). Efekat je nespecifičan jer ne pokazuje doznu zavisnost.

Uticaj eugenola na prosečnu zapreminu eritrocita

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno na zapreminu eritrocita (tabele 1. i 2). Neznatno povećanje uočeno je 28. dana oglada u svim grupama tretiranim eugenolom. Povećanje ne zavisi od doze eugenola, niti od dužine tretmana.

Uticaj eugenola na hematokrit

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne menja vrednost hematokrita (tabele 1. i 2). Najniža ispitivana doza (10 mg/kg) posle dvonedeljne primene prouzrokuje neznatno povećanje vrednosti hematokrita, a 20 puta veća neznatno smanjenje. Na kraju ispitivanja, vrednosti hematokrita bile su najniže posle primene eugenola u dozi od 400 mg/kg/dan, a najveće posle primene 50 mg/kg/dan.

Poređenjem vrednosti broja eritrocita, koncentracije hemoglobina i hematokrita kod pacova posle primene eugenola u ispitivanim dozama tokom dve i četiri nedelje nije ustanovljen njegov negativan uticaj na hematopoezu, niti hemolitička aktivnost. Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja eugenola na hematokrit u ovom ogledu kontradiktorni su sa rezultatima Agbaje i sarađnika (2009), koji su ustanovili da vođeni ekstrakt karanfilića u dozi od 300 i 700 mg/kg aplikovan tokom dve nedelje dovodi do značajnog prolaznog povećanja hematokrita kod pacova.

Uticaj eugenola na broj trombocita

Eugenol primenjivan tokom 14 dana nema značajanog uticaj na broj trombo-

cita (tabela 1). Međutim, posle četvoro-nedeljne primene nastaju značajne kvantitativne razlike ($p < 0,01$, tabela 2), koje ne zavise od veličine primenjene doze, niti od dužine tretmana.

Naši rezultati donekle su u saglasnosti sa rezultatima Agbaje i sar. (2009), koji su dokazali da eugenol u dozi od 300 mg/kg/dan ne utiče na ove krvne elemente, dok doza od 700 mg/kg/dan prouzrokuje značajno povećanje njihovog broja.

Uticaj eugenola na broj leukocita i diferencijalnu krvnu sliku

Sve ispitivane doze primenjivane tokom dve nedelje prouzrokuju neznatno smanjenje broja leukocita. Najviša doza eugenola prouzrokuje najizraženije smanjenje, a doza od 200 mg/kg/dan najmanje (tabela 1). Ustanovljena leukocitopenija ne bi mogla da se pripiše supresivnom hematopoeznom dejstvu eugenola, što se da zaključiti na osnovu činjenice da se broj leukocita povećavao kod svih grupa pacova tretiranih eugenolom posle 28. dana ispitivanja u odnosu na 14. dan (tabele 1. i 2). Eugenol je prouzrokovao neznatno dozno-zavisno povećanje broja leukocita u funkciji vremena. Dobijeni rezultati u saglasnosti su sa nalazima drugih istraživača i pokazuju da eugenol primenjivan u hrani u koncentraciji od 0,1% do 1% tokom četiri meseca (Hagan i sar., 1967) i u

vodi u dozi 300 i 700 mg/kg/dan tokom tri meseca ne menja značajno broj leukocita kod pacova (Agbaje i sar., 2009). Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno na broj limfocita, monocita i granulocita (tabele 1. i 2). Naši rezultati ispitivanja uticaja eugenola na diferencijalnu krvnu sliku u saglasnosti su sa nalazima Agbaje i sar. (2009).

Uticaj eugenola na proteinemiju i koncentraciju albumina u serumu

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče na koncentraciju proteina u serumu (tabele 3. i 4). Naši rezultati nisu u saglasnosti sa literaturnim podacima koji pokazuju da eugenol primenjivan p.o. tokom tri meseca u dozi od 300 mg/kg/dan značajno ($P < 0,05$) smanjuje koncentraciju ukupnih proteina kod pacova (Agbaje i sar., 2009). Ovaj nalaz nije posledica toksičnog delovanja eugenola na hepatocite s obzirom na to da viša ispitivana doza (700 mg/kg/dan) nije uticala na koncentraciju proteina u serumu. Brojni su radovi koji ukazuju na to da eugenol i biljke koje ga sadrže imaju antioksidativno i hepatoprotektivno dejstvo i tako smanjuju uticaj lekova i drugih ksenobiotika na jetru (Pulla Reddy i Lokesh, 1996; Ubaid i sar., 2003; Chaieb i sar., 2007; Samson i sar., 2007; Sakr i sar., 2011; Venu Prasad i Khanum, 2012).

Tabela 3. Vrednosti biohemijskih parametara krvi kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 14 dana

Tretman	Apsolutna kontrola	Kontrola	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Ukupni proteini (g/l)	67,40±1,12	68,00±1,16	66,83±1,08	67,17±0,79	69,67±1,99	71,67±3,32
Albumini (g/l)	11,8±0,73	11,8±0,53	13,50±0,34	12,50±0,34	12,67±0,84	10,83±0,65
Urea (g/l)	8,78±0,33	8,14±0,29	8,58±0,19	8,42±0,47	8,37±0,39	8,08±0,32
Kreatinin (g/l)	20,40±3,08	21,20±2,15	16,00±2,54	17,83±3,02	22,33±6,51	22,33±3,50
Alanin aminotranferaza ALT (u/l)	61,20±4,55	75,60±4,81	54,50±2,81*	64,50±1,78	61,50±1,15	71,17±6,27
Alkalna fosfataza ALP (u/l)	184,00±12,2	225,60±20,03	223,67±12,47	238,50±9,27	250,50±15,26	221,50±14,33
Kreatin kinaza CK (u/l)	1424,00±104,2	2296,80±590,9	1159,17±167,2	1229,50±319,5	968,83±318,2	911,67±279,97

* $P<0,05$ značajnost razlike između kontrolne grupe i grupe tretirane eugenolom u dozi od 10 mg/kg/dan

Tabela 4. Vrednosti biohemijskih parametara krvi kod kontrolnih pacova i pacova tretiranih eugenolom tokom 28 dana

Tretman	Apsolutna kontrola	Kontrola	10 mg/kg	50 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Ukupni proteini (g/l)	67,20±1,83	69,60±2,23	67,33±1,09	67,83±2,07	68,17±2,07	68,67±2,27
Albumini (g/l)	11,80±0,58	11,80±0,66	13,00±0,58	12,17±0,40	12,33±0,49	11,92±0,29
Urea (g/l)	11,80±0,58	11,80±0,66	13,00±0,58	12,17±0,40	12,33±0,49	11,92±0,29
Kreatinin (g/l)	27,40±2,38	20,40±2,87	17,50±2,76	18,33±3,23	14,67±2,95	20,92±2,11
Alanin aminotranferaza ALT (u/l)	64,40±4,09	74,20±3,44	58,00±2,39*-	66,50±1,84	62,17±1,58*	74,50±2,78*+
Alkalna fosfataza ALP (u/l)	191,60±8,93	231,80±19,01	242,67±8,60	210,33±7,50	245,17±15,14	230,58±10,07
Kreatin kinaza CK (u/l)	1442,40±78,95	2051,20±376,7	1220,33±157,7	1231,50±99,3	999,00±305,8*-	454,04±131,1*-

* značajno smanjenje aktivnosti ALT u poređenju sa K i grupom tretiranom eugenolom u dozi od 10 mg/kg/dan, $P<0,05$,

*+ značajno povećanje aktivnosti ALT u poređenju sa grupom tretiranom eugenolom u dozi od 10 mg/kg/dan i dozom od 400 mg/kg/dan, kao i između grupa tretiranih sa dve više doze eugenola (200 i 400 mg/kg/dan), $P<0,05$,

*- značajno smanjenje aktivnosti CK u odnosu na (K) grupu i grupe tretirane eugenolom u dozi od 200 i 400 mg/kg/dan, $P<0,05$.

Rezultati ispitivanja nižih (10 i 50 mg/kg/dan) i viših doza eugenola (200 i 400 mg/kg) pokazuju da on ne utiče na koncentraciju albumina u serumu pacova. Naši rezultati nisu u saglasnosti sa nalazima Agbaje i sar. (2009) koji su ustanovili da više doze povećavaju koncentraciju albumina u serumu, ali tek posle tromesečne primene.

Uticaj eugenola na koncentraciju uree i kreatinina u serumu

Eugenol primenjivan u dozama od 10, 50, 200 i 400 mg/kg tokom četiri nedelje ne utiče na koncentraciju uree u serumu pacova (tabele 3. i 4). Rezultati ispitivanja pokazuju da maksimalna doza eugenola (400 mg/kg/dan) ne remeti funkciju bubrega. Naši rezultati su donekle u saglasnosti sa nalazima Agbaje i sar. (2009), koji su ustanovili da ekstrakt karanfilića primenjivan tokom tri meseca u dozi od 700 mg/kg/dan prouzrokuje značajno povećanje koncentracije uree u krvi pacova, što je posledica nefrotoksičnog dejstva sekundarnih metabolita prisutnih u ekstraktu karanfilića, a ne samog eugenola (Agbaje i sar., 2009). Eugenol ne samo da nema nefrotoksičan efekat, već može da poboljša funkciju bubrega narušenu gentamicinom, ukoliko se primeni p.o. u dozi od 100 mg/kg/dan četiri dana pre i tokom terapije ovim antibiotikom (Said, 2011). Rezultati ispitivanja uticaja eugenola u dozi od 5 g/kg/dan tokom 14 dana kod pacova ukazuju na to da on značajno smanjuje koncentraciju uree u krvi i neznatno utiče na nivo kreatinina (Farhath i sar., 2012).

Sve ispitivane doze eugenola primenjivane tokom 14 i 28 dana nisu uticale na koncentraciju kreatinina u krvi pacova (tabele 3. i 4).

Uticaj eugenola na aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP) i kreatinkinaze (CK)

Značajno smanjenje ($P < 0,05$) aktivnosti ALT u serumu pacova ustanovljeno je posle dvonedeljne i četvoronedeljne primene eugenola u dozi od 10 mg/kg/dan (tabele 3. i 4), dok doza od 400 mg/kg/dan prouzrokuje značajno ($P < 0,05$) povećanje u odnosu na netretirane pacove i tretirane dozom od 10 mg/kg/dan (tabela 4). Aktivnost enzima ALT je osetljiv marker za procenu stepena oštećenja hepatocita. Povećanje aktivnosti ovog enzima u direktnoj je korelaciji sa stepenom oštećenja jetre (Adedapo i sar., 2004).

Naši rezultati ispitivanja mogućeg hepatotoksičnog dejstva eugenola ukazuju na to da najviša ispitivana doza ovog fenolnog jedinjenja, primenjivana tokom četiri nedelje, prouzrokuje neznatan stepen hipoksije i/ili oštećenje citoplazme hepatocita. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa nalazom da vođeni ekstrakt karanfilića primenjivan tokom tri meseca u dozi od 700 mg/kg/dan prouzrokuje neznatno povećanje aktivnosti ALT (Agbaje i sar., 2009).

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče na aktivnost ALP u serumu pacova. Aktivnost ALP nije zavisila od doze eugenola niti od dužine

tretmana (tabele 3. i 4). Naši nalazi nisu u saglasnosti sa rezultatima Agbaje i sar. (2009), koji su dokazali značajno smanjenje aktivnosti ovog enzima.

Eugenol primenjivan tokom dve nedelje ne utiče na aktivnost CK (tabela 3). Međutim, na kraju četvoronedelnog tretmana eugenolom u dozi od 200 i 400 mg/kg/dan značajno je smanjena aktivnost enzima, a vrednost je niža u odnosu na one posle primene dve niže testirane doze i kontrole (tabela 4). Na osnovu ovih podataka, možemo da konstatujemo da eugenol ne samo da nema toksičan efekat na miokard i poprečno-prugaste mišiće, već ima izvestan protektivan efekat koji bi mogao da se pripiše njegovom antioksidativnom dejstvu (Cuvelier i sar., 1996; Fujisawa i sar., 2002). Poznato je da povećanje aktivnosti CK ukazuje na oštećenje poprečno-prugastih mišića i miokarda, odnosno na njihovo razaranje, mišićnu distrofiju, miozitis, infarkt miokarda i sl. (Rajaduraia i Stanely Mainzen Prince, 2007).

ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, mogu da se izvedu sledeći zaključci:

Eugenol aplikovan p.o. u dozi od 10, 50, 200 i 400 mg/kg/dan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno na broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, zapreminu eritrocita, broj leukocita i leukocitnu formulu kod pacova.

Ispitivane doze eugenola primenjivane tokom četiri nedelje prouzrokuju kvalitativno različite promene broja trombocita koje ne zavise od veličine primenjene doze, niti od dužine tretmana.

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno na broj limfocita, monocita i granulocita.

Eugenol primenjivan tokom dve i četiri nedelje ne utiče značajno na proteinemiju, albuminemiju, koncentraciju uree i kreatinina u krvi.

Eugenol primenjivan tokom četiri nedelje ne utiče na aktivnost ALP. Sve tri niže doze statistički značajno smanjuju aktivnost ALT, dok je najviša doza povećava.

Eugenol davan tokom četiri nedelje u dozi od 200 i 400 mg/kg/dan prouzrokuje značajno smanjenje aktivnosti CK.

LITERATURA

1. Adedapo A. A., Abatan M. O., Olorunsogo O. O. (2004): *Toxic effects of some plants in the genus Euphorbia on haematological and biochemical parameters of rats*. Veterinarski arhiv 74: 53-62.
2. Agbaje E. O., Adeneye A. A., Daramola A. O. (2009): *Biochemical and toxicological studies of aqueous extract of Syzigium aromaticum (L) Merr. & Perry (Myrtaceae) in rodents*. Afr J Trad Complement Altern Med 6: 241-54.
3. Chaieb K., Hajlaoui H., Zmantar T., Kahla-Nakbi A., Rouabhia M., Mahdouani K., Bakhrouf A. (2007): *The*

- chemical composition and biological activity of clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzigium aromaticum L. Myrtaceae).* Phytother Res 21: 501–6.
4. Cuvelier M., Richard H. and Berset C. (1996): *Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary.* J AOACS, 73, 645–652.
 5. EMEA/MRL 406/98 Final. Committee for veterinary medicinal products *Cariophylli aetheroleum summary report.*
 6. EPSA (2006): *Consideration of eugenol and related hydroxyallylbenzene derivatives evaluated by JECEFA (65 th meeting) structurally related to ring-substituted phenolic substances evaluated by EFSA in FGE.* 22.
 7. Farhath S., Vijaya P., Vimal M. (2012): *Evaluation of toxicity in essential oils of geraniol, geranial acetate, gingerol and eugenol in rats,* Int J Phytomed 4: 465–8.
 8. Fujisawa S., Atsumi T., Kadoma Y. Sakagami H. (2002): *Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity.* Toxicology 177: 39–54.
 9. Hagan E. C., Hansen W. H., Fitzhugh O. G., Jenner P. M., Jones W. I., Taylor J. M., Long E. L., Nelson A. A., Brouwer J. B. (1967): *Food flavorings and compounds of related structure II. Subacute and chronic toxicity.* Food Cosmet Toxicol 5: 141–57.
 10. Hagan E. C., Jenner P. M., Jones W. H., Fitzhugh O. G., Long E. L., Brouwer J. G., Webb W. K. (1965): *Toxic properties of compounds related to safrole.* Toxicol Appl Pharmacol 7: 18–24.
 11. Nijssen B., van Inden-Visscher K., Donders J. *Volatile Compounds in Food.* 8.1, Zeist, Netherlands Central Instituut Vooz Voedingsonderzoek TNO.
<http://www.voeding.tno.nl/Vcf/vcfnovigat.cfm>
 12. Pulla Reddy A. C. and Lokesh B. R. *Effect of curcumin and eugenol on iron-induced hepatic toxicity in rats.* Toxicology 1996, 107: 39–45.
 13. Rajadurai M. and Stanely Mainzen Prince P. (2007): *Preventive effect of naringin on cardiac markers, electrocardiographic patterns and lysosomal hydrolases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats.* Toxicology 230: 178–188.
 14. Said M. M. (2011): *The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney.* Fundam Clin Pharm, 25: 708–16.
 15. Sakr S. A., El-Abd S. A., Osman M., Kandil A. M., Helmy M. S. (2011): *Ameliorative effect of aqueous leave extract of Ocimum basilicum on Ccl₄-Induced hepatotoxicity and apoptosis in albino rats.* Journal of American Science, 7: 116–27.

16. Samson J., Sheeladevi R., Ravindran R. (2007): *Oxidative stress in brain and antioxidant activity of Ocimum sanctum in noise exposure*. Neurotoxicology, 28: 679–85.
17. Spoo W. (2004): *Concepts and toxicology*. In: Plumlee K. H. Clinical veterinary toxicology. Eds. K. H. Plumlee, Mosby 2–7.
18. Ubaid R. S., Anantrao K. M., Jaju J. B., Mateenuddin M. (2003): *Effect of Ocimum sanctum (OS) leaf extract on hepatotoxicity induced by antitubercular drugs in rats*. Indian J Physiol Pharmacol 47: 465–70.
19. Venu Prasad M. P. and Khanum F. (2012): *Antifatigue activity of ethanolic of Ocimum sanctum in rats*. Research Journal of Medicinal Plant 6, 37–46.



DOI: 10.7251/VJRS1302143M

UDK 616:616.8-009.7

М. Миловановић, М. Јездимировић, М. Јовановић, С. Ивановић¹

ФАРМАКОТЕРАПИЈА ИНФЛАМАТОРНОГ И ПОСТОПЕРАТИВНОГ БОЛА КОД ЖИВОТИЊА

Кратак садржај

У патогенези инфламације септичког или асептичког порекла бол је један од основних знакова инфламације. Јачина и трајање бола који прати упална стања, зависи од места на коме се развија запаљенски процес и узрока запаљења. Тако, инфламаторни бол може бити слабог до умереног интензитета или јако изражен, какав је код канцерске болести. Постоперативни бол, који настаје као последица циљане озледе ткива (оперативни рез, остеосинтеза, кастрација...), је обично јаког интензитета, али краћег трајања, па и медикаментозна контрола оваквог бола траје краће (до 3 дана). Терапија инфламаторног и постоперативног бола код животиња спроводи се применом неопиоидних и опиоидних аналгетика, гликокортикоида, антихистаминика и флогистика/рубефацијенса који су индиковани за контролу бола код хроничне инфламације (тендинитис, бурзитис, миозитис, артритис, спондилоза...). Код одабира лека за терапију бола од пресудног значаја је клиничка ефикасност лека, изостајање нежељених ефеката и питање каренце, када се лек примењује код животиња чија су ткива и производи намењени за исхрану људи.

Кључне речи: инфламаторни, постоперативни бол, аналгетици, гликокортикоиди, антихистаминици.

¹ Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

Milovanović M., Jezdimirovic M., Jovanovic M., Ivanovic S.¹

PHARMACOTHERAPY OF INFLAMMATORY AND POSTOPERATIVE PAIN IN ANIMALS

Abstract

In the pathogenesis of inflammation septic or aseptic origin, pain is one of the main signs of inflammation. The strength and duration of pain that accompanies inflammatory conditions, depends on the site of a developing inflammation and causes of inflammation. Thus, inflammatory pain can be low to moderate intensity, or very strong as is the cancer diseases. Postoperative pain, which occurs as a result of target tissue injury (surgical incision, osteo synthesis, castration...) is usually high intensity, but short duration, and even control this pain medication is shorter (up to 3 days). Treatment of inflammatory and chronic pain in animals is carried out by applying non-opioid and opioid analgesics, glucocorticosteroids, antihistamines, and flogistics / rubefacients, which are indicated for the control of pain in chronic inflammation (tendinitis, bursitis, myositis, arthritis, spondylosis). When choosing a drug for the treatment of pain is crucial clinical efficacy, absence of side effects and the question of withdrawal, when the drug is administered to an animal whose tissues and products intended for human consumption.

Keywords: inflammatory, postoperative pain, analgesics, glucocorticoids, antihistamines

УВОД

Код животиња се бол дефинише као „аверзивно сензорно искуство изазвано стварним или потенцијалним оштећењем ткива, које доводи до прогресивних моторних или вегетативних реакција, приморава животињу да научи како да избегне бол, и може да измени понашање карактеристично за дату врсту, укључујући и социјално понашање” (Zimmermann, 1986).

Болне дражи се на површини (кожа, слузокожа) или унутар тела (скелетни мишићи, зглобови, тетиве, периост...) региструју помоћу рецептора за бол – **ноцицептора**. Ови рецептори су заступљени у готово свим ткивима, а нарочито у површинским слојевима коже, периосту, зидовима артеријских крвних судова, зглобним површинама и текторијуму лобање. На основу начина раздраживања, разликују се **механорецептори, терморецептори и полимодални рецептори**. Механо- и термоноцицептори активирају се деловањем механичке односно термичке дражи. Полимодални ноцицептори региструју три врсте дражи: механичку, термичку и хемијску. До данас познате бол-продукујуће (алгогене) супстанце су хемијски медијатори (хистамин, брадикинин, простагландини, леукотриени, фактор раста, цитокини, млечна киселина, АТП, АДП, H^+ , K^+ ...) ослобођени из инфламираног ткива. Иначе, све три врсте наведених ноцицептора карактерише висок праг осетљивости, тако да их активирају наддражаји високог интензитета,

тј. они који озлеђују (Flecknell и Waterman-Pearson, 2001; Стевановић, 2004).

Инфламаторни бол или инфламаторна хипералгезија је симптом који прати сваку запаљенску реакцију ткива. Манифестује се као спор, туп бол, умереног до средњег интензитета. Настаје услед ослобађања медијатора инфламације, који директно или индиректно стимулишу полимодалне ноцицепторе на месту запаљења (периферна хиперсензитизација). Такође, медијатори инфламације, а пре свега простагландини у кичменој мождини, потенцирају процес преноса ноцицепције ка ЦНС-у (централна хиперсензитизација) (Zeilhofer и сар., 2004). У току инфламације, простагландини (PGE_2 и PGI_2) могу да делују директно на ноцицепторе аферентних сензитивних влакана. Истовремено, они повећавају осетљивост ноцицептора према другим алгогеним проинфламаторним супстанцама, (брадикинин, серотонин, хистамин) (Kidd и Urban, 2001).

Постоперативни бол (инцизионни бол) прати „намерну“ трауму ткива насталу услед оперативног захвата. По типу спада у оштар бол, а његов интензитет (јачина и дужина трајања) зависи од места инцизије. Механизам настајања постоперативног бола је сложен, а за основу има оштећење периферних нервних структура, које директно активирају неуроне у дорзалним кореновима кичмене мождине

(централна хиперсензитизација) (Hepkel, 2000).

На основу разлике у механизму настајања инфламаторног и постоперативног бола, лечење и контрола инфламаторног бола код животиња спроводи се првенствено применом неопиоидних аналгетика, и то: нестероидних антиинфламаторних лекова (НСАИЛ) и парацетамола. Терапија и контрола постоперативног бола базира се на примени опиоидних аналгетика, али и НСАИЛ новије генерације. Такође, врло је корисна комбинована примена опиоидних аналгетика са НСАИЛ.

НЕСТЕРОИДНИ АНТИИНФЛАМАТОРНИ ЛЕКОВИ (НСАИЛ)

Нестероидни антиинфламаторни лекови су посебна фармакодинамска група лекова позната под називом антипиретички аналгетици, неопиоидни аналгетици или нестероидни антиреуматици. Примењују се нашироко, како у ветеринарској тако и у хуманој клиничкој пракси, за отклањање, ублажавање и контролу бола слабог до средње умереног интензитета (аналгетичко дејство), лечење упала костију и меких ткива (антиинфламаторно дејство), као и за снижавање повишене телесне температуре (антипиретичко дејство).

Нестероидни антиинфламаторни лекови своје аналгетичко деловање остварују инхибицијом синтезе простагландина (Вучковић и сар., 2007).

Тачније, ови лекови инхибишу активност циклооксигеназе (COX) ензима, одговорног за синтезу простагландина из арахидонске киселине. У организму животиња, циклооксигеназа је присутна у два изо-облика, и то: циклооксигеназа-1 (COX-1) и циклооксигеназа-2 (COX-2). Циклооксигеназа-1 је конститутивни ензим одговоран за синтезу простагландина који учествују у бројним физиолошким процесима у организму. У новије време у мозгу је детектован конститутивни изо-облик циклооксигеназа-3 (COX-3) (Hersh и сар., 2005). Насупрот томе, COX-2 је индуцибилни ензим који се активира само када је ткиво у запаљењу (Rang, 2005). Индукована COX-2 катализује прекомерну продукцију простагландина (ПГЕ₂, ПГИ₂) који развијају инфламацију и инфламаторни бол.

У терапији бола инфламаторног порекла код животиња примењују се следећи НСАИЛ:

Кетопрофен је потентан НСАИЛ који инхибише синтезу простагландина, леукотриена, као и активност брадикинина. Овај лек се примењује код **коња, говеда, свиња, паса и мацака** за отклањање инфламаторног и постоперативног бола. Коњима се даје у дози од 2,2 мг/кг дневно (и.в.), најдуже пет дана, за отклањање и контролу инфламаторног бола код обољења мишићно-коштаног система. Кравама са клинички манифестним матитисом праћеним болом, као и крмачама са ММА синдромом, кетопрофен се даје у дози од 3 мг/кг дневно, током три

дана. Код крава се овај лек у препорученој дози апликује и.в. или дубоко и.м., а крмачама искључиво дубоко и.м. Предвиђена каренца за месо третираних крава и крмача је четири дана, коња један дан, а за млеко нула дана од последње примене лека (Bishop, 2006). Доза кетопрофена за псе износи 2 мг/кг дневно (и.м., с.ц., и.в.), а потом 1 мг/кг дневно (п.о.), током пет дана. Мачкама се даје у дози од 0,5-1 мг/кг дневно (п.о.) током пет дана. За контролу постоперативног бола код паса и мачака кетопрофен се примењује постоперативно у дози од 1–2 мг/кг (и.м., с.к., и.в.), током три дана или у дози од 1 мг/кг (п.о.) током пет дана. Псима и мачкама кетопрофен не треба давати пре хируршке интервенције, због могућих крвављења (Duncan и Lascelles, 2007; Plumb, 2008; NOAH, 2009; Јездимировић, 2010).

Мелоксикам је НСАИЛ који испољава нешто већу селективност према COX-2. Примењује се за ублажавање и отклањање инфламаторног бола код **паса** и **говеда** и за контролу постоперативног бола код **мачака**. Псима се овај лек најчешће даје код болних стања која прате остеоартритис. Примењује се п.о., с.к. или и.в. у дози од 0,2 мг/кг првог дана, а затим 0,1 мг/кг дневно. Код мачака се мелоксикам примењује п.о. или с.к. у дози од 0,3 мг/кг једнократно (пре оперативног захвата), или 0,1–0,2 мг/кг једном дневно, 3–4 дана. Код крава, мелоксикам је ефикасан у лечењу инфла-

маторног бола и инфламације млечне жлезде (маститис). Примењује се с.к. или и.в. у дози од 0,5 мг/кг, једнократно, с тим да је каренца за месо 15 дана, а за млеко пет дана од примене лека (Bishop, 2006; Plumb, 2008).

Пироксикам, као и мелоксикам, спада у оксикаме. Као аналгетик примењује се код паса са остеоартритисом, када се апликује у дози од 0,3 мг/кг п.о. на 48 сати. Такође, у скорије време, доказана је и антитуморгена активност овог НСАИЛ код неких врста тумора паса и мачака (Duncan и Lascelles, 2007; Plumb, 2008).

Флуниксин меглумин је ненаркотички аналгетик из групе НСАИЛ, који се примењује искључиво у ветеринарској клиничкој пракси. Поред познатог механизма деловања (инхибиција продукције простагландина), овај лек своје аналгетичко дејство остварује инхибицијом продукције азотног оксида (НО) (Миловановић и сар., 2008; Миловановић и сар., 2009). Као аналгетик примењује се код **коња**, **говеда** и **паса**. За отклањање и контролу бола код ламинитиса, флуниксин меглумин се коњима даје у дози од 0,5–1,1 мг/кг и.в. једном дневно, или п.о. на 8–12 сати, максимално пет дана. За ублажавање и отклањање висцералног бола, који је водећи симптом цревне колике коња, флуниксин меглумин се апликује у дози од 1,1 мг/кг и.в. или и.м. једном дневно, 3–5 дана. Говедима са асептичним ламинитисом овај лек се апликује у дози од 1 мг/кг и.в., једном дневно, најдуже пет дана, са

најбољим аналгетичким и антиинфламаторним ефектом када се да у првих 24 часа од појаве симптома болести. За контролу висцералног бола код говеда, доза флуниксин меглумина износи 0,25–1 мг/кг и.в. на 12–24 часа. Предвиђена каренца за месо третираних говеда и коња је седам дана, а за млеко третираних крава 36 сати од последње примене лека (Bishop, 2006; Plumb, 2008; NOAH, 2009). Код паса се инфламаторни и постоперативни бол контролишу применом овог лека у дози од 1 мг/кг и.в., с.ц., и.м., једнократно, са могућим понављањем следећег дана у истој дози (Plumb, 2008).

Меклофенаминска киселина је НСАИЛ који се као аналгетик примењује код **коња** за лечење инфламаторног бола који прати ламинитис и остеоартритис, када се апликује п.о. у дози од 2,2 мг/кг једном дневно током 5–7 дана (Bishop, 2006).

Тепоксалин је НСАИЛ који инхибише циклооксигеназу и липооксигеназу. За контролу инфламаторног бола код **паса** са остеоартритисом примењује се п.о. у дози од 20 мг/кг првог дана, а затим у дози од 10 мг/кг дневно. Дужа примена овог лека захтева стални ветеринарски надзор, и повремено прекид терапије. Тепоксалин се не прописује мачкама (Plumb, 2008; NOAH, 2009).

Карпрофен је НСАИЛ који испољава већу селективност према COX-2. За сада се примењује само код **паса** у

циљу отклањања и контроле инфламаторног и постоперативног бола. Могућа је примена овог лека и код **мачака**, али са великим опрезом. Перорална доза овог лека за пса износи 2 мг/кг т.м. на 12 сати или 4 мг/кг на 24 часа. За контролу постоперативног бола препоручује се доза од 4 мг/кг, два сата пре оперативног захвата. Код мачака се може примењивати за отклањање акутног бола једнократно у дози од 4 мг/кг, интрамускуларно (и.м.) или супкутано (с.к.). Третман овим леком се код мачака може поновити још једном, након 24 часа. Дужа примена карпрофена код паса може да проузрокује оштећење слузокоже желуца и црева, оштећење функције јетре и бубрега и поремећај коагулације. Набројана нежељена дејства су чешћа код паса раса лабрадор и ретривер (Duncan и Lascelles, 2007; Plumb, 2008; NOAH, 2009; Јездиминовић, 2010).

Фирококсиб и деракоксиб су НСАИЛ најновије генерације. Спадају у селективне инхибиторе циклооксигеназе-2 (COX-2 инхибитори), па су стога далеко безбеднији у односу на неселективне НСАИЛ. Наиме, ови коксиби штеде слузокожу гастроинтестиналног система и не делују токсично на бубреге и јетру (Вучковић и сар., 2007). За контролу инфламаторног бола код остеоартритиса коња фирококсиб се примењује п.о. у дози од 0,1 мг/кг, једном дневно, максимално 14 дана, а код паса за исту индикацију у дози од 5 мг/кг п.о. најдуже

седам дана. Деракоксиб је индикован за лечење инфламаторног бола код паса са остеоартритисом, када се примењује п.о. у дози од 1–2 мг/кг једном дневно. За контролу постоперативног бола, псима се овај лек апликује п.о. у дози од 3–4 мг/кг једном дневно, најдуже седам дана. Деракоксиб и фирококсиб се не примењују код паса са улцерацијама у ГИ тракту (због успоравања репарације оштећеног ткива), као и код gravidних и куја у лактацији. Такође, ови лекови се не прописују псима млађим од четири месеца. Коксибе не треба давати мачкама, јер њихово деловање на ову врсту није још довољно испитано (Plumb, 2008; NOAH, 2009).

Парацетамол (ацетаминофен) је дериват анилина који не спада у НСАИЛ. Делује аналгетички и антипиретички тако што инхибише експресију COX-3 у ЦНС-у. У ветеринарској клиничкој пракси примењује се за отклањање и контролу акутног бола код паса у дози од 10–15 мг/кг т.м., п.о. на 8 сати, током 5 дана. Дужа примена овог лека захтева корекцију дозе и режима дозирања на 5–10 мг/кг на 12 сати. Такође, парацетамол (10–15 мг/кг) може се комбиновати са кодеином (0,5–2 мг/кг). Оба лека дају се п.о. на 12 сати. Предност парацетамола у односу на НСАИЛ је у томе што не делује токсично на слузокожу гастроинтестиналног система и бубреге. Дужа примена парацетамола код паса може да проузрокује нежељене ефекте, као што су депресија, по-

враћање и хемоглобинемија. Набројана нежељена дејства су дозно зависна и реверзибилна. Парацетамол је контраиндикован за мачке, због изражене хепатотоксичности (Plumb, 2008; NOAH, 2009). Такође, не примењује се код других врста животиња, због недовољно испитане токсичности, ефикасности и делотворности.

ОПИОИДНИ АНАЛГЕТИЦИ

Наркотички аналгетици – опиоиди ефикасни су за ублажавање, отклањање и контролу бола јаког интензитета, какав је постоперативни бол. Свој изражени аналгетички ефекат опиоиди остварују активацијом опиоидних рецептора (μ , κ , δ -рецептора) у ЦНС-у, али и на периферији. Код паса, опиоидни аналгетици (морфин и њему слична једињења) делују депресивно на ЦНС. Насупрот томе, код мачака и неких других врста (коњ, говече, коза, овца, свиња), ови лекови могу да проузрокују екситацију. Такође, нежељени ефекти, као што су респираторна депресија, повраћање, констипација, хипертермија (коњ, говече, коза, мачка), хипотермија (пас), додатно отежавају примену опиоида у контроли постоперативног бола (Brearley и Brearley, 2001; Duncan и Lascelles, 2007; Plumb, 2008).

Морфин је фенантренски алкалоид опијума са наркотичко-аналгетичком активношћу. Носи епитет „божанског лека” за отклањање бола и представља јединицу мере аналгетичке активности свих осталих опиои-

дних аналгетика. За контролу постоперативног бола, морфин се примењује код **паса, мачака, коња, коза, оваца и свиња**. Морфин се псима даје у дози од 0,05–1 мг/кг, и.в. на 1–4 сата; у дози од 0,5–2,2 мг/кг, и.м./с.к. на 4–6 сати, или у дози од 1,5–3 мг/кг, п.о. на 12 сати. Мачкама се морфин апликује у дози од 0,02–0,1 мг/кг, и.в. на 1–4 сата; у дози од 0,2–0,5 мг/кг, и.м./с.к. на 3–4 сата, или п.о. у истој дози на 12 сати. За исту индикацију (контрола постоперативног бола) морфин се коњима даје у дози од 0,1 мг/кг на четири сата. Због могуће ексцитације, корисно је истовремено са морфином апликовати ацепромазин у дози од 0,011–0,022 мг/кг или 5–10 мг/450 кг и.м. Код свиња, морфин примењен преоперативно у дози од 0,2–0,9 мг/кг једнократно и.м. смањује дозу општег анестетика и контролише постоперативни бол. Постоперативни бол се код коза и оваца контролише применом морфина у укупној дози од 10 мг/животињи и.м. (Plumb, 2008).

Кодеин или метил-морфин је такође састојак опијума, који се добија метилацијом морфина. За контролу постоперативног бола, кодеин се примењује код **паса и мачака** у дози од 0,5–2 мг/кг, п.о. на 6–12 сати. Седација и опстипација су могући нежељени ефекти овог лека, и они су дозно зависни (Brearley и Brearley, 2001; Plumb, 2008).

Фентанил је синтетски опиоидни аналгетик, чија је аналгетичка активност око 100 пута већа од морфина. За контролу постоперативног бола

примењује се код **паса** у дози од 10–45 µг/кг/час, континуираном и.в. инфузијом. Примена фентанила у облику трансдермалног фластера за контролу постоперативног бола код паса није се показала задовољавајућом (Plumb, 2008).

Буторфанол је дериват морфина. Овај лек се може применити за контролу постоперативног бола код **паса, мачака и говеда**. Код **коња** се буторфанол показао ефикасним у контроли висцералног бола који прати цревне колике. Псима и мачкама се даје у дози од 0,1–0,5 мг/кг, и.в., и.м. или с.к. Мачкама је могуће апликовати овај лек у дози од 0,1–0,2 мг/кг и.в. иницијално, а затим и.в. инфузијом у дози од 0,1–0,2 мг/кг/час. Такође, може се комбиновати са кетамином (0,1 мг/кг, и.в.), када се он примењује на почетку третмана, који се наставља буторфанолом (и.в. инфузијом) у дози од 0,4 мг/кг/ч. Треба знати да буторфанол постиже слабији аналгетички ефекат код мачака него код паса. Поред тога, запажено је да код мачака буторфанол мења понашање, у том смислу да оне постају приврженије власнику и испољавају већу потребу за мажењем. Нежељени ефекат овог лека код паса је седација, а код мачке мидријаза, која је дозно зависна. За контролу постоперативног бола код говеда буторфан се апликује у дози од 0,02–0,25 мг/кг и.в., када аналгетички ефекат траје око четири сата. Каренца за месо говеда третираних овим опиоидним аналгетиком је четири дана, а

за млеко 72 ч од примене лека. За ублажавање и отклањање висцералног бола код цревних колика, коњима се буторфанол апликује у дози од 0,1 мг/кг и.в. на 3–4 сата или у дози од 0,01–0,02 мг/кг уз претретман ксилазином (0,02–0,1 мг/кг, и.м.) (Plumb, 2008; NOAH, 2009).

Бупренорфин је дериват тебаина, са молекулском структуром сличном морфину. Аналгетичка активност бупренорфина је око 30 пута већа од морфина. Овај лек има особину да се споро везује и ослобађа са опиоидних рецептора, те стога његово аналгетичко дејство споро наступа, али зато дуже траје. Бупренорфин је ефикасан у контроли постоперативног бола код **паса**, и посебно код **мачака**. Аналгетички ефекат овог опијата је бољи када се мачкама апликује орално, тј. букално (0,01–0,03 мг/кг на 6–12 сати) у односу на парентералну примену (0,01–0,03 мг/кг, и.м./с.к./и.в. на 6–12 сати). Респираторна депресија, повраћање и дисфорија, као могући нежељени ефекти, ретко се јављају (Robertson и Taylor, 2004; Plumb, 2008; NOAH, 2009).

Трамадол је синтетски опиоидни агонист са централним дејством према опиоидним рецепторима (μ -рецептори). Поред тога, трамадол инхибише преузимање серотонина и адреналина у централним синапсама. Описан механизам деловања обезбеђује овом леку добру аналгетичку активност код постоперативног бола **паса**. Примењује се п.о. у дози од 1–4 мг/кг на 8–12 сати.

Код паса се боља аналгетичка активност трамадола постиже комбинованом применом са парацетамолом или НСАИЛ (Plumb, 2008).

ОСТАЛИ ЛЕКОВИ У ТЕРАПИЈИ ИНФЛАМАТОРНОГ БОЛА

У лечењу инфламаторног бола код животиња, поред већ описаних неопиоидних аналгетика, примена гликокортикоида и антихистаминика може да дâ значајан допринос. Доказано је да ови лекови, самим тим што делују антиинфламаторно, инхибишући активност СОХ (гликокортикоиди) и ослобађање (гликокортикоиди) и активност хистамина (H_1 -антихистаминици), значајно доприносе смањењу интензитета инфламаторног бола, било да се примењују локално или системски. Такође, локална примена флогистика/рубефацијената (камфор, метил салицилат, терпентинско уље), посебно код хроничних упала зглобова, тетива и мишића, значајно умањује бол и убрзава оздрављење.

ЗАКЉУЧАК

Терапија и контрола бола код животиња је важан сегмент у процесу брзог оздрављења и опоравка. Отклонити бол код животиње има значајан етички моменат, умањује могућност развоја компликација основне болести (нпр. шока), и код власника животиње остварује повољну емоционалну реакцију.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brearley C. J., Brearley J. M. (2001): *Chronic pain in animals*. In: Flecknell AP, Waterman-Pearson A editors. *Pain Management in Animals*: 2th ed. London: WB Saunders: 147–160.
2. Compendium of Data Sheets, NOAH – National Office of Animal Health, 2009, UK.
3. Duncan B., Lascelles H. (2007): *Supportive care for the Cancer Patients*. In: Withrow JS and Vail MD editors. *Small Animal Clinical Oncology*. 4th ed. London: Saunders-Elsevier: 291–304
4. Flecknell A. P., Waterman-Pearson A. (2001): *Pain Management in Animals*, 2th edition (W.B. Saunders): 1–7.
5. Henkel G. (2000): *Mechanisms of Pain Caused by Surgical Incision Investigated in a Rat Model*. *Anesthesiology*, 93: 6A.
6. Hersh E. V., Lally E. T., Moore P. A. (2005): *Update on cyclooxygenase inhibitors: has a third COX isoform entered the fray?* *Curr Med Res Opin*, 21: 1217–1226.
7. Kidd L. B., Urban A. L. (2001): *Mechanism of inflammatory pain*. *Br. J. Anaesthesia*, 87: 3–11.
8. Milovanovic M., Vuckovic S., Prostran M., Jezdimirovic M., Cupic V. (2008): *Pretreatment with flunixin meglumine and N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on the inflammatory hyperalgesia in rats*. XII Congress Study of Pain, 17–23. 08. Glasgow, Scotland, PF 205.
9. Milovanovic M., Vuckovic S., Prostran M., Jezdimirovic M., Cupic V. (2009): *The effects of flunixin meglumine and L-NAME on the carrageenan-induced hyperalgesia in rats*. 9th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics-EACPT, 12–15 July Edinburg, UK, pp. 163–167.
10. Plumb D. (2008): *Veterinary Drug Handbook*. Sixth ed., Blackwell.
11. Rang P. H., Dale M. M., Ritter M. J., Moore K. P., Lamb P. (2003): *Farmakologija*, 5th ed. – prevod, prvo srpsko izdanje, 2005, Data Status, Novi Sad, Srbija.
12. Robertson S. A., Taylor P. M. (2004): *Pain management in cats – past, present and future. Part 2. Treatment of pain clinical pharmacology*. *J Feline Med. Surg*, 6: 321–333.
13. Yolande Bishop (2005): *The Veterinary formulary*. Sixth ed., Pharmaceutical Press.
14. Zeilhofer U. H., Ahmadi S., Lauterbach A., Lippross S. (2004): *Glycinergic Neurotransmission and the Control of Spinal Hyperalgesia. In Hyperalgesia: Molecular Mechanisms and Clinical Implication* (Braun K., Handwerker O. H. eds., IASP Press, Seattle): 259–270.
15. Zimmermann M. (1986): *Behavioural investigations of pain in*

animal: Assessing pain in farm animals. Duncan I. J. H. and Molony Y.: Office for Official Publications of the European Communities, Bruxelles, 16–29.

16. Вучковић С., Простран М., Тодоровић З. (2007): *Неоئيиоидни анализиици*. У књижи: Бошњак С., Белеслин Д., Вучковић-Денић Љ. (ур.) *Фармакошерапија канцерскої бола*. Београд: Академија медицин-ских наука, Српског лекарског друштва: 79–93.
17. Јелка Стевановић (2004): *Физиологија нервної сисџема*. Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Београд, Србија.
18. Миланка Јездимировић (2010): *Ветеринарска фармакологија*. IV допуњено издање. Београд: Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду.



DOI: 10.7251/VJRS1302154P

UDK 612.018:612.621.9:636.2

V. Pavlović, M. Maletić, S. Vakanjac, M. Pavlović, M. Đurić, V. Magaš¹

PRIMENA HORMONA U INDUKCIJI I SINHRONIZACIJI ESTRUSA I OVULACIJE KOD KRAVA

Kratak sadržaj

Imajući u vidu značaj i obim stočarske proizvodnje, nameće se pitanje praćenja zdravlja i plodnosti u zaptima krava. Visoka produktivnost povlači za sobom negativne efekte na plodnost, pa tako između proizvodnje mleka i plodnosti postoji „borba za primat”. Jedan od načina borbe za što bolju plodnost u zaptima krava je i primena hormona u manipulaciji polnim ciklusom kod krava. Cilj ove biotehnoške mere je sinhronizacija i indukcija estrusa, kao i sinhronizacija ovulacije u određenim fazama polnog ciklusa. Na taj način omogućava se pravilno i racionalno iskorišćavanje kapaciteta farmi i smanjuju troškovi ljudstva, postiže se bolja iskoristivost semena i efikasnije planiranje proizvodnje. Za indukciju i sinhronizaciju estrusa koriste se preparati prostaglandina i njegovih analoga kroz nekoliko različitih protokola, dok se za sinhronizaciju preovulatornog folikularnog razvoja i indukciju ovulacije koriste preparati na bazi GnRH i progestina u kombinaciji sa prostaglandinima.

Ključne reči: krave, sinhronizacija, prostaglandini, GnRH, ovulacija.

V. Pavlović, M. Maletić, S. Vakanjac, M. Pavlović, M. Đurić, V. Magaš

APPLICATION OF HORMONES IN THE INDUCTION AND SYNCHRONIZATION OF OESTRUS AND OVULATION IN COWS

Abstract

Considering the importance and extent cattle production the question is monitoring health and fertility in dairy cow herds. High productivity implies a

¹ Katedra za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje domaćih životinja, Fakultet veterinarske medicine Univeziteta u Beogradu.

negative effect on fertility and thus between milk production and fertility of a "struggle for supremacy." One of the ways to fight for better fertility in dairy cow herds is the use of hormones in the manipulation of the sexual cycle of the cow.. The objective of managing sexual cycle in cows and heifers beef and dairy breeds synchronization, induction of estrus and ovulation synchronization in certain phases of the sexual cycle. In this way, a proper and efficient utilization of capacity and reduce farm costs of manpower, better and more efficient utilization of seed production planning. For the induction and synchronization of estrus using the products and analogues of prostaglandins in several different protocols, while the synchronization preovulation follicular development and ovulation induction using products based on GnRH and progesterin in combination with a prostaglandin.

Keywords: cows, synchronization, prostaglandins, GnRH, ovulation.

UVOD

Goveda su nesezonski poliestrične životinje kod kojih se polni ciklusi smenjuju svakih 21 (± 3) dana. Pod polnim ciklusom podrazumevaju se složeni hormonalni i funkcionalni procesi koji se odigravaju na genitalnom traktu polno zrelih, negravidnih ženki. Ovi procesi se odnose na rast i razvoj folikula i jajne ćelije, ovulaciju i stvaranje i regresiju žutog tela. Polni ciklus protiče kroz nekoliko faza:

- estrus (18–24 časa),
- eostestrus (2–4. dana ciklusa),
- diestrus (5–18. dana ciklusa),
- proestrus (19–20. dana ciklusa).

Celokupan polni ciklus krava i junica može se podeliti na dve velike faze: lutealnu i folikularnu. Lutealna faza je dominantna i traje oko 16 dana, obuhvatajući period metestrusa i diestrusa, gde je dominantan uticaj progesterona,

dok folikularna faza obuhvata period proestrusa i estrus, u kom dolazi do pada nivoa progesterona usled regresije žutog tela i rasta dominantnog folikula na jajniku, uz povećanje koncentracije estrogena u folikularnoj tečnosti. Najvažniju ulogu u regulaciji polnog ciklusa ima gonadorelizirajući hormon (GnRH). Sintetiše se u hipotalmusu i pulsativno luči svakih 60 do 180 minuta. Neuro-hormonalnim putem dospeva do adenohipofize, gde podstiče sintezu lučenje folikulostimulišućeg (FSH) i luteinizujućeg hormona (LH). Na sekreciju GnRH utiče mnoštvo endogenih, ali i egzogenih stimulusa. Tokom jednog polnog ciklusa, dolazi do rasta i razvoja folikula kroz dva do tri folikularna talasa. U toku jednog folikularnog talasa dolazi do selekcije samo jednog, ređe dva folikula, koji su sposobni za dalji rast i razviće. Folikulostimulišući hormon pozitivno utiče na rast folikula tek kada on dostigne veličinu od 4–5 mm.

Ovaj folikul se još zove i dominantni, jer sprečava rast i razviće drugih folikula iz istog folikularnog talasa. Folikularni talasi se javljaju 1. i 10. dana ako se radi o dva, odnosno 2, 9. i 16. dana ako se radi o tri folikularna talasa. Dužina lutealne faze polnog ciklusa je u vezi sa brojem folikularnih talasa, jer plotkinje sa tri folikularna talasa, po pravilu, imaju dužu lutealnu fazu. U folikularnoj tečnosti dominantnog folikula koji se nalazi u lutealnoj fazi sintetišu se estradiol i inhibin. Visok nivo progesterona u ovoj fazi blokira dalji rast i razviće folikula i on konačno atrezira. Međutim, može se desiti u određenim situacijama da usled nešto veće sinteze estrogena od strane dominantnog folikula u lutealnoj fazi dođe po pojave znakova estrusa i do 10 dana po osemenjavanju, zbog čega treba biti obazriv prilikom pregleda ovih životinja. Kada dođe do atrezije do tada dominantnog folikula, započinje novi folikularni talas. Do ovulacije dolazi samo u situaciji kada dominantni folikul iz drugog ili trećeg folikularnog talasa dostigne potpuno razviće u fazi regresije žutog tela (stadijum De-grafovog folikula). Ovulacija je indukovana preovulatornim pikom luteinizirajućeg hormona (LH), do kojeg obično dolazi oko 30 časova od početka simptoma estrusa. Istovremeno, LH hormon stimuliše i sintezu žutog tela.

INDUKCIJA I SINHRONIZACIJA ESTRUSA POMOĆU PROSTAGLANDINSKIH PREPARATA

Prostaglandine kao bioaktivne supstance luče skoro sva telesna tkiva, izuzev eritrocita, a po hemijskom sastavu su nezasićene hidroksilne masne kiseline, sa ciklopentanskim prstenom i 20 ugljenikovih atoma. Arahidonska kiselina je prekursor za sintezu prostaglandina, koji su važni za reproduktivne procese, $\text{PgF}_{2\alpha}$ i prostaglandin E_2 (PGE_2).

Prostaglandin $\text{PgF}_{2\alpha}$ i njegovi sintetski analozi koriste se u regulaciji polnog ciklusa krava poslednjih 30-ak godina. Efekat davanja prostaglandina zavisi od stadijuma ciklusa u kom se aplikuju, tj. faze razvoja žutog tela. Žuto telo reaguje na davanje prostaglandina od 5. (junice), tj. 7. dana (krave) polnog ciklusa do 17. dana, kada kreće spontana luteoliza od strane endogenih prostaglandina poreklom iz endometrijuma, što znači da je neopravdano aplikovati hormon u periodu do 5. dana i posle 17. dana ciklusa. Pojava estrusa nakon davanja prostaglandina ili njegovih analoga zavisi od stadijuma razvića dominantnog folikula u trenutku aplikacije hormona. Ako se preparat aplikuje u vreme rasta dominantnog folikula prvog folikularnog talasa, može se očekivati pojava ovulacije za 2–3 dana. Međutim, ako se preparat aplikuje u kasnijoj (tzv. „plato“) fazi, kada je folikul izgubio svoju dominantnost, ovulacija se može očekivati tek posle 4–5 dana, kada se iz

drugog folikularnog talasa izdvoji dominantni folikul, koji će i ovulirati.

Postoji nekoliko protokola koji se danas koriste u cilju indukcije i sinhronizacije estrusa davanjem prostaglandinskih preparata i baziraju se na jednom ili višekratnom aplikovanju ovih hormona.

JEDNOKRATNO DAVANJE PROSTAGLANDINA

Ovaj metod aplikacije prostaglandinskih preparata se najčešće koristi u praksi. Podrazumeva davanje hormona samo onim kravama kod kojih je na jajniku kliničkim pregledom ili ultrazvukom, merenjem koncentracije progesterona u mleku (> 2 ng/ml) ili u krvi (> 5 ng/ml) ustanovljeno funkcionalno žuto telo. Prednosti ove metode ogleđaju se u ekonomičnosti i velikom broju plotkinja koje posle 5–7 dana intenzivnog praćenja ulaze u estrus i bivaju osemenjene. Međutim, 30% plotkinja ne uđe u očekivani estrus posle aplikacije hormona.

DVOKRATNO DAVANJE PROSTAGLANDINA

Plotkinjama kod kojih nije primećen estrus nakon prve injekcije prostaglandina vrši se aplikacija druge doze u razmaku od 11 do 14 dana. Sve krave koji normalno cikliraju trebalo bi od 3 do 5 dana posle druge injekcije prostaglandina da pokažu znake estrusa, bez obzira na fazu polnog ciklusa u kojoj su se nalazile nakon prve doze prostaglandina. Krave koje su dobile dve doze

prostaglandina obično imaju nešto slabiju plodnost. Jedna od često primenjenih metoda dvokratnog davanja prostaglandina vezana je i za plotkinje koje ne pokazuju znake polnog žara i istovremeno nisu gravidne 60 i više dana po porođaju. Kod njih se vrši aplikacija dve doze $PgF_{2\alpha}$ u razmaku od 11 do 14 dana i, bez obzira na vidljive znake estrusa, vrši osemenjavanje od 72 do 96 sati nakon druge injekcije prostaglandina.

VIŠESTRUKO DAVANJE PROSTAGLANDINA

Ovaj protokol podrazumeva trokratno davanje $PgF_{2\alpha}$ u razmacima od 11 do 14 dana, pri čemu se životinje prate između aplikacije hormona i vrši osemenjavanje kod plotkinja kod kojih je estrus otkriven. Plotkinje koje ne pokazuju znake estrusa ni posle treće doze $PgF_{2\alpha}$ osemenjavaju se fiksno od 70 do 80 sati nakon davanja treće doze.

Naposletku, primarni cilj davanja prostaglandina jeste indukcija estrusa i njegovo otkrivanje u tačno određenom periodu. Međutim, u ovakvim uslovima programiranog estrusa i osemenjavanja, rezultati plodnosti su za 20%–30% niži nego kod uobičajenog načina otkrivanja estrusa u zapatu. Najvažniji razlog za ovakav rezultat je taj što prostaglandini indukuju estrus, ali ne dovode do sinhronizacije rasta folikula i LH pika, što negativno utiče na plodnost.

SINHRONIZACIJA OVULACIJE KORIŠĆENJEM INJEKCIJA PROSTAGLANDINA F_{2A} (PGF_{2A}) I GONADOTROPIN RILIZING HORMONA (GnRH) U TAČNO ODREĐENO VREME – „OVSYNCH“ PROGRAM

„Ovsynch“ su razvili Pursley i Wilbank ranih 90-ih godina na Univerzitetu Wisconsin – Madison. Ciljevi prvobitnog „Ovsynch“ istraživanja bili su hormonska kontrola početka novog folikularnog talasa, kontrola životnog veka spontanog i indukovanoг žutog tela, i kontrola vremena ovulacije dominantnih folikula. Potrebne su tri hormonske injekcije kako bi se postigla sva tri cilja. Prva injekcija GnRH izaziva ovulaciju, ili luteinizaciju, ukoliko je na jajniku prisutan dominantni folikul. Dalje, ako je došlo do ovulacije, novi folikularni talas se javlja otprilike nakon 1,5 do 2 dana. Ako je faza folikularnog razvoja bila u prva tri dana spontanog folikularnog talasa, GnRH ne dovodi do ovulacije. Novoindukovani talas ili spontani talas, ukoliko nije došlo do ovulacije, može se razviti, uz selekciju dominantnog folikula tokom narednih sedam dana. U to vreme, PGF_{2α} se daje radi indukcije luteolize, dovodeći do daljeg rasta i maturacije dominantnog folikula. Zatim, 48 sati kasnije, sledeća injekcija GnRH indukuje talas LH, koji pokreće ovulaciju oko 24 sata nakon tretmana sa GnRH, što je i optimalno vreme za veštačko osemenjavanje. Kod junica je postignuta slaba sinhronizacija

kada su tretirane „Ovsynch“ programom (50%–60%) zbog bržeg toka folikularnih talasa i ranije atrezije dominantnog folikula. Veći broj junica samim tim ima kraći lutealni ciklus i nego junice koje nisu bile uključene u program, najverovatnije zbog nedovolje stimulacije gonadotropinima i nastankom žutog tela sa skraćenom perzistencijom.

Postoji više modifikacija „ovsynch“ programa, kao što je Co-Synch, Pre-Synch, Select-Synch, Hibrid-Synch.

Co-Synch modifikacija podrazumeva aplikaciju prve doze GnRH 0. dana, zatim PgF_{2α} 7. dana i druge doze GnRH uz osemenjavanje 10. dana. Glavna prednost ovog protokola je precizna sinhronizacija estrusa, pri čemu veliki broj plotkinja pozitivno odgovori na tretman, uključujući i plotkinje koje ne pokazuju znake estrusa ni 30 dana posle porođaja.

Pre-Synch modifikacija podrazumeva aplikaciju dve doze PgF_{2α} u razmaku od 14 dana pre započinjanja klasičnog „Ovsynch“ programa u cilju postizanja odgovarajućeg ovulatornog odgovora na prvu dozu GnRH, praćenog nastankom novog folikularnog talasa. Ova modifikacija ima za cilj da se većina krava nakon presinhronizacije nalazi u fazi diestrusa (5–12. dana ciklusa) u momentu aplikacije prve doze GnRH.

Select-Synch modifikacija podrazumeva jednokratno davanje GnRH 0. dana i aplikaciju PgF_{2α} 7. dana kod krava koje nisu u međuvremenu osemenjene. Najvažnija prednost ove

modifikacije ogleда se u ekonomičnosti i istovremeno manjem radu sa životinjama jer samo dva puta je potrebno aplikovati hormone, za razliku od Ovsynch ili Pre-Synch programa. Međutim, potrebno je duže vreme opservacije životinja u cilju otkrivanja estrusa.

HCG-Synch je modifikacija koja je vrlo slična Ovsynch programu, ali umesto druge doze GnRH aplikuje se humani horioni gonadotropin (hCG). Optimalno vreme za osemenjavanje je od 17 do 24 časa nakon aplikacije hCG.

PRIMENA PROGESTAGENA U SINHRONIZACIJI ESTRUSA KRAVA – PROGRAMI CRESTAR I CIDR

Progestageni u kombinaciji sa prostaglandinima i GnRH/ eCG, hCG utiču i na funkciju žutog tela i na folikularnu dinamiku. Regresiju žutog tela omogućava kombinacija gestagena sa luteolitičkim faktorima, aplikacijom estrogena na početku tretmana i aplikacijom $\text{PgF}_{2\alpha}$ na kraju tretmana u okviru CRESTAR programa. CRESTAR program predstavlja aplikaciju supkutanih implantata na bazi 3 mg norgestometa uz parenteralno davanje 2 ml Crestar injekcije na bazi 5 mg estradiol valerata. Kod mlečnih krava, 48 sati pre vađenja implantata aplikuju se prostaglandini. Nakon 9–10 dana, vrši se vađenje implantata i aplikacija eCG. Doza eCG zavisi od starosti životinje, sezone, dužine servis perioda itd. Kombinacija ove dve komponente skraćuje lutealnu fazu na jajniku ako je tretman

započeo u ranoj fazi ciklusa i prouzrokuje ovulaciju i luteinizaciju svakog LH-senzitivnog folikula na jajniku u vreme aplikacije i na taj način sprečava nastanak perzistentnog folikula. U isto vreme, Norgestomet izaziva supresiju estrusa i ovulaciju, inhibirajući sintezu hormona u hipofizi. Ovaj protokol karakteriše fiksno vreme osemenjavanja bez otkrivanja estrusa. Kod krava, osemenjavanje se vrši 56 sati nakon vađenja implantata, a kod junica nakon 48 sati.

Jedan od najčešće korišćenih i najprofitabilnijih programa za sinhronizaciju estrusa u svetu je CIDR (kontrolisano unutrašnje oslobađanje hormona) program. On podrazumeva ubacivanje plastičnog implantata natopljenog progesteronom (1,38 gr) u vaginu plotkinje, gde se preko sluznice vagine dalje resorbuje. Na taj način produžava se lutealna faza na jajnicima kod svih tretiranih plotkinja i sprečava da uđu u estrus. Osnovni CIDR protokol podrazumeva aplikaciju implantanta u vaginu u trajanju od sedam dana. Na 24 časa pre vađenja implantata aplikuje se $\text{PgF}_{2\alpha}$. Pojava estrusa može se očekivati za 3–4 dana nakon vađenja CIDR implantata.

LITERATURA

1. Bleach E. C. L., Glencross R. G., Knight P. G. (2004): *Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles*. Reproduction 127: 621–9.

2. Cavalieri J., Hepworth G., Fitzpatrick L. A. (2005): *Synchronising oestrus with oestradiol benzoate after using a twodoseprostaglandin treatment to synchronise luteolysis in dairy heifers*. Aust Vet J 83: 91–6.
3. Cavalieri J., Hepworth G., Fitzpatrick L. A., Shepard R. W., Macmilan K. L. (2006): *Manipulation and control of the estrous cycle in pasture based dairy cows*, Theriogenology 65; 45–64.
4. DeJarnette, J. M., Day M. L., House R. B., Wallace R. A., and Marshall C. E. (2001): *Effect of GnRH pretreatment on reproductive performance of postpartum suckled beef cows following synchronization of estrus using GnRH and PGF J. Anim. Sci. 79: 1675–1682.*
5. Dogan I., Konyali A., Tolu C., Yurdak S. (2008): *Diferent estrous protocols during the transiation period in lacting turkish does following AI*, Acta Veterinaria (Beograd) 58: 259–266.
6. Herlihy M. M., Berry D. P., Crowe M. A., Diskin M., Butler S. T. (2011): *Evaluation of protocols to synchronize estrus and ovulation in seasonal calving pasture-based dairy production systems J. Dairy Sci 94: 4488–4501.*
7. Rivera H., Lopez H., Fricke P. M. (2004): *Fertility of Holstein Dairy Heifers after Synchronization of Ovulation and Timed AI or AI after Removed Tail Chalk*, J. Dairy Sci. 87: 2051–2061.
8. Rivera H., Lopez H., Fricke P. M. (2005): *Use of Intravaginal Progesterone-Releasing Inserts in a Synchronization Protocol before Timed AI and for Synchronizing Return to Estrus in Holstein Heifers*, J. Dairy Sci 88: 957–968.



DOI: 10.7251/VJRS1302161V

UDK 619:616.34-007.272

Југослав Васић,¹ Синиша Гатарић,² Драгиша Урошевић¹

ИЛЕУС

Кратак садржај

Елиминација симпатичке инервације црева смањује и превенира илеус. Електролити се губе у лумен црева – Na, K, Cl. Губитак K доприноси настанку илеуса. Нормални ниво K је есенцијалан за синтезу ацетил-холина (скелетни нервни завршеци луче ацетил-холин; преганглијски неурони симпатикусног и парасимпатикусног система такође луче ацетил-холин, а постганглијски неурони симпатикуса луче и ацетил-холин, али велика већина – норадреналин). Симптоми: повраћање, анорексија, гасови и течност у цревима, уз одсуство бола. Третман је тежак, превенција се препоручује, исправна хируршка техника; третман перитонитиса; течност и електролити (K!); антихолинестераза препарати (неостигмин) или холинергици (бетанекोल-хлорид); пантотенска киселина – есенцијални део коензима А – учествује у синтези ацетил-холина. Метоклопрамид – антиеметик, контракције, пражњење желуца, помаже контракције глатке мускулатуре.

Кључне речи: илеус, пас, мачка.

Jugoslav Vasić,¹ Siniša Gatarić,² Dragiša Urošević¹

ILEUS

Abstract

Electrolytes are lost in the intestinal lumen – Na, K, Cl. Loss of K contributes to the development of ileus. Normal level of K is essential for the synthesis of acetylcholine (skeletal nerve endings secrete acetyl choline; preganglionic sympathetic neurons and parasympathetic system also secrete acetyl choline, and postganglionic sympathetic neurons secrete and acetyl choline but the vast majority – nora-

¹ Катедра за хирургију, офталмологију и ортопедију, Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду.

² Вет. станица, Прњавор, Република Српска.

drenaline). Symptoms: vomiting, anorexia, gases and liquids in the intestine with the absence of pain. Treatment is difficult, prevention is recommended, proper surgical technique; treatment of peritonitis; fluid and electrolytes (K!) anti-cholinesteric preparations (neostigmine) or cholinergic (bethanechol chloride), pantothenic acid – an essential part of coenzyme A – in the synthesis of acetyl choline. Metoclopramide – antiemetic, contraction, gastric emptying, helping the contraction of smooth muscles.

Keywords: ileus, dog, cat.

УВОД

Илеус је обољење које се карактерише неадекватном перисталтиком и обично обухвата цео гастроинтестинални тракт. Губитак нормалне гастроинтестиналне покретљивости најчешће је последица интраабдоминалних операција, али може бити и последица других обољења, која немају везе са перитонеалном дупљом. Најчешће се јавља код операција на цревима или инфекције перитонеума. Црева нису парализована, али перисталтика је изгубљена. Црева се брзо пуне гасом и течношћу и смањује се апсорпција из тих разлога. Сматра се да је илеус рефлексни феномен посредован симпатикусом.

МЕТОДЕ РАДА

Опструкција црева се разматра и процењује зависно од места где је лумен опструисан, као и од комплетности, тј. степена сметњи у интестиналном крвотоку. Подела опструкција је извршена у зависности од нивоа дела црева који је захваћен, као и од

тога да ли је потпуно или непотпуно дошло до опструисања лумена на:

1. проксимална проста опструкција танких црева,
 2. дистална проста опструкција танких црева,
 3. странгулациона опструкција танких црева,
 4. парцијална опструкција танких црева,
 5. опструкција колона.
1. Код комплетне проксималне опструкције танких црева обухваћени су пилорус и дуоденум, карактеристичан симптом је константно повраћање и угинуће за 3–4 дана због значајног губитка течности и електролита.
 2. Код комплетне дисталне опструкције танких црева захваћени су јејунум и илеум, а време преживљавања је 5–7 дана, са налазом црева која су пуна гаса и течности, а главни узрок угинућа је токсемија (слика 1).

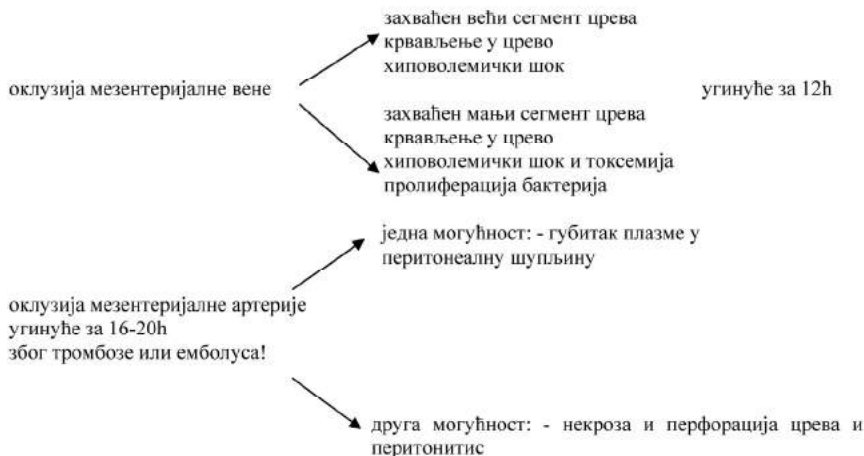
Слика 1.



3. Странгулациона опструкција црева настаје код торзије мезентеријума, инкарцерације црева у херније, инвагинације црева (код које нема опструкције лумена) са последичним поремећајем у снабдевању црева крвљу. Специфичност мезентеријалних вена су тањи зидови и зато су много осетљивије на оклузију од артерија (експериментално лигирање венске

дренаже сегмента црева доводи до угинућа за 12 сати, поготову ако је тај сегмент већи). У разматрању патофизиолошког супстрата код странгулационе опструкције, обавезно је узети у обзир дужину сегмента црева који је захваћен овим процесом, као и да ли је компромитована венска или артеријска циркулација (слика 2).

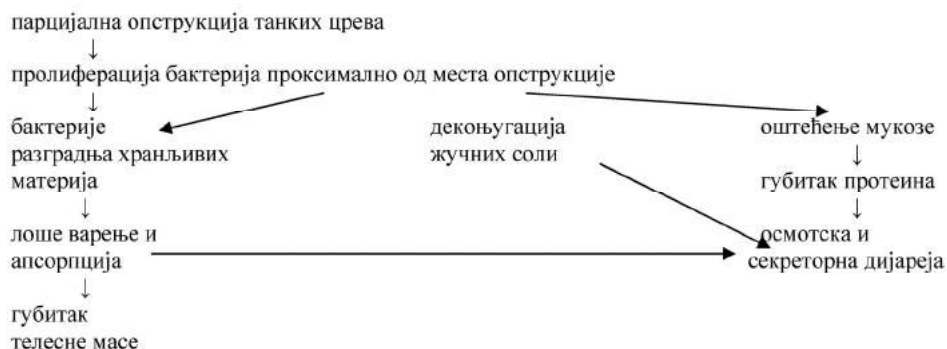
Слика 2.



4. Парцијална опструкција танких црева настаје због страног тела, неоплазме, увраћања црева. Карактерише се дијарејом и губитком телесне масе због раста бактерија проксимално од места опструкције јер је онемогућена елиминација (чишће-

ње) бактерија ка дебелом цреву тако да оне изазивају отежано апсорбовање угљених хидрата, протеина и витамина, оштећују зид црева – мукозу и доводе до деконјугације жучних соли (слика 3).

Слика 3.



Свака врста опструкције црева мора да се хируршки збрине у смислу лапаротомије и ентеротомије, што подразумева оперативни захват уз примену опште анестезије, поштовање кливажних површина, начина шивења, правилног избора шавова, као и постоперативног третмана.

На Клиници за хирургију Факултета ветеринарске медицине у Београду, већина ових захвата изводи се у општој инјекционој анестезији – балансирана анестезија (атропин-сулфат, ацепромазин, кетамин-хидрохлорид). Прилаз абдомену је извођен преко беле линије, након чега је онај сегмент

црева на коме се налази процес био екстраабдоминално позициониран да би се рез пласирао лонгитудинално на здравом – неизмењеном делу зида црева. За шивење црева коришћен је ресорптивни синтетички материјал (PGA или PDS) са атрауматском иглом, Лембертовим шавом. У постоперативном периоду апликована је антибиотска терапија и парентерална исхрана у трајању од 48 до 72 сата.

РЕЗУЛТАТИ

Код 93% оперисаних паса и мачака није било никаквих постоперативних компликација. Код једног пса дошло је, другог дана после операције, до испа-

дања црева и његовог угинућа, а код неколико пацијената смо имали развој постоперативне херније које су у другом акту хируршки саниране. Од постоперативних компликација честа је била и појава едема на месту инцизије.

ДИСКУСИЈА

Благовремена дијагностика представља есенцијални део успеха код илеуса. То подразумева клинички преглед, анализе крви, рендгенска и ултразвучна претрага, јер је златно време за оптималну санацију проблема 12–24 сата јер у противном долази до развоја иреверзибилних процеса у зиду црева. За успешан оперативни и постоперативни ток обавезно је успоставити венску линију и апликовати инфузиону терапију – парентералну исхрану. Анестезија мора бити примерена патофизиолошким збивањима – хиповолемија, поремећај функције органа и органских система (јетра, бубрези, срце, плућа...), развој шока (хиповолемички, токсички...). За правилне процесе зарастања рана неопходно је обезбедити све услове асепсе и антисепсе, влажење и лаважу ткива, као и одговарајуће шавне материјале и технике шивења у зависности од врсте ткива. У постоперативном периоду парентерална исхрана се спроводи 24–48 часова, а након тога почиње се оброчно давање воде и течне хране.

ЗАКЉУЧЦИ

Надокнада течности и електролита (K!), антихолинестеразни препарати (неостигмин) или холинергици (бета-некол-хлорид); пантотенска киселина – есенцијални део коензима А који учествује у синтези ацетил-холина, као и метоклопрамид – антиеметик, који контракције и пражњење желуца усмерава каудално, омогућавају решавање проблема функционалног илеуса, а хируршки третман опструкције страним телима, инвагинације и инкарцерације дају веома добре шансе за успешну санацију наведених процеса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Slater, D. (1993): *Textbook of small animal surgery*. Second Edition. W.B: Saunders Company.
2. Šijački N., Jablan-Pantić O., Pantić V. (1997): *Morfologija domaćih životinja*. Peto izdanje. Beograd.
3. Bojrab M. J., Renegar W. R. (1981): *The ear: Pathophysiology in Small Animal Surgery*. Philadelphia, Lea & Febiger.
4. Agrodnia M., Hauptman J., Walshaw R. (2003): *Use of atropine to reduce mucosal eversion during intestinal resection and anastomosis in the dog*. Vet Surg. 32, 365.
5. Coolman B. R., Ehrhart N., Manfra Marretta S. (2000): *Healing of intestinal anastomoses*. Compend Cont Educ Pract Vet 363.

6. Kim J. S., Jeong S. W., Kim J. Y. et al.: (2003): *A comparison of three suture techniques on adhesion in end-to-end intestinal anastomosis in dogs.* J Vet Clin. 20.
7. Kirpensteijn J., Maarschalkerweerd R. J., van der Gaag I. et al. (2001): *Comparison of three closure methods and two absorbable suture materials for closure of jejunal enterotomy incisions in healthy dogs.* Vet Quart. 23: 67.
8. Tomlinson J., Blikslager A. (2003): *Role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in gastrointestinal tract injury and repair.* J Am Vet Med Assoc. 222, 946.



DOI: 10.7251/VJRS1302167B

UDK 637.07:637.56

Милан Ж. Балтић,¹ Марија Бошковић,¹ Наташа Павлићевић,² Весна Ђорђевић,³ Славен Грбић,⁴ Радмила Марковић,¹ Милица Тодоровић¹

КОНТРОЛНЕ МЕРЕ ТОКОМ МАНИПУЛАЦИЈЕ И ПРОЦЕСА ОБРАДЕ МЕСА РИБЕ У ЦИЉУ ПРЕВЕНЦИЈЕ ЗООНОТСКИХ ПАРАЗИТОЗА

Кратак садржај

Последњих година, као последица глобализације и промена културолошких и кулинарских навика становништва, забележен је пораст броја људи инфицираних паразитима услед конзумације сировог или недовољно температурно обрађеног рибљег меса. Евисцерација рибе брзо након улова, као и адспекција и преглед меса пре пуштања у промет или пре конзумације представљају превентивне мере. Међутим, уколико се паразити ипак појаве у месу, постоје бројни хемијски и физички третмани које убијају паразите и након којих месо постаје безбедно за употребу. Поред стандардних, постоје и експерименталне методе за инактивацију паразита, као што је употреба електричне струје ниског напона или неконвенционални, традиционални начини, као што је употреба зачина.

Кључне речи: паразити, риба, безбедност, превентивне мере.

¹ Др Милан Ж. Балтић, редовни професор, Марија Бошковић, др вет. мед., истраживач сарадник, др Радмила Марковић, доцент, Милица Тодоровић, др вет. мед., истраживач сарадник, Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Булевар ослобођења 18, 11000 Београд.

² Др Павлићевић Наташа, научни сарадник, ВСИ, Суботица.

³ Др Ђорђевић Весна, научни сарадник, Институт за хигијену и технологију меса, Београд.

⁴ Славен Грбић, др вет. мед., „Славен“ д.о.о. Бањалука.

Milan Ž. Baltić,¹ Marija Bošković,¹ Nataša Pavličević,² Vesna Đorđević,³ Slaven Grbić,³ Radmila Marković,¹ Milica Todorović¹

CONTROL MEASURES OF HANDLING AND PROCESSING RAW FISH MEAT IN ORDER TO PREVENT FISH BORNE PARASITIC ZONOSSES

Abstract

In the last few years, as a result of globalisation and changes in cultural habits and culinary practices there has been noted increasing in the number of parasitic infection in people caused by consumption of raw or undercooked fish meat and fishery products. Evisceration of fish soon after catching, adspsection and control of fish meat before the consumption are preventing measures. If there are parasites in fish tissue they can be killed by using physical or chemical treatments. Moreover, there are some experimental methods such as low voltage current or non conventional, traditional method like using some vegetable products.

Key words: parasites, fish, food safety, control measures.

УВОД

Некада повезиване углавном са азијским земљама, зоонотске паразитозе преносиве месом рибе данас представљају значајан проблем и све већу опасност по здравље људи. Ширењу паразитских инфекција доприносе неке природне промене, као што је феномен глобалног загревања (Macrogliese, 2001), али подједнак значај има и антропогени утицај. Глобализација, развој саобраћаја, технологије и туризма пружа различите могућности, чинећи, с једне стране, живот лакшим и занимљивијим, а с друге стране по-

већава ризик од преношења не само паразитских, већ и инфекција изазваних другим биолошким агенсима и њихове интродукције у подручја за која нису карактеристични и у којима не представљају ендемске врсте (Chai и сар., 2005; Dorny и сар., 2009). На ширење паразитских инфекција утичу промене културолошких навика и све већа популаризација азијске кухиње, чија се традиционална јела базирају на употреби сировог или недовољно температурно обрађеног рибљег меса које представља не само с нутритивног аспекта вредну намирницу, већ и потенцијални ризик за пренос парази-

та, од којих највећу опасност представљају хелминти (Dorny и сар., 2009; Nawa и сар., 2005). У циљу превенције паразитских инфекција преносивих месом рибе користи се велики број превентивних мера, како током примарне обраде рибе и пре стављања у промет, тако и током обраде меса рибе (Балтић и сар., 2005; EFSA 2010).

ПРЕВЕНТИВНЕ МЕРЕ

Месо рибе представља потенцијални извор паразита и опасност по здравље људи уколико је уловљена у водама које су фекално контаминиране, ако није смрзнута и ако није намењена топлотној обради пре конзумирања, а концентрације соли су недовољне да се убију паразити (FDA 2001). Примарна обрада рибе има велику улогу у превенирању паразитских инфекција. Наиме, правовремена и правилна евисцерација и прање рибе спречавају миграцију ларви паразита у мишићно ткиво (FDA 2001; Балтић и сар., 2005). У циљу детекције паразита и њихових развојних облика представљања рибе у промет или конзумирања користе се различите технике као што су адспекција, компресија са просветљавањем, вештачка дигестија, микроскопија, молекуларне технике, пре свега PCR, и имунолошки тестови (Балтић и сар., 2005; Orlandi и сар. 2002). Неретко се дешава да због недостатка или неспецифичности неке од метода, а и људске грешке, паразити не буду детектовани и оваква риба буде дистрибуирана на тржиште. Ипак, у процесу производње и прера-

де рибе постоји велики број физичких и хемијских метода које инактивишу паразите уколико су присутни у месу и спречавају инфекцију потрошача.

ХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ ЗА ОНЕСПОСОБЉАВАЊЕ ИЛИ УБИЈАЊЕ ПАРАЗИТА У МЕСУ РИБЕ

Две најчешће коришћене хемијске методе за убијање паразита у месу рибе су сољење и маринирање (EFSA 2010).

Сољење

Ларве *Anisakis simplex* су осетљиве на сољење, али само под одређеним условима. Различита истраживања су показала различите резултате. Према подацима из CEVPM-a (Centre d'Expérimentation et de Valorisation des produits de la Mer), током индустријске производње довољно је 20 дана да би се убиле ларве методом сувог сољења. Студија коју је спровела AESAN (Agencia Espanola de Seguridad Alimentaria) показује да није потребно смрзавање уколико је током процеса сољења употребљена концентрација NaCl од 8% до 9% током периода од шест недеља.

За убијање развојног стадијума метацеркарије *Opisthorchis spp.* у месу рибе потребна је концентрација од 13,6% NaCl током 24 сата (EFSA 2010).

Маринирање

Маринирање представља процес потапања или премазивања меса течностима, често киселим, које представљају мешавину различитих зачина, а главну компоненту представљају сирће, лимунов сок, вино и соја сос. Улога маринирања је да се инактивишу бактерије и да се ензимима утиче на чврстину, укус, текстуру и структурне особине меса. Ниске рН вредности које утичу на бактерије често нису довољне да се убију паразити, нарочито је отпорна *Anisakis simplex* (Murrell, 2002).

Традиционалне маринаде нису довољне за инактивацију ларви и оне у њима могу остати активне и до 119 дана, у зависности од концентрације соли и сирћета, који имају синергистичко деловање, како у инактивацији бактерија, тако и у инактивацији паразита. Припрема маринаде са 12% концентрације соли и 10% концентрације сирћетне киселине у току пет дана убија ларве *A. simplex*, а сензорне особине производа остају задовољавајуће (Sanchez-Monsalvez и сар., 2005).

Ипак, маринирање није сигуран поступак и иако сирће и со имају одређену улогу у инактивацији паразита, маринирање би требало користити у комбинацији са замрзавањем (EFSA 2010; Köse, 2010).

ОСТАЛЕ ХЕМИЈСКЕ МЕТОДЕ

У многим културама зачини и биљни екстракти представљају својеврстан вид традиције и вековима се користе у припремању хране. Екстракт цинцера изолован из *Zingiber officinale*, као и неке компоненте екстраховане из лишћа *Perilla sp.* у експерименталним условима могу да убију ларве *A. simplex* (Hierro и сар., 2006; Hierro и сар., 2004).

Такође, испитују се неке хемијске супстанце из етарских уља као што су алфа-пинен, бета-пинен, цинеол, које имају потенцијал да инактивишу ларве паразита (EFSA 2010).

ФИЗИЧКЕ МЕТОДЕ ЗА ОНЕСПОСОБЉАВАЊЕ ИЛИ УБИЈАЊЕ ПАРАЗИТА У МЕСУ РИБЕ

Замрзавање

Фактори који утичу на ефикасност замрзавања да би се инактивисали паразити су температура, време које је потребно да би се постигла жељена температура у средишту производа, дужина замрзавања и садржај масти у месу рибе (AFSSA 2007). Температура и дужина замрзавања зависе и од врсте паразита којег је потребно инактивисати (Köse, 2010).

A. simplex ларве преживљавају температуре од -10°C током 4 сата, што се може објаснити и присуством трехалозе од стране паразита, која има улогу криопротектора (Wharton и

Aalders, 2002). Посматрање замрзавања рибе у комерцијалним замрзивачима који симулирају замрзиваче у домаћинствима показује да је потребно и неколико дана да би температура у свим деловима рибе достигла температуру која инактивише ларве паразита (Wharton и Aalders, 2002). У складу са регулативом ЕУ која се односи на хигијену намирница (Reg. 853/2004), замрзнута риба и производи од рибе се морају складиштити на температури од -18°C да би се инактивисале ларве *A. simplex*.

Плероцеркоид *Diphyllbothrium spp.* инактивише се на у кућним условима на температури од -18°C током најмање једног дана.

Замрзавање на температури од -10°C током пет дана инактивише метацеркарије *Clonorchis spp.* и *Opisthorchis spp.* (EFSA 2010).

У зависности од произвођача и особинам замрзивачи имају различиту могућност замрзавања, што директно утиче и на температуру и на дужину складиштења, о чему треба водити рачуна нарочито у кућним условима складиштења. Замрзивачи са једном или две звездице могу достићи температуру од -6°C и -12°C , а само замрзивачи са три или четири звездице могу омогућити замрзавање производа на температури од -18°C (Wharton и Aalders, 2002).

Примећено је да само замрзавање не мора убити све ларве и мада се претпоставља да су преживеле ларве практи-

чно непокретне и да не представљају велики ризик од инфекције, требало би због повећања безбедности замрзнуте производе одређено време складиштити у замрзнутом стању. FDA препоручује да се риба замрзава на температури од -20°C и на истој чува током седам дана, да се замрзава на -35°C и на истој температури складишти током 15 сати или да се замрзава на -35°C и складишти на температури -20°C током 24 сата (Köse, 2010).

Топлотна обрада

Студије показују да је температура од 60°C у средишту производа током 1 минута довољна да убије било коју ларву присутну у месу или производима од рибе. Време за које ће температура достићи жељену вредност у средишту производа зависи пре свега од особине самог производа (дебљина, састав). Утврђено је да филет дебљине 3 цм треба да се загрева на 60°C током 10 минута да би се инактивисале ларве паразита (Wootten и Cann, 2001). У циљу превенције паразитских инфекција, препоручује се да температура буде 60°C током најмање 1 минута за време кувања или димљења рибе или загревање на температури од 74°C најкраће 15 секунди у микроталасној пећи меса рибе које је намењено да се једе недовољно термички обрађено у јелима као што је суши (EFSA 2010; Audicana и Kennedy, 2008).

Плероцеркоиди *Diphyllbothrium spp.* не преживљавају температуру из-

над 56С°. Загревање и кување такође инактивише инфективне метацеркарије у месу рибе. Загревање на 50С° током 5 сати или на 70С° током 30 минута инактивише метацеркарије *O. viverrini* (EFSA 2010).

Димљење

Димљење је поступак приликом којег се храна излаже диму и топлоти под одређеним условима у коморама за димљење. Димљење рибе на температурама изнад 60С°, тзв. вруће димљење (обично 70С°–80С° током 3–8 сати), успешно инактивише ларве паразита (FDA/CFSAN, 2001). Приликом топлог димљења, треба водити рачуна да производ буде изложен високој температури довољан временски период (Murrell, 2002).

За разлику од врућег, током топлог, а нарочито хладног димљења (12С°–25С°) температуре нису довољно високе да би се инактивисали паразити, па се препоручује да се ова метода користи у комбинацији са замрзавањем (Köse, 2010; EFSA 2010).

Висок хидростатски притисак

Висок хидростатски притисак се показао као ефикасна техника у третирању намирница у циљу смањења броја патогених микроорганизама, као и продужења одрживости производа. Ефикасност овог, као и осталих метода зависи од различитих параметара као што су јачина притиска, дужина третмана и температура (EFSA, 2010).

Притисак од 140 МПа током 60 минута или од 200 МПа током 10 минута на 0С°–15С° убија ларве *A. simplex*. Такође, истраживања су показала да наизменични поступци компресије и декомпресије убијају ларве паразита ефикасније него константни притисак током истог временског периода (Molina-Garcia и Sanz, 2002). Ипак, дуг временски третман није практичан за индустријску производњу, а овај поступак утиче и на боју и изглед филета, што ограничава примену ове методе, нарочито ако је риба намењена потрошњи у сировом стању (Dong и сар., 2003). Међутим, постоји могућност да се ова метода користи у комбинацији са другим поступцима, као што су нпр. маринирање и хладно димљење, који нису довољни да би се инактивисали паразити, а у исто време притисак би у комбинацији са овим методама могао да буде нижи (Molina-Garcia и Sanz, 2002).

Сушење

Сушење је након сољења један од најстаријих видова конзервисања рибе. Фаворизован је јер је једноставан и не захтева компликовану опрему, а пружа производу високу одрживост (Köse, 2010). Међутим, у литератури не постоји податак који указује на било какву ефикасност ове методе у инактивацији ларви паразита, па се сушење не сматра погодном методом у те сврхе и може се користити само у комбинацији са другим ефикасним методама (EFSA 2010).

Зрачење

Зрачење под одређеним условима може да представља ефикасну меру у превенцији паразитских болести преносивих не само рибом и риблим производима, већ месом уопште (Farkas, 1998). SCF (Scientific Committee for Foods) 1986. године је предложио да доза зрачења за рибу и производе од рибе треба да буде до 3 kGy. Зрачење се примењује на свеже месо рибе, замрзнутој, као и сушеној риби и производима од рибе (EFSA 2010).

Да би се утврдила доза зрачења која је довољна за инактивацију и убијање паразита, рађени су многи експерименти, а највећи број њих рађен је на харингама које су биле инвадиране ларвама *A. simplex*. Експерименти су показали да доза зрачења мора да буде виша од 10 kGy да би се убиле ларве *A. simplex*, као и да су ларве доста отпорне на дозе зрачења од 2 до 10 kGy (Farkas, 1998; EFSA 2010). Због оваквих резултата добијених у експериментима, зрачење као метода за убијање ларви *A. simplex* се не користи јер су дозе зрачења превише и штетне по здравље људи.

Истраживања спроведена на Тајланду на сировој и полупрерађеној риби показала су да су метацеркарије *Opisthorchis viverrini* осетљиве на мале дозе зрачења и да зрачење у дози од 0,5 kGy не доводи до обољења код експерименталним путем инфицираних хрчака (Farkas, 1998). Метацеркарије *C. sinensis* су такође осетљиве на ниске дозе зрачења од 0,15 kGy (EFSA 2010).

Зрачење је ефикасна метода за убијање и инактивацију одређених врста паразита, међутим, треба водити рачуна о томе да она делује и на сензорне особине меса. У зависности од примењених доза, она може довести до дисколорације меса, промене укуса или оксидације масти. Оксидација масти током зрачења се може свести на минимум уколико се риба пакује без присуства кисеоника и уколико се додају антиоксиданси, а друге промене се могу превенирати ако се производ зрачи у замрзнутом стању (Farkas, 1998).

Употреба озона

Један од поступака који се могу користити у инактивацији неких паразита у месо рибе је и примена озона. Иако успешно инактивише *Cryptosporidium parvum*, дејство озона на паразите зависи од више фактора, као што су температура, рН вредност и количина органске материје око паразита (Orlandi и сар., 2002; Балтић и сар., 2005).

Струја ниског напона

Метода пропуштања струје ниског напона кроз месо рибе у циљу инактивисања ларви паразита патентирана је у Шпанији 2005. године. Једна или већи број риба налази се у малом базену који је испуњен раствором електролита, кроз који се пропушта струја која инактивише паразите, а не мења органолептичке особине. Међутим, ова метода је још увек у фази испитивања (EFSA 2010).

ЗАКЉУЧАК

Инактивација паразита у месу је поступак чија ефикасност зависи од многих фактора, како производа (садржај масти, дебљина и структура производа) који се обрађује, тако и фактора који се тичу саме методе (температура, време експозиције). За сада једине методе које се примењују са високим нивоом сигурности су замрзавање и примена високих температура (кување, печење, пржење). С обзиром на то да паразити риба представљају све распрострањенију биолошку опасност по становништво, научници раде на усавршавању недовољно ефикасних метода, као и на развијању нових.

ЛИТЕРАТУРА

1. AFSSA (2007): *Opinion of the French Food Safety Agency (AFSSA) on a risk assessment request concerning the presence of anisakidae in fishery products and the extension of the exemption from the freezing sanitary obligation of fishery products whose feeding is under control and for certain species of wild fish*. Request no. 2007-SA-0379.
2. Audicana M. T., Kennedy M. W., (2008): *Anisakis simplex: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity*. Clin Microbiol Rev 21, 360–379, table of contents.
3. Балтић Ж. М., Наташа Килибарда, Теодоровић В., Мирјана Димитријевић, Карабасил Н. (2005): *Паразити риба и здравље људи*. II међународна конференција „Рибарство“, Пољопривредни факултет Универзитета у Београду, 10–12 фебруар, 155–166.
4. Chai J., Murrell K. D., Lymbery J. A., (2005): *Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues*. International Journal for Parasitology, 35, 1233–1254.
5. Dong F. M., Cook A. R., Herwig R. P., (2003): *High hydrostatic pressure treatment of finfish to inactivate Anisakis simplex*. J Food Prot 66, 1924–1926.
6. Dorny P., Praet N., Deckers N., Gabriel S. (2009): *Emerging food-borne parasites*. Veterinary Parasitology 163, 196–206.
7. EFSA (2010): *Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products*. EFSA Journal; 8(4): 1543, 1–89.
8. Farkas J. (1998): *Irradiation as a method for decontaminating food*. International Journal of Food Microbiology, 44, 189–204.
9. FDA (2001): *Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guidance*. 3rd Edition. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, DC, USA.
10. FDA/CFSAN, U. (2001): *Processing Parameters Needed to Control Pathogens*

- in Cold Smoked Fish*. Administration USFaD, Nutrition CfFSaA (eds.).
11. Hierro I., Valero A., Navarro M. C. (2006): *In vivo larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of Anisakis simplex s.l.* Phytomedicine 13, 527–531.
 12. Hierro I., Valero A., Perez P., Gonzalez P., Cabo M.M., Montilla M.P., Navarro M.C. (2004): *Action of different monoterpenic compounds against Anisakis simplex s.l. L3 larvae*. Phytomedicine 11, 77–82.
 13. Köse S. (2010): *Evaluation of seafood safety health hazards for traditional fish products: preventive measures and monitoring issues*. Turkish journal of fisheries and aquatic sciences, 10, 139–160.
 14. Marcogliese J. D. (2001): *Implications of climate change for parasitism of animals in the aquatic environment*. Can. J. Zool. 79, 1331–1352.
 15. Molina-Garcia A. D., Sanz P. D. (2002): *Anisakis simplex larva killed by high-hydrostatic pressure processing*. J.Food Prot. 65, 383–388.
 16. Murrell K. D. (2002): *Fishborne zoonotic parasites: epidemiology, detection and elimination. Lactic acid bacteria in fish preservation*. In: H.A. Bremner (Ed), *Safety and quality issues in fish processing*. Woodhead Publishing Ltd. CRC pres, New York: 114–141.
 17. Nawa Y., Hatz C., Blum J. (2005): *Sushi Delights and Parasites: The Risk of Fishborne and Foodborne Parasitic Zoonoses in Asia*. Clinical Infectious Diseases, 41, 1297–1303.
 18. Orlandi P. A., Chu D-M. T., Bier J. W., Jackson G. J. (2002): *Parasites and the Food Supply*. Food Technology, 16, 72–81.
 19. Sanchez-Monsalvez I., de Armas-Serra C., Martinez J., Dorado M., Sanchez A., Rodriguez-Caabeiro F. (2005): *A new procedure for marinating fresh anchovies and ensuring the rapid destruction of Anisakis larvae*. J Food Prot 68, 1066–1072.
 20. Wharton D. A., Aalders O. (2002): *The response of Anisakis larvae to freezing*. J Helminthol 76, 363–368.
 21. Wootten R., Cann D. C. (2001): *Round worms in fish Marine Laboratory of the Department of Agriculture and Fisheries for Scotland and the Torry Research Station of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*.

PROBIOTSKI STATUS BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

Kratak sadržaj

Probiotici se definišu kao živi mikroorganizmi koji, kada se unesu, pokazuju blagotvoran efekat na domaćina. Mnogi sojevi iz roda *Lactobacillus* imaju status probiotika. Nedostatak gena za prenošenje rezistencije na antibiotike jedan je od ključnih uslova kako bi soj dobio GRAS status. Svaki probiotički soj bi trebalo da preživi pasažu kroz gastrointestinalni trakt, kako bi uspeo da ostvari blagotvorne efekte po domaćina.

Materijal za ovo ispitivanje predstavljao je 51 soj laktobacila koji su izolovani iz sjeničkog sira.

Svi sojevi su ispitivani na rezistenciju na devet antibiotika. Od ukupno 51 soja, šest je pokazalo osetljivost na sve antibiotike, dok je 23 pokazalo prirodnu rezistenciju, koja, kao takva, nije rizična za prenošenje gena. Najčešći profil rezistencije bila je rezistencija na vankomicin i tetraciklin. Od 18 sojeva koji su stekli uslove za dalje ispitivanje, kod devet njih je ispitivana mogućnost preživaljavanja u simuliranim uslovima želuca, odnosno duodenuma. Takođe je ispitivana i antimikrobna aktivnost i sposobnost hemolize. Svih devet sojeva je pokazalo odličnu sposobnost preživanja u simuliranim uslovima želuca, dok je svega tri moglo da preživi u prisustvu žučnih soli. Svih devet sojeva je pokazalo antimikrobnu aktivnost protiv *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*, a nijedan nije pokazao hemolizu.

Prema rezultatima u ovom ispitivanju, sojevi laktobacila izolovani iz sjeničkog sira pokazali su da imaju potencijal da steknu status probiotika, ali su za to potrebna dalja ispitivanja.

Ključne reči: probiotik, laktobacili, kriterijumi selekcije.

¹ Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18.

UDK 616-78:547.472.3

T. Ledina, Z. Mijačević, S. Bulajić, M. Babić²

STATUS OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA

Abstract

Probiotics are live microorganisms that exhibit a beneficial effect on the health of the host when ingested. Many strains of lactic acid bacteria from *Lactobacillus* genus are recognized as probiotics. Absence of transferable genes for antibiotic resistance is crucial so that probiotic strain can acquire GRAS status. Also every probiotic should survive conditions in digestive tract.

Material for this research was 51 strain of *Lactobacillus* spp. isolated from traditional cheese from Sjenica.

All strains were analyzed for resistance to 9 different antibiotics – 6 of them showed susceptibility to all antibiotics, while 23 showed profile of intrinsic antibiotic resistance. Most common resistance profile was resistance to vancomycin and tetracycline. For further research, 9 strains were chosen, and they were analyzed for viability in simulated gastric and duodenal conditions, antimicrobial activity and hemolysis. All strains showed excellent survival in simulated gastric conditions, while only 3 of them could survive in presence of bile salts. All 9 strains showed antimicrobial activity toward *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*; none of them showed hemolysis on agar.

According to these results, strains of lactobacilli from Sjenica cheese have potential for becoming probiotics, but it requires further research.

Key words: probiotic, lactobacilli, selection criteria.

² Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Bulevar oslobođenja 18.

UVOD

Koncept funkcionalne hrane poznat je još iz doba Hipokrata, koji je tvrdio da „hrana treba da bude lek“ (Vasiljević i Shah, 2008). Funkcionalna hrana je ona hrana koja, pored adekvatnih nutritivnih efekata, ima povoljne efekte na ciljne funkcije u organizmu značajne sa aspekta poboljšanja zdravlja i blagostanja, i/ili za smanjenje rizika od bolesti.

U konceptu funkcionalne hrane, naročito u industriji proizvoda od mleka, raste interesovanje za probiotske proizvode koji sadrže bakterije mlečne kiseline koje vode poreklo iz gastrointestinalnog trakta. Probiotici se mogu definisati kao živi mikroorganizmi koji imaju blagotvoran efekat na zdravlje domaćina kada se unesu u organizam u adekvatnoj količini, a poseban značaj među njima imaju sojevi *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. (World Gastroenterology Organization – WGO, 2009). Važna osobina probiotika je zaštita od patogenih mikroorganizama u digestivnom traktu domaćina, što se postiže zahvaljujući produkciji antimikrobnih komponenti. Njihova uloga u borbi protiv crevnih infekcija je potvrđena i do-

kumentovana u mnogim istraživanjima (Kos i sar., 2008; Frece i sar., 2009; Saulnier i sar., 2009).

Postoji veliki broj vrsta i sojeva bakterija mlečne kiseline, ali ne mogu se sve one nazvati probioticima. Brojni su kriterijumi prema kojima se vrši selekcija probiotskih kultura, ali postoje tri osnovna bez kojih ne može da se pristupi nijednom narednom koraku u selekciji. Da bi mikroorganizam bio kandidat za probiotik, osnovni uslovi su:

1. da bude normalni stanovnik gastrointestinalnog trakta,
2. da ne bude patogen,
3. da je sposoban da kolonizuje creva u visokim koncentracijama 10^7 – 10^9 CFU/ml (Mattila-Sandholm i sar., 2002; FAO/WHO, 2002).

Dalji kriterijumi na osnovu kojih se vrši selekcija probiotika podeljeni su na bezbednosne tehnološke, funkcionalne kriterijume i kriterijume koji se tiču poželjnih fizioloških svojstava. Njihova klasifikacija prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Kriterijumi i svojstva za selekciju probiotika (Shah, 2006; Morelli, 2007)

Kriterijum	Svojstvo koje se ispituje
Bezbednosni	Poreklo
	patogenost i infektivnost
	rezistencija na antibiotike
	faktori virulencije – toksičnost, metabolička aktivnost
Tehnološki	genetička stabilnost soja
	vijabilnost tokom proizvodnje i čuvanja
	dobra senzorna svojstva

Funkcionalni	rezistencija na bakteriofage
	proizvodnja u velikim količinama
	tolerancija na kiselu sredinu u želucu
	tolerancija na prisustvo žučnih soli
	adhezija na površinu mukoze
Poželjna fiziološka svojstva	potvrđeni i dokumentovani efekti na zdravlje
	imunomodulacija
	antagonistička aktivnost protiv gastrointestinalnih patogena
	uticaj na metabolizam holesterola
	uticaj na metabolizam laktoze
	antimutagena i antikancerogena svojstva

Brojni naučni radovi naglašavaju značaj pažljive selekcije mogućih probiotičkih sojeva bakterija mlečne kiseline. Kriterijumi selekcije su postavljeni, pre svega, u odnosu na bezbednost probiotika, ali ništa manje važni nisu ni tehnološki, odnosno funkcionalni zahtevi.

Cilj ovog rada jeste karakterizacija izolovanih sojeva laktobacila u odnosu na njihov probiotski status. Svi sojevi su izolovani iz tradicionalnih sireva poreklom iz okoline Sjenice, koji su pravljeni od sirovog mleka.

MATERIJAL I METODE

Materijal

Materijal za rad u ovom istraživanju predstavljao je 51 soj laktobacila izolovanih iz tradicionalnih sireva od sirovog mleka sa područja Sjenice.

Metode

Test osetljivosti/ rezistencije na antibiotike – disk-difuzioni test (*disc diffusion test*). Osetljivost, odnosno rezistencija izolovanih sojeva laktobacila na antibiotike, ispitivana je pomoću disk-

difuzione metode, s time da su korišćeni BBL diskovi impregnirani odgovarajućim antibiotikom (BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs, Becton, Dickinson & Company). Testirana je osetljivost na devet različitih antibiotika: ampicilin (10μg), ciprofloksacin (5μg), eritromicin (15μg), gentamicin (120μg), hloramfenikol (30 μg), klindamicin (2μg), penicilin (10 IJ), streptomycin (10μg), tetraciklin (30μg) i vankomicin (3 μg). Nekoliko identičnih kolonija ispitivanog soja laktobacila je resuspendovano u 5 ml BHI (Brain Heart Infusion) bujona (Merck), a standardizacija suspenzije je postignuta poređenjem sa 1 McFarland standardom. Inokulacija ispitivanog soja na površinu MRS agara je izvršena primenom brisa koji se nakon potapanja u pripremljeni inokulum ravnomerno prevlači preko površine podloge. Postavljanje BBL diskova je obavljeno sterilnom pincetom. Ploče su inkubirane na 37°C/24h. Nakon inkubacije, očitane zone inhibicije (mm) interpretirane su prema Vlkova i saradnici (2006), tako da su kategoriju osetljive populacije predstavljali svi sojevi laktobacila sa zo-

nom inhibicije ≥ 21 mm, dok su sojevi sa zonom inhibicije ≤ 15 mm svrstani u rezistentnu populaciju laktobacila.

Ispitivanje sposobnosti preživljavanja u simuliranim uslovima želudačne sredine – gastro test

Za simulaciju uslova u želudačnoj sredini, korišćena je metoda „gastro test”. Napravljen je rastvor u sastavu 0,5% NaCl i 0,22% pepsina, a pH vrednost je bila podešena na 2 sa 1M HCl. Prekonoćne kulture su inokulisane u ovaj rastvor u odnosu 1:10, a zatim su stavljane na inkubaciju od 1h na temperaturi od 37°C (Radulović i sar., 2008). Po inokulisanju kulture ispitivanog soja laktobacila, kao i nakon inkubacije u trajanju od 1h, odgovarajuća serijska razblaženja su zasejavana na MRS (Merck) agar, u cilju određivanja početnog broja, kao i broja laktobacila po inkubaciji.

Ispitivanje sposobnosti preživljavanja u simuliranim uslovima u duodenumu – test žučnih soli

Kako bi se imitirali uslovi koji postoje u duodenumu, primenjen je test žučnih soli. Pripremljen je rastvor od rekonstituisanog obranog mleka u prahu, žučnih soli (0,4%) i pankreatina (0,2%). U ovako pripremljen rastvor dodavane su prekonoćne kulture ispitivanih sojeva, a zatim stavljane na inkubaciju od 1h na temperaturi od 37°C (Radulović i sar., 2008). Kao i u prethodnom testu, po inokulisanju kulture

laktobacila u pripremljeni rastvor, kao i nakon inkubacije, odgovarajuća serijska razblaženja su zasejavana na površinu MRS (Merck) agara, u cilju određivanja početnog broja i broja laktobacila sposobnih da prežive inkubaciju u trajanju od jednog časa u simuliranim uslovima duodenuma.

Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost ispitivanih sojeva laktobacila određena je u odnosu na *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 i *Staphylococcus aureus* (kolekcija Laboratorije Katedre za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla) kako bi se utvrdilo da li postoji inhibitorno dejstvo ispitivanih sojeva na navedene patogene bakterije. Korišćen je *Agar-well diffusion assay*, metod bunarčića u agaru (Tagg i Mc-Given, 1971). Prethodno pripremljen MRS agar koji se nalazio u Petrijevoj ploči prelivan je sa 5ml soft agara u koji je dodato 5 μ l kulture navedenih patogenih bakterija (prethodno inkubiranih 24h u BHI bujonu na 37°C). Na MRS agar prethodno su stavljeni sterilni nastavci za automatske pipete, promera 5mm, kako bi se formirala udubljenja kada se agar stegne. Kada je soft agar bio stegnut, nastavci su uklanjani, tako da na sredini ostane bunarčić u koji je dodavano 50 μ l supernatanta bujonske kulture ispitivanog soja laktobacila dobijenog centrifugovanjem pri 12 000 rpm (*revolution per minute*) tokom 15 minuta. Ploče su potom držane 2h na temperaturi frižidera, a zatim inkubirane 24h na 37°C. Posle tog vre-

menskog perioda, merena je zona inhibicije rasta *L. Monocytogenes* i *S. aureus* oko bunarčića u koji je dodat ispitivani soj laktobacila.

Sposobnost hemolize na krvnom agaru

Hemolitička aktivnost sojeva *Lactobacillus spp.* ispitivana je kako bi se utvrdilo da li postoji mogućnost za patogeno delovanje ispitivanih sojeva. Devet sojeva koji su izabrani na osnovu rezultata prethodnih testova, zasejano je na krvni agar i stavljeno na inkubaciju na 37°C/48h. Nakon toga, očitavani su rezultati. Prisustvo prosvetljenja, odnosno hemolize na krvnom agaru, ukazuje na hemolitičku aktivnost i time moguće patogeno delovanje ispitivanih sojeva.

REZULTATI I DISKUSIJA

Test osetljivosti/ rezistencije na antibiotike kod ispitivanih sojeva *Lactobacillus spp.*

Pitanje rezistencije mikroorganizama na antibiotike postaje sve važnije, jer se prema trenutnim saznanjima hrana smatra najvažnijim vektorom širenja antibiotske rezistencije između ljudi i životinja. Zbog toga je 2001. godine SCAN (Scientific Committee of Animal Nutrition) dobio zahtev da ispita i definiše kriterijume za procenu bezbednosti mikroorganizama koji su rezistentni na antibiotike, a koriste se kao probiotici u hranivima za životinje (EFSA 2008). Kao posledicu stečenih saznanja, SCAN je preporučio komisiji Evropske unije da u hrani za ljude i hranivima za životinje

zabrani upotrebu probiotika koji poseduju gene za rezistenciju na antibiotike, a koji imaju mogućnost transfera na druge mikroorganizme (Danielsen i Wind, 2003).

Bakterije mlečne kiseline mogu da predstavljaju prirodni rezervoar gena rezistencije na antibiotike, a u određenim uslovima oni mogu da se prenesu na patogene mikroorganizme putem lanca hrane, ili u gastrointestinalnom traktu (Bernardeau, 2008). Zbog pojave sve većeg broja patogena koji su rezistentni na antibiotike i zbog mogućnosti prenošenja te rezistencije, jedan od najvažnijih kriterijuma u odabiru potencijalnih probiotskih sojeva bakterija je njihova osetljivost na delovanje antibiotika (Bulajić i Mijačević, 2011).

U ovom radu ispitivana je rezistencija/ osetljivost laktobacila na devet odabranih antibiotika koji imaju poseban značaj u kliničkoj praksi. Korišćeni su antibiotici koji pripadaju različitim klasama: iz klase penicilina, testirana je osetljivost na penicilin i ampicilin; iz klase aminoglikozida gentamicin i streptomycin; od makrolida ispitivana je osetljivost/ rezistencija na eritromicin. Kao predstavnik klase fluorokvinolona uzet je ciprofloksacin, glikopeptidnih antibiotika vankomicin, a linkozamida klindamicin. Ispitivana je osetljivost i na tetraciklin i hloramfenikol. U tabeli 2. prikazani su profili rezistencije ispitivanih sojeva *Lactobacillus spp.*

Tabela 2. Prikaz fenotipske rezistencije ispitivanih sojeva *Lactobacillus spp.* u odnosu na odabrane antibiotike

Rezistencija na	Rezistentni sojevi laktobacila		Zastupljenost sojeva u odnosu na rezistenciju prema antibiotiku/ antibioticima* – profili rezistencije
	broj	%	
1 antibiotik	19	37,25	vankomicin (13), gentamicin (5), tetraciklin (1)
2 antibiotika	21	41,18	vankomicin+ tetraciklin (10), vankomicin+gentamicin (5), gentamicin+tetraciklin (3), penicilin+tetraciklin (1), gentamicin+ penicilin (1), vankomicin+ penicilin (1)
3 antibiotika	4	7,41	penicilin+ vankomicin+tetraciklin (3), gentamicin+tetraciklin+eritromicin (1)
4 antibiotika	1	1,96	gentamicin+penicilin+tetraciklin+eritromicin

Od 51 ispitivanog soja, šest (11,76%) je bilo osetljivo na sve antibiotike, dok je na jedan od njih rezistenciju pokazalo 19 sojeva. Postojanje multirezistencije (rezistencije na dva ili više antibiotika) zapaženo je kod 26, odnosno 50,98% sojeva.

Najveći broj ispitivanih sojeva pokazao je rezistenciju na vankomicin, bilo pojedinačno (13 sojeva), ili u kombinaciji sa još jednim ili više antibiotika (19 sojeva). Laktobacili pokazuju intrinzičnu, prirodnu rezistenciju na određeni broj antibiotika (bacitracin, cefoksitin, kanamicin, norfloksacin i druge), a među njima se nalazi i vankomicin. Ipak, ovaj vid rezistencije nije prenosiv na druge bakterije, tako da rezistencija na vankomicin u ovom radu nije posmatrana kao kriterijum za eliminaciju soja iz daljih ispitivanja, ukoliko je on bio osetljiv na sve druge antibiotike (Danielsen i Wind, 2003). Od antibiotika koji su korišćeni u ovom ispitivanju, laktobacili poseduju prirodnu rezisten-

ciju i na gentamicin (Bernardeau i sar., 2008), pa ni rezistencija na njega nije razmatrana kao uslov za eliminaciju. Izuzetno visok procenat rezistencije na vankomicin je u skladu i sa drugim ispitivanjima koja su vršena (Bulajić i Mijačević, 2011; Coppola i sar., 2005). Prema podacima Bernardeau i sarađnika (2008), striktno homofermentativni laktobacili mogu da pokazuju osetljivost na ovaj antibiotik, a samo u jednom istraživanju je i pokazana osetljivost laktobacila na vankomicin (Marud i Meriem, 2008).

Određeni broj ispitivanih sojeva (16) pokazao je rezistenciju i na gentamicin, a ovakvi rezultati se mogu naći i u literaturnim podacima (Kaktcham i sar., 2011; Bulajić i Mijačević, 2011). Pojedini literaturni podaci ukazuju na daleko veći procenat rezistencije na gentamicin od rezultata u ovom ispitivanju. U istraživanju koje su sprovedi Danielsen i Wind (2003), svi ispitivani sojevi laktobacila su pokazali visoki

nivo rezistencije na aminoglikozidne antibiotike; u istraživanju Coppola i saradnika (2005), na gentamicin je bilo rezistentno čak 98% ispitivanih sojeva. Ovakvi rezultati su u skladu sa podatkom da je i u slučaju gentamicina u pitanju intrinzična rezistencija.

Rezistenciju na tetraciklin pokazalo je 20 sojeva, uglavnom u kombinaciji sa jednim ili više drugih antibiotika, a prema literaturnim podacima radi se o stečenoj rezistenciji (Nawaz i sar., 2011), što predstavlja poseban rizik po zdravlje potrošača, jer ovaj vid rezistencije ima mogućnost transfera između bakterija.

Najveći broj ispitivanih sojeva je bio osetljiv na penicilin i eritromicin. Podaci o rezistenciji na penicilin se dosta razlikuju – postoje oni gde se navodi da su svi ispitivani sojevi laktobacila osetljivi na penicilin (Sieladie i sar., 2011; Danielsen i Wind, 2003; Nawaz i sar., 2011). U nekim istraživanjima je prevalenca rezistencije na penicilin varirala (Salminen i sar., 2006), dok je u pojedinim istraživanjima veliki broj ispitivanih sojeva laktobacila (63,16%) bio rezistentan (Bulajić i Mijačević, 2011).

U rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, samo dva ispitivana soja laktobacila su pokazala rezistenciju na eritromicin, što je u skladu sa rezultatima koje su dobili Nawaz i saradnici (2011), gde su takođe dva ispitivana soja pokazala ovaj vid rezistencije.

Nijedan od ispitivanih sojeva laktobacila nije pokazao rezistenciju na

ampicilin, ciprofloksacin, klindamicin i hloramfenikol, što je u skladu sa literaturnim podacima (Danielsen i Wind, 2003; Coppola i sar., 2005; Nawaz i sar., 2011). Ipak, postoje podaci i o visokom procentu rezistencije na ciprofloksacin kod sojeva laktobacila (Sieladie i sar., 2011).

Osetljivost na sve ispitivane antibiotike bio je preduslov da se sojevi dalje ispituju u drugim testovima (studija preživljavanja, antimikrobna aktivnost u odnosu na odabrane patogene bakterije i potencijal patogenosti usled hemolitičke aktivnosti).

Studija preživljavanja – gastro test

Ispitivanje probiotskih svojstava određenih bakterija podrazumeva da se uvek govori o živim mikroorganizmima (WGO, 2009). Kako bi se ovaj uslov ispunio, neophodno je da probiotske kulture pasiraju gastrointestinalni trakt u određenom broju kao žive ćelije. Prvi celularni stres koji laktobacili pri prolasku kroz gastrointestinalni trakt doživljavaju jesu veoma niske pH vrednosti u želucu, koje se kreću od 1,5 do 3 (Sieladie i sar., 2011). Kako bi se ispitao trend promene brojnosti laktobacila u uslovima simulirane želudačne sredine, sprovedena je studija preživljavanja – gastro test. Od 29 sojeva koji su ispunili uslov za dalje ispitivanje, izabrano je devet za studije preživljavanja, odnosno ispitivanje sposobnosti preživljavanja sojeva laktobacila u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta.

U tabeli 3. prikazano je preživljavanje laktobacila nakon inkubacije od jednog sata u simuliranim uslovima želudačne sredine.

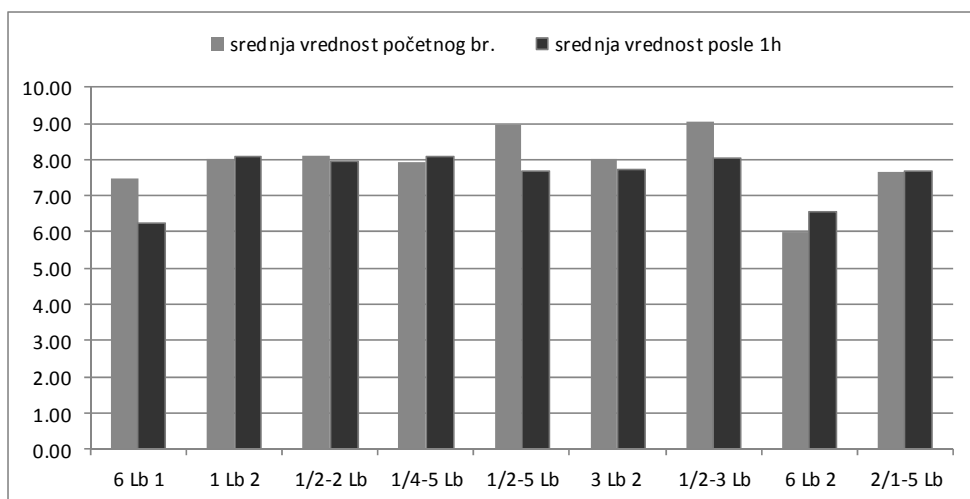
Tabela 3. *Preživljavanje laktobacila posle 1h inkubacije u simuliranim uslovima želudačne sredine*

Preživljavanje laktobacila u simuliranim uslovima želudačne sredine		
Statistički parametar	Početni broj log CFU/ml	Vrednost posle 1h log CFU/ml
Broj sojeva	9	9
Srednja vrednost i standardna devijacija	7,91±0,89	7,57±0,68
Minimalna vrednost	6,00	6,26
Maksimalna vrednost	9,05	8,10
Procenat preživljavanja	96,22	

U rezultatima dobijenim u ovom ispitivanju, procenat preživljavanja je bio 96, 22% posle 1h inkubacije u uslovima koji imitiraju želudačnu sredinu (pH=2, uz prisustvo pepsina).

Na grafikonu 1. prikazana je promena broja log CFU/ml ispitivanih sojeva laktobacila nakon inkubacije od 1h u simuliranim uslovima želudačne sredine.

Grafikon 1. *Promena broja log CFU/ml laktobacila nakon inkubacije od 1h u imitiranim uslovima želudačne sredine*



Sa grafikona 1. može se приметити да је код четири soja број log CFU/ml после једног сата порастао. Иако ни у једном другом истраживању није забележен пораст броја микроорганизама након инкубације у имитираним условима желудачне средине, у литературним подацима се наглашава да је осетљивост на снижену pH вредност и понашање у присуству желудачне киселине и пепсина строго зависно од soja и да може умnogome да варира (Millette и сар., 2008; Maurad и Meriem 2008). Процент преживљавања који износи више од 50% сматра се добрим, а том критеријуму одговарају и сви sojeви испитивани у овом истраживању (Sieladie и сар., 2011). Уколико се упореде резултати добијени у овом испитивању са резултатима из literature, евидентно је да су у свим истраживањима добијени различити подаци. У истраживању које су спровели Maurad и Meriem (2008), од испитиваних 14 sojeва, четири су у довољном броју преживела ниску pH вредност ($pH=2$). У другом истраживању, које је спроведено на четири позната probiotska soja laktobacila, сви тестирани sojeви су преживели 30 минута инкубације са неznatним смањенjem броја при pH вредностима већим од 2, док је значајан пад броја laktobacila установљен тек при pH вредностима мањим од 2 (Millette и сар., 2008). Ови подаци одговарају резултатима које су добили Prasad и сарадници (1998), где ни после 3 сата није забележен пад броја laktobacila при pH вредности 3. Резултати добијени у овом истраживању имају неких подударности

са резултатима које су добили Nawaz и сарадници (2011), где се проценат преживљавања углавном кретао између 80% и 92% после 48 сати инкубације при pH вредности 2,5. Изузетно висок проценат преживљавања је запажен у једном од истраживања, 94,3%–99,56%, и овај резултат је најближи ономе што је добијено у овом gastro тесту (Radulović и сар., 2008).

In vitro испитивања преживљавања laktobacila у симулираним условима желудачне средине ипак не могу да се узму као апсолутни показатељ преживљавања у условима *in vivo*, јер одређене компоненте намирница могу да имају протективно дејство на бактерије у самом желуцу, а битна је и интеракција са присутном микрофлором у специфичном мatriксу намирнице (Sieladie и сар., 2011).

Студија преживљавања – тест жућних соли

Sojeви laktobacila које су се у претходном “gastro” тесту показали као acidotolerantni, испитани су у односу на способност њиховог преживљавања у симулираним условима duodenuma (раствор са 0,4% жућних соли и 0,2% панкреатина). Физиолошке концентрације жућних соли у duodenumu човека изnose 0,1%–0,3% (Dunne и сар., 2001), односно 0,5% (Mathara и сар., 2008). Због тога је неопходно да ефикасни probiotski sojeви имају способност раста при концентрацији жући 0,15%–0,3% (Šušković и сар., 2001). Способност преживљавања у присуству 0,4% жућних соли које је при-

menjeno u ovom ispitivanju veoma je dobar pokazatelj potencijala preživljavanja ispitivanih sojeva laktobacila i u *in vivo* uslovima, gde su koncentracije žuči niže.

U tabeli 4. prikazane su početne vrednosti, zatim promena broja laktobacila (log CFU/ml) nakon inkubacije od jednog sata i procenat preživljavanja u simuliranim uslovima duodenuma.

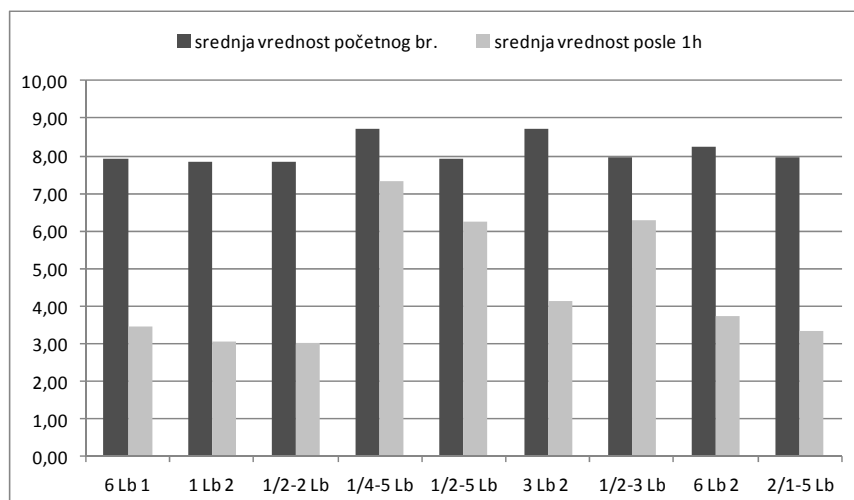
Tabela 4. Prikaz preživljavanja laktobacila posle 1h inkubacije u simuliranim uslovima duodenuma

Preživljavanje laktobacila u simuliranim uslovima duodenuma		
Statistički parametar	Početni broj log CFU/ml	Vrednost posle 1h log CFU/ml
Broj sojeva	9	9
Srednja vrednost i standardna devijacija	8,12±0,36	4,51±1,65
Minimalna vrednost	7,85	3,00
Maksimalna vrednost	8,72	7,31
Procenat preživljavanja	55,54	

Prema rezultatima dobijenim u ovom ispitivanju, procenat preživljavanja ispitivanih sojeva laktobacila u

simuliranim uslovima duodenuma iznosio je prosečno 55,54%. Promena broja log CFU/ml prikazana je na grafikonu 2.

Grafikon 2. Promena broja log CFU/ml laktobacila nakon inkubacije od 1h u simuliranim uslovima u duodenumu



Usvajajući kriterijum da se dobra sposobnost preživljavanja karakteriše procentom preživljavanja $\geq 50\%$, što je i jedan od osnovnih uslova ispoljavanja probiotkog mehanizma delovanja (Sieladie i sar., 2011), svega tri soja odgovaraju ovom kriterijumu. Iz rezultata prikazanih na grafikonu 2. može se primetiti da promene u broju log CFU/ml značajno variraju između pojedinih sojeva, a interval preživljavanja se kretao u rasponu 38,24%–83,90%. Stoga se može zaključiti da je sposobnost preživljavanja u prisustvu žuči isključivo karakteristika vezana za pojedine vrste i sojeve, što se naglašava i u podacima iz literature (Bao i sar., 2010; Morelli, 2000).

Jamaly i saradnici (2011) dokazuju rezistenciju na prisustvo žuči u koncentraciji od 0,3% kod 10, od ukupno 18 ispitivanih sojeva. U ispitivanju Prasad i sar. (1998) utvrđeno je dobro preživljavanje sojeva laktobacila pri koncentraciji od 0,4% žučnih soli, dok se značajna inhibicija rasta i time smanjenje broja laktobacila utvrđuje pri koncentracijama od 0,8%, odnosno 1% žuči. Rezultati Maurad i Meriem (2008) pokazuju da se, od 38 ispitivana soja *Lactobacillus plantarum*, 14 karakterisalo tolerancijom na 2% žuči uz procenat preživljavanja u opsegu 69%–75%. Ipak, ispitivanje tolerancije sojeva laktobacila pri koncentraciji od 2% žuči ne reflektuje stvaran broj tolerantnih sojeva sposobnih da prežive, kako se navedena koncentracija žuči smatra ekstremno visokom i može se očekivati samo tokom prvog sata digestije u duodenumu ljudi i

životinja (Gotcheva i sar., 2002). Pretpostavlja se da hidrolitička aktivnost u odnosu na žučne soli stoji u osnovi mehanizma rezistencije laktobacila na toksičnost konjugovanih žučnih soli u duodenumu, i time predstavlja važan faktor kolonizacije i opstanka populacije laktobacila u sredini duodenuma (De Smet i sar., 1995). Međutim, rezultati ispitivanja pojedinih autora pokazuju da se kod testiranih sojeva laktobacila, i pored tolerancije na žuč, ne utvrđuje hidrolitička aktivnost, i time hidroliza žučnih soli nije jedini mehanizam tolerancije na žuč (Schillinger i sar., 2005; Bertazzoni i sar., 2002).

Antimikrobna aktivnost

Značajan kriterijum pri selekciji probiotkih sojeva bakterija je i njihova mogućnost inhibicije rasta patogenih mikroorganizama. Bakterije mlečne kiseline tu sposobnost imaju zahvaljujući mehanizmu kompetitivnog isključenja, ali i kao posledica produkcije vodonik-peroksida, organskih kiselina, diacetila i bakteriocina (Sieladie i sar., 2011).

Za devet sojeva *Lactobacillus spp.* ispitivano je da li mogu da inhibišu rast pojedinih patogenih bakterija, gde su kao indikatori korišćeni *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 i *Staphylococcus aureus* (izolat iz kolekcije Laboratorije Katedre za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla). Rezultati su dobijeni merenjem prečnika zone inhibicije koja se nalazi oko bazenčića sa laktobacilima posle 24h inkubacije na 37°C. U tabeli 5. prikazane su dobijene vrednosti.

Tabela 5. Zone inhibicije rasta *L. monocytogenes* i *S. aureus* za devet ispitivanih sojeva

Oznaka soja	Prečnik zone inhibicije u mm	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
6 Lb 1	20	20
1 Lb 2	20	25
1/2-2 Lb	30	25
1/4-5 Lb	15	30
1/2-5 Lb	25	20
3 Lb 2	35	25
1/2-3 Lb	35	20
6 Lb 2	30	25
2/1-5 Lb	20	25

Svi sojevi *Lactobacillus spp.* pokazali su inhibitorno dejstvo na ispitivane patogene. U istraživanju koje su sprovedi Jamaly i saradnici (2011) ispitivano je antimikrobno dejstvo laktobacila na veći broj patogenih mikroorganizama: *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus D*, *Klebsiella pneumonia*. Od deset ispitivanih sojeva laktobacila, svi su pokazali inhibitorno dejstvo prema patogenima.

U istraživanju antimikrobne aktivnosti laktobacila koje su vršili Arokiyama-ry i Sivakumar (2011), fokus ispitivanja antimikrobne aktivnosti je bio usmeren na patogene bakterije koje se prenose uglavnom putem hrane: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* i *Shigella dysenteriae*. U ispitivanju je korišćeno pet sojeva laktobacila, a na svaki od patogena inhibitorno dejstvo je pokazalo barem dva soja. Ukoliko se prihvati kriterijum da zona inhibicije veća od 15 mm ukazuje na veoma jaku antimikrobnu aktivnost, tada

je svih devet sojeva laktobacila u ovom ispitivanju pokazalo izuzetna antimikrobna svojstva u odnosu na oba patogena. Kako u našem ispitivanju antimikrobne aktivnosti korišćeni supernatant kulture ispitivanih sojeva laktobacila nismo neutralisali, niti izložili delovanju proteinaza, uočene zone inhibicije indikator bakterija ne možemo jasno dovesti u vezu bilo sa niskom pH vrednošću, odnosno produkcijom kiseline, niti sa produkcijom bakteriocina.

Prema podacima iz literature, u jednom od istraživanja svih 15 ispitivanih sojeva laktobacila je pokazalo inhibitorno dejstvo na veliki broj testiranih patogena (*Listeria innocua* ATCC 33090, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 25922, *S. aureus* klinički izolat MDR, *Streptococcus mutans* DSM 20523, *Enterococcus faecalis* ATCC 10541, *E. coli* ATCC 13706, *E. coli* klinički MDR izolat, *S. typhi* ATCC 6539, *P. aeruginosa* ATCC 20027, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* klinički izolat), među kojima je bilo i više sojeva *S. aureus* (Si-

eladie i sar., 2011). U drugom istraživanju, u kome su ispitivana svega dva soja, pokazalo se da su oba inhibisala rast *L. monocytogenes* i *S. aureus* (Radulović i sar., 2008). Dostupni literaturni podaci su u potpunom skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju.

Sposobnost hemolize na krvnom agaru

Hemolitička aktivnost je praćena za devet sojeva *Lactobacillus spp.*, kako bi se proverilo postojanje moguće patogene ispitivanih sojeva. Rezultati su dobijeni posmatranjem da li postoji zona hemolize na krvnom agaru posle 24h inkubacije na 37 °C (slika 1).



Slika 1. γ hemoliza laktobacila koji su zasejani na krvnom agaru

Prema FAO/WHO vodiču (2002), bezbednost probiotskih sojeva je jedan od preporučenih atributa. Sa aspekta bezbednosti probiotika, nepostojanje hemolitičke aktivnosti jedan je od važnih kriterijuma, jer se dovodi u vezu sa razaranjem epitelnog sloja intestinuma, čime se otvaraju vrata infekcije. Pored toga, narušeni integritet epitela se prepoznaje kao izvor aler-

gijskih autoimunih oboljenja i time postoji rizik po zdravlje ljudi (Bengmark, 2003). U našem ispitivanju, kod sojeva laktobacila nije utvrđena hemolitička aktivnost, što se podudara sa podacima mnogih autora (Sieladie i sar., 2011; Kalui i sar., 2010; Jamaly i sar., 2011; Maurad i Meriem, 2008).

ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Od 51 ispitanog soja laktobacila, šest (11,76%) sojeva je bilo osetljivo na sve antibiotike, dok je na jedan od njih rezistenciju pokazalo 19 (37,25%) sojeva. Postojanje multirezistencije zapaženo je kod 26, odnosno 50,98% sojeva. Najčešći uočeni profil fenotipske rezistencije jeste rezistencija na tetraciklin.
2. Procenat preživljavanja svih devet sojeva laktobacila ispitanih na sposobnost preživljavanja u simuliranim uslovima želudačne sredine iznosio je 96,22%. U simuliranim uslovima duodenuma, tri od ukupno devet ispitanih sojeva laktobacila pokazao je procenat preživljavanja $\geq 50\%$.
3. Kod svih ispitanih sojeva laktobacila uočena je sposobnost inhibicije rasta *S. aureus* i *L. monocytogenes*.
4. Nijedan od ispitanih sojeva laktobacila nije pokazao sposobnost hemolize.

LITERATURA

1. Arokiyarny A., Sivakumar P. K., (2011): *Antibacterial activity of bacterocin producing Lactobacillus*

- spp.*, isolated from traditional milk products, Curr. Bot., 2: 5–8.
2. Bao Y., Zhang Y. C., Zhang Y., Liu Y., Wang S. Q., Dong X. M., Wang Y. Y., Zhang H. P. (2010): *Screening of potential probiotic properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products*, Food Control 21, 695–701.
 3. Bengmark S. (2003): *Use of pre-, pro-, and synbiotics in critically ill patients*, Best Practice and Research Clinical Gastroenterology, 17: 833–848.
 4. Bernardeu M., Vernoux J. P., Henri-Dubernet S., Guégen M. (2008) *Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus*, International Journal of Food Microbiology 126: 278–285.
 5. Bertazzoni M. E., Benini A., Marzotto M., Sbarbati A., Ruzzenente O., Ferrario O., Hendriks H., Charalampopoulos D., Pandiella S. S., Webb C., (2002): *Evaluation of the effect of malt, wheat, and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions*, International Journal of Food Microbiology 82: 133–141.
 6. Bulajić S., Mijačević Z. (2011) *Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from Sombor cheese*, Acta Veterinaria 61: 247–258.
 7. Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salyano G., Sorrentino E., (2005): *Antibiotic susceptibility of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese*, Lait, 85, 193–204.
 8. Danielsen M., Wind A. (2002): *Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents*, International Journal of Food Microbiology 82: 1–11.
 9. De Smet I., Van Hoorde L., Vande Woestyne M., Christiaens H., Verstraete W. (1995): *Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli*, Journal of Applied Bacteriology, 79: 292–301.
 10. Dunne C. L., Mahony M., Thornton G., Morrissey D., Hallorans S., Feeney M., Flynn S., Kiely B., Daly C., Collins K. (2001): *In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings*, American Journal of Clinical Nutrition, 73: 386–392.
 11. EFSA (2008): *Technical guidance: Update of the criteria used in assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance*, The EFSA Journal 732: 1–15.
 12. FAO/WHO Working group report, (2002): *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*, London, Ontario, Canada
 13. Frece J., Kos B., Svetec I. K., Zgaga Z., Beganović J., Leboš A., Šušković J. (2009): *Synbiotic effect of Lactobacillus helveticus M92 and prebiotics on the intestinal microflora*

- and immune system of mice*, J. Dairy Res 76: 98–104.
14. Gotcheva V., Hristozova E., Hristozova T., Guo M., Roshkova Z., Angelov A. (2002): *Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains*, Food Biotechnology 16: 211–225.
15. Jamaly N., Benjouad A., Bouksaim M. (2011): *Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products*, British Microbiology Research Journal 1: 79–94.
16. Kaktcham P. M., Zambou N. F., Tchouanguép F. M., El-Soda M., Choudhary M. I. (2011): *Antimicrobial and safety properties of lactobacilli isolated from two Cameroonian traditional fermented foods*, Sci Pharm 80: 189–203.
17. Kalui C. M., Mathara J. M., Kutima P. M. (2010): *Probiotic potential of spontaneously fermented cereal based foods – a review*, African Journal of Biotechnology 9: 17, 2490–2498.
18. Kos B., Šušković J., Beganović J., Gjuračić K., Frece J., Iannaccone C., Canganella F. (2008): *Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry*, World J. Microbiol. Biotechnol 24: 699–707.
19. Mathara J. M., Schillinger U., Guigas C., Franz C., Kutima P. M., Mbugua S. K., Shin H. K., Holzapfel W. H. (2008): *Functional characteristics of Lactobacillus spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya*, International Journal of Food Microbiology 126, 57–64.
20. Mattila-Sandholm T., Myllärinen P., Crittenden R., Fondén R., Saarela M. (2002): *Technological challenges for future probiotic foods*, International Dairy Journal, 12: 173–182.
21. Maurad K., Meriem K. H. (2008): *Probiotic characteristics of Lactobacillus plantarum strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria*, Grasas Y Aceites 59: 3, 218–224.
22. Millette M., Liquet F. M., Ruiz M. T., Lacroix M. (2008): *Characterization of probiotic properties of Lactobacillus strains*, Dairy Sci. Technol 88: 695–705.
23. Morelli L. (2000): *In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal*, Curr. Issues Intest. Microbiol 1: 59–67.
24. Morelli L. (2007): *In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality*, International Dairy Journal 17: 1278–1283.
25. Nawaz M., Wang J., Zhou A., Ma C., Wu X., Xu J. (2011): *Screening and characterization of new potentially probiotic lactobacilli from breast-fed healthy babies in Pakistan*, African Journal of Microbiology Research 512: 1428–1436.

26. Prasad J., Gill H., Smart J., Gopal K. P. (1998): *Selection and characterization of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use in probiotics*, Int. Dairy Journal, 8: 993–1002.
27. Radulović Z., Petrović T., Paunović D., Mirković N., Obradović D. (2008): *Karakterizacija autohtonog soja Lactobacillus paracasei na potencijalne probiotske sposobnosti*, Prehrambena industrija, 19: 23–28.
28. Salminen M. K., Rautelin H., Tynkkynen S., Poussa T., Saxelin M., Valtonen V., Jarvinen A. (2006): *Lactobacillus bacteriaemia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates*, Clinical infectious diseases 42: 35–44.
29. Saulnier D. M. A., Spinler J. K., Gibson G. R., Versalovic J. (2009): *Mechanism of probiosis and prebiosis: Considerations for enhanced functional foods*, Curr. Opin. Biotechnol. 20: 135–141.
30. Schillinger U., Guigas C., Holzapfel W. H. (2005): *In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt like products*, Int. Dairy J 15: 1289–1297.
31. Shah N. P. (2006): *Functional cultures and health benefits*, In: *Scientific and technological challenges in fermented milk*, 2nd IDF dairy science and technology week, Book of abstracts, Sirmione, Italy, 35–36.
32. Sieladie D. V., Zambou N. F., Kaktcham P. M., Cresci A., Fonteh F. (2011): *Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon*, Inovative Romanian Food Biotechnology 9: 12–28.
33. Šušković J., Kos B., Goreta J., Matošić S. (2001): *Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect*, Food Technol. Biotechnol 39: 227–235.
34. Tagg J. R., McGiven A. R., (1971): *Assay system for bacteriocins*, Appl. Environ. Microbiol 21: 5, 943.
35. Vasiljevic T., Shah N. P. (2008): *Probiotics – From Metchnikoff to bioactives*, International Dairy Journal 18: 714–728.
36. Vlková E., Rada V., Popelářová P., Rojanová I., Killer J. (2006): *Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves*, Livest Sci 105: 253–259.
37. WGO practice guidelines: *Probiotics and prebiotics*, (2009): Arab Journal of Gastroenterology 10: 33–42.

DOI: 10.7251/VJRS1302193P

UDK 614.448:614.78

Ivan Pavlović,¹ Ana Samokovlija,² Milica Elezović,² Jelena Marić³

ZNAČAJ PARAZITOLŠKE KONTROLE KONTAMINIRANOSTI ZELENIH POVRŠINA U URBANIM SREDINAMA

Kratak sadržaj

Stalno povećanje broja pasa, kućnih ljubimaca i litalica, predstavlja aktuelni zdravstveni i ekološki problem urbanih sredina. Prisustvo velikog broja životinja na ograničenom prostoru grada dovodi do toga da one svojim fecesom stalno prljaju zelene površine i ulice. Kako je veliki broj pasa inficiran zoonotskim parazitima čija se jaja nalaze u njihovom fecesu, oni predstavljaju evidentnu opasnost po zdravlje ljudi, posebno dece. U cilju rešavanja ovog problema neophodna je redovna parazitološka kontrola zelenih površina i izmeta pasa na njima kako bi se dobio uvid u epidemiološku situaciju i pristupilo eradikaciji kontaminacije. Takođe je neophodno doneti strategiju rešavanja broja napuštenih pasa kao dugoročno rešenje ovog problema, koje mora sadržati i komponentu parazitološke kontrole javnih površina. U radu su prikazana iskustva iz Beograda.

Ključne reči: parazitološka kontrola, psi, urbana sredina.

Ivan Pavlović,¹ Ana Samokovlija,² Milica Elezović,² Jelena Marić³

THE SIGNIFICANCE OF PARASITOLOGICAL CONTROL OF CONTAMINATION OF GREEN PLACES IN URBAN AREA

Abstract

The continuous increase in the number of dogs, pets and stray current is a health and environmental issue of urban areas. The presence of a large number of

¹ Dr Ivan Pavlović, naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd.

² Ana Samokovlija, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine; Milica Elezović, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine.

³ Mr Jelena Marić, Veterinarski institut Republike Srpske „Dr Vaso Butozan“, Banja Luka.

animals in a limited area of the city, leads them to their feces constantly dirty lawns and streets. As a large number of dogs infected with parasites whose eggs are in their feces they represent an obvious danger to human health, especially children. In order to solve this problem requires regular examination were green areas and dog on them in order to gain insight into the epidemiological situation and start eradicating contamination. It is also necessary to adopt a strategy of resolving the number of stray dogs as a long-term solution to this problem which must included parasitological control of urban environment. In this paper we present expirience from Belgrade.

Key words: parastiological control, dogs, urban areas.

UVOD

Povećanje broja vlasničkih i napuštenih pasa u urbanim sredinama predstavlja aktuelni problem svetskih razmera. U urbanoj sredini, zelene površine i parkovi su glavna mesta na kojima se igraju deca i ona predstavljaju odmorišta gradskih ljudi, ali takođe su i mesta na kojima vlasnici pasa izводе svoje ljubimce i mesta gde srećemo ne vlasničke pse – najčešće bivše ljubimce (Puccini i Tarsitano 2003a, b; Poglayen 2003; Pavlović, 2005). Tokom boravka na ovim prostorima, psi defeciraju po njima, a sem svog neprijatnog izgleda i mirisa, izmet pasa predstavlja epidemiološku opasnost s obzirom na to da su psi nosioci i pravi domaćini velikog broja vrsta zoonotskih parazita (Karen i sar., 1989; Dubinski 1998; Pavlović, 1996, 2005; Lia i sar., 2002; Rinaldi i sar., 2008).

Osvrnuvši se na rezultate parazitoloških pregleda zelenih površina u gradovima širom sveta, videćemo da ova kon-

taminacija zoonotskim parazitozama čini globalan problem. U Madridu ona iznosi 9%, Londonu 15%–17%, Mičigenu 19%, Kanzasu 20,6%, Utrehtu 23%, Beogradu, Parizu i Pragu 28%, Dablinu 32%, Napulju 48%, Tokošimi 63% i sl. (Laborde 1980; Valkunova 1982; Karen i sar., 1989; Jansen i sar. 1993; Pavlović 2005; Rinaldi i sar., 2008; Elaine i sar., 2011).

Ako se zna da više od 5% zagađenih površina predstavlja ozbiljnu opasnost za zdravlje ljudi, mišljenja smo da ovo i ne treba komentarisati (Woodruff, 1976). U našem radu zato dajemo iskustva u rešavanju ove problematike na području Beograda.

EPIDEMIOLOŠKI ZNAČAJ NAJČEŠĆIH PARAZITA PASA NA ZELENIM POVRŠINAMA

Većina vrsta parazita pasa su zoonoze, a njihova jaja se izmetom izlučuju u spoljnu sredinu. Na zelenim površinama i po ulicama gradova najčešće se

sreću jaja *Toxocara canis* i *Ancylostomidae spp.*, a *Echinococcus granulosus* srećemo u izmetu pasa semiurbanih i ruralnih predela (Puccini i Tarsitano, 2003a, b). U fecesu pasa, u poslednje vreme, u sve većem broju se javljaju i jaja *Trichuris vulpis*, *Strongyloides stercoralis* i *Dipylidium caninum* (Mangaval i Pavlović, 2005; Petković i Pavlović, 2010; Pavlović i sar., 2012), kao i zoonotske protozoe – *Giardia duodenalis*, *Amoeba spp.* i *Cryptosporidium spp.* (Beelitz i sar., 2006; Pavlović i sar., 2013). Na ovaj način je stalno prisutna kontaminacija životne sredine i mogućnost infekcije ljudi (Puccini i Tarsitano 2003a, b). *Toxocara canis* i *Ancylostomidae spp.* su biohelmini i njihova jaja postaju infektivna tek u spoljnoj sredini. Tako su parkovi i sve površine gde je stalna fluktuacija pasa najviše opterećeni njihovim prisustvom (Rinaldi i sar., 2008).

Infekcija ljudi sa *T. canis* nastaje ingestijom jaja parazita. U crevima, iz unetih jaja izlaze larve koje počinju migraciju krvotokom i tokom migracije oni se zaustavljaju u plućima, mozgu, srcu, očima i drugim organima, izazivajući značajna obolenja (obolenje je poznato kao sindrom visceralne larve migrans). Kod čoveka se ne razvijaju odrasli paraziti. Lakša forma se ispoljava sa kožnim promenama i limfodenopatijama. Težu formu, koju najčešće srećemo kod dece, karakteriše kašalj, hronični opstruktivni bronhitis, astma, povratna eozinofilna pneumonija, visoka temperatura, povećanje slezine i jetre, menin-

gitis, encefalitis, epilepsija, konvulzije, abdominalni poremećaji, nauzeja, anoreksija, miokarditis, miokardiopatije i dr. Mogući su letalni ishodi (Gothe i Reichler, 1990; Dubinski 1998; Elaine i sar., 2011).

Infekcija ljudi sa *Ancylostomida spp.* nastaje prodiranjem larvi kroz kožu i ingestijom. Putevi migracija su u oba slučaja slični, ali se kod ljudi nikada ne javljaju odrasli paraziti. Bolest se ispoljava u vidu kožnih promena – crvenila, otoka, upala, često mogu biti zahvaćeni i okolni limfni čvorovi. Teži slučajevi dermatoza su takođe mogući, dok fatalni slučajevi ovog sindroma poznatog kao kutana larva migrans nisu zabeleženi (Pavlović i sar., 2010a; Galanti i sar., 2002; Tiago i sar., 2011).

Echinococcus granulosus je svakako najopasnija tenija pasa, a hidatidoza predstavlja jedan od najznačajnijih zdravstvenih problema koji se suzbija u globalnim razmerama na nivou država, a u pojedinim regionima su uključene i agencije WHO i OIE. To je teška i podmukla bolest koja u početku nije manifestna. Ciste neprekidno rastu celog života pacijenta i izazivaju kompresivnu atrofiju organa, a simptomi zavise od lokacije, broja i veličine cisti. Ako su na jetri, mogu se osetiti sa pritisak, stomak obolelog je veliki, otekao i bolan. Ako su locirane na plućima, ciste izazivaju gušenje, kašalj i bolove. Ciste na mozgu se ponašaju slično tumoru. U slučaju prskanja cisti, dolazi do smrtnog ishoda (Pavlović i Ivanović, 2006).

NAČIN PARAZITOLOŠKE KONTROLE KONTAMINIRANOSTI ZELENIH POVRŠINA

U cilju rešavanja problema fekalnog i parazitološkog zagađenja javnih površina, osnovno polazište je redovna parazitološka kontrola ovih površina i izmeta pasa koji se zatekne na njima (Pavlović, 1996; Jardine i sar., 2003; Tarsitano 2003). Tako se dobija uvid u epidemiološku situaciju i adekvatno pristupila sanaciji i eradikaciji ove kontaminiranosti. Takođe, potrebno je da lokalne samouprave definišu program kontrole vlasničkih i nevlasničkih životinja u svojoj sredini, odrede prostore za izvođenje pasa i sl.

KONTROLA ZEMLJIŠTA

Uzorke trave i zemljišta sa zelenih površina u našem klimatskom području najbolje je prikupiti u periodu od marta do oktobra. Termin je određen na osnovu pokazatelja bioklimatskih uslova koji vladaju na ispitivanom području vodeći se metodom bioklimatograma po Uvarovu, koji za komponentu imaju temperaturu, i vlažnost u prosečnim vrednostima za ispitivano područje. Ovo je od izuzetne važnosti kod procene rezultata s obzirom na to da geohelmini u zemljištu embrioniraju (postaju infektivni) pod određenim uslovima optimuma temperature i vlažnosti (Pavlović i sar., 1997; Pavlović i Stevanović, 2005).

Pregled se vrši sedimetacionom i sedimentaciono-flotacionom metodom. Određivanje jačine infekcije vrši se

metodom McMastera i Stolla (Euzeby, 1980; Pavlović i sar., 1997).

KONTROLA IZMETA PASA

Uzorci izmeta pasa se prikupljaju sa istih lokacija u istom intervalu kada i uzorci zemljišta, trave i peska. Pregled se vrši metodom nativnog preparata i flotacionom metodom (po McMasteru, Stollu i Richardson-Kendellu). Određivanje jačine infekcije vrši se metodom po McMasteru uz primenu korektivnih faktora, kao i Stollovom metodom, uz korektivno izračunavanje (Euzeby, 1980; Pavlović i Anđelić-Buzadžić, 2010d).

UZORKOVANJE I DETERMINACIJA PARAZITA

Materijal za pregled se uzima u vidu grupnog uzorka zemlje, trave i izmeta pasa čiji broj zavisi od veličine lokaliteta, a pesak iz dečjih igrališta se uzima iz svakog od bazenčića na navedenim lokalitetima. Svaki uzorak se pakuje u PVC vrećice na kojima se sa spoljne strane beleži lokacija, broj uzorka i datum uzimanja uzorka.

U oba slučaja, determinacija jaja i adulta parazita vrši se morfometrijskom analizom na osnovu morfoloških karakteristika po ključevima koje su dali Soulsby (1977) i Euzeby (1981).

Sve primenjene parazitološke metode su u skladu sa preporukama ISP, ISID, OIE i WHO/FAO vezanim za dijagnostiku parazitskih bolesti.

ISKUSTVA NA PODRUČJU BEOGRADA

Na području Beograda, parazitološke kontrole kontaminiranosti zemljišta iz parkova i drugih zelenih površina kontinuirano se sprovode od 1993. godine. One su rezultirale kontinuiranim promenama u načinu razmišljanja i doprinele da se u okviru gradske komunalne higijene izvrše brojne promene koje su dovele do znatnog poboljšanja kvaliteta ovih površina i stalnog unapređenja njene zaštite, a samim tim i zdravlja ljudi koji borave ovde.

U periodu 1993–1996. godine, na osnovu obavljenih pregleda prisustvo jaja parazita ustanovljeno je u 65,90%, a poliparazitizam u 54,61% pregledanih uzoraka. *Toxocara canis* je nađena u 65,90% uzoraka, *Dipylidium caninum* i *Ancylostomidae spp.* u 46,96%, *Trichuris vulpis* u 4,92%, *Taenia spp.* 7,19% i *Toxascaris leonina* 6,81% (Pavlović, 1996; Pavlović i sar., 1996, 1997, 2000).

To je dovelo do toga da se pristupi sanaciji peska u peščanim igralištima za decu i uređenju centralnih parkovskih površina grada, što se već odrazilo na opšte smanjenje polucije peščanika za igru dece na samo 0,2% u periodu 1997–2002. (Pavlović i sar., 2003; Pavlović i Surla, 2003).

U istom periodu počela je i sanacija parkovskih površina centralnih beogradskih opština. Rezultati su se videli već u tokom narednih kontrola, tako da je periodu 2003–2007. godine kontaminacija ustanovljena na 45,90% ispi-

tanih površina, a poliparazitizam je nađen u 44,32% slučajeva. *Toxocara canis* je nađena u 42,82% uzoraka, *Dipylidium caninum* u 37,19%, *Ancylostomidae spp.* u 31,70%, *Taenia spp.* u 7,31%, *Toxascaris leonina* u 3,65% i *Trichuris vulpis* u 2,43% (Pavlović, 2004; Pavlović i sar., 2003, 2007).

U sledećoj fazi, tokom 2008–2010, prvo u opštini Stari grad, a zatim i u drugim centralnim gradskim opštinama zaživeo je sistem korpi sa PVC kesicama za skupljanje i odlagaje fecesa pasa (dogi-pot sistem) da bi se od 2011. u pojedinim parkovima formirale eko zone ili parkovi za pse. Na osnovu izvršene parazitološke kontrole kontaminiranosti zemljišta iz parkova tokom 2011. i 2012. godine, ustanovljeno je za preko 40% manje prisustvo jaja parazita nego u periodu 2008–2010. (Pavlović i sar., 2009a, b, 2010a, b, c, 2012c). U ovom periodu, jaja *Toxocara canis* su nađena u 21,87%, *Dipylidium caninum* u 17,18%, *Trichuris vulpis* u 10,93%, *Ancylostomidae spp.* u 3,12%, *Strongyloides stercoralis* i *Toxascaris leonina* u 1,56% uzoraka.

Poseban segment rešavanja ove problematike u Beogradu postignut je donošenjem Strategije rešavanja problema nevlasničkih pasa i mačaka na području grada Beograda koja je usvojena u Skupštini grada Beograda održanoj 21.9.2011. godine. Pri izradi ove strategije za grad Beograd i u njenom sprovođenju rukovodilo se načelom humanosti, kombinujući metodu bez eutanazije (no kill strategy) i CNR metodu „uhva-

ti–tretiraj–pusti” (CNR – Catch–neuter–release), sa posebnim osvrtom na заштити здравља ljudi и животиња, и применјујући мере едукације, контроле и санкција према неодговорним власницима, чија небрига и непоштовање позитивних правних прописа, али и моралних начела директно узрокује повећање броја напуштених pasa, као и контролу фекалног загађење улица и јавних површина

Dosadašnji rezultati ukazuju na to da је спровођењем ове стратегије дошло до стабилизације популације напуштених животиња на улицама са тенденцијом опадања применом CNR система. Примена NO KILL (без еутаназije) компоненте CNR система ефекат прirаста популације pasa u склопу активног спровођења масовне стерилизације 2010. године дао је као резултат 50% мањи прirаст напуштених pasa (Pavlović и Terzin, 2012a; Terzin и сар., 2011, 2012).

Ovakvim pristupom u Beogradu, наше друштво је ушло u ред развијених земаља, које на научној основи приступају решању проблема напуштених животиња, а о квалитету саме стратегије најбоље говори податак да су сличне одреднице date u European Parliament Written Declaration pursuant to Rule 123 of the Rules of Procedure on dog population management in the European Union No 0026/2011 од 06.10.2011. (donete skoro месец дана после усвајања наше стратегије).

Kao zaključak nameće се чињеница да контрола контаминаности zelenih површина заузима значајно место које,

uporedo са увођењем еко-зона (паркова за pse) и азила за напуштене pse, умногосте смањује контаминаност zelenih површина паркова. Нажалост, овим се не решава и питање загађења улица и осталих јавних површина града које су и даље препуштене неодговорности власника pasa да чисте измет својих љубимца, а које се могу решити, уз едукативни приступ, казним мерима које ће довести до свести о одговорном власништву.

LITERATURA

1. Annonimus. European Parliament *Written Declaration pursuant to Rule 123 of the Rules of Procedure on dog population management in the European Union* No 0026/2011.
2. Beelitz P., Leonhard S., Pfister K. (2006): *Giardia infections in Germany: evaluation of treatment regimes carried out in different types of pet keeping and prevalence*. Prakt Tierarzt 87: 597–603.
3. Dubinski P. (1998): *Epidemiology of toxocariosis in rural and urban areas*. Parasitol. Int. 47: 128.
4. Elaine A., Carvalho A., Regina-Rocha L. (2011): *Toxocariasis: visceral larva migrans in children*. J. Pediatr 87: 100–110.
5. Euzeby J. (1981): *Diagnostic Experimental des Helminthoses Animales*, Tom 1, ITVS Paris.
6. Galanti B., Fusco F. M., Nardiello S. (2002): *Outbreak of cutaneous larvami-grans in Naples, southern Italy*.

- Trans R Soc Trop Med Hyg 96: 491–492.
7. Gothe R., Reichler I. (1990): *Toxocara canis: Nachweishäufigkeit und Befallsextenstet bei Mutterhundien und ihre wurfen unterschiedlicher Rassen und Halting in Suddeutchland*. Tierrätzlitch Praxis 18: 293–300.
8. Jansen J., van Knapen F., Schreurs M., van Wijngšarden T (1993): *Toxocara ova in praks and send boxes in the city of Utrecht*. Tijdschr Dieregneeskund; 11 (4), 118–119.
9. Jardine C., Hrudey S., Shortreed J., Craig L., Krewski D., Furgal C., McColl S. (2003): *Risk management frameworks for human health and environmental risks*. J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev 6, 569–720.
10. Karen E. Ludlam, Thomas R. Platt. The relationship of park maintenance and accessibility to dogs to the presence of toxocara spp. ova in the soil. Am. J. Public Health. 1989; 79: 633–634.
11. Laborde C. E. C. (1980): *Les Ascarides du chienne et la sante humaine*. These pour le doctorat veterinaire, Ecole National Veterinaire de Alfort, Alfort.
12. Lia R., La Montanara C., Leone N., Pantone N., Llazari A., Puccini V. (2002): *Canine helminthic fauna and environmental faecalization in the town of Bari (Apulia region, southern Italy)*. Parassitol 44: 92.
13. Mangaval J. F., Pavlović I. (2005): *Intestinal Parasites (Helminths) Cestoides Order: Cyclophyllidea Dipylidium caninum* In P. Karamelo: Atlas of Medical Parasitology, Carlo denegri Fondation & Infectious Disease, Unit A, Tropical and Parasitology Service Amedeo di Savoia Hospital Turin, Italy (CD rom).
14. Pavlović I. (1996): *Kontaminiranost zelenih površina i dečijih igrališta sa peskom u Beogradu jajima Toxocara canis i drugih geohelminata*. Vet. informator, II: 24.
15. Pavlović I., Kulišić Z., Erski-Biljić M. (1996): *Contamination of childrens send boxes in old housing district of Belgrade by eggs of Toxocara and other geohelminths*. Programme and Abstracts of 1st International Conference on Emerging Zoonoses, Jerusalem, Israel, 95.
16. Pavlović I., Kulišić Z., Milutinović M. (1997): *Rezultati parazitološkog ispitivanja peščanih igrališta za decu u užem centru Beograda*. Vet. glasnik 51: 61–65.
17. Pavlović I., Milutinović M., Radenković B., Janković Lj., Vučinić M., Kulišić Z. (2000): *Higijenski aspekt gradskih parkova – rezultati parazitološkog ispitivanja centralnih parkova Beograda*. Zbornik radova XI savetovanja Dezinfekcija, dezisekcija i deratizacija u zaštiti životne sredine sa međunarodnim učešćem, Tara, 233–237.

18. Pavlović I., Teodor B., Stojanović D. (2003): *Rezultati parazitološkog pregleda parkova i bazenčića za pesak u vrtićima Požarevca i Kostolca*. Zbornik radova Stručnog skupa Kontrola štetnih organizama u urbanoj sredini, VI beogradska konferencija sa međunarodnim učešćem, Beograd, 159–163.
19. Pavlović I., Surlan N. (2003): *Rezultati parazitološkog pregleda zelenih površina opštine Stari grad tokom 2002. godine*. Zbornik radova Stručnog skupa Kontrola štetnih organizama u urbanoj sredini, VI beogradska konferencija sa međunarodnim učešćem, Beograd, 143–150.
20. Pavlović I. (2004): *Zdravstveni aspekt geohelminata endoparazita pasa*. J. Microbiol. Immunol. Infect 3: 3–6.
21. Pavlović I., Stevanović S. (2005): *Metode parazitološke kontrole kontaminiranosti zelenih površina u urbanim sredinama*. Knjiga apstrakata konferencije Životna sredina i ljudsko zdravlje, sa međunarodnim učešćem, Beograd, 133–134.
22. Pavlović I., Ivanović S. (2006): *Ehinokokoza/ hidatidoza, bolest životinja i ljudi*. izd. Naučni institut za veterinarstvo Srbije i Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Beograd, 1–32.
23. Pavlović I., Kulišić Z., Momčilović J., Mišić Z., Krstić D. (2007): *Basic measure to control and sanation of parasitic contamination of green areas in urban environmental condition*. Abstracts of International Conference on Environment and Sustainable Development, Beograd, 78–79.
24. Pavlović I., Petković D., Terzin V., Ćurčin Lj., Terzin D., Ćurčin K. (2000a): *Parasites contamination of public places in central districts of Belgrade in 2008*. Proceedings of 6th International Symposium on Biocides in Public Health and Environment, 6th International Symposium on Antisepsis, Disinfection and Sterilization and Belgrade Conference 2009 on Vector Control in Urban Environments, Beograd, 131–132.
25. Pavlović I., Kulišić Z., Petković D., Terzin V., Ćurčin Lj., Terzin D., Ćurčin K. (2009b): *Parasites contamination of grassy areas of Belgrade in period 2003–2007*. Abstracts book of International Scientific Conference on Globalization and Environment Beograd, 155–156.
26. Pavlović I., Kulišić Z., Ljubić B., Radivojević S., Terzin V., Stokić-Nikolić S., Rajković M., Anđelić-Buzadžić G. (2010a): *Raširenost parazitskih infekcija pasa i kontaminiranost javnih površina – rizik nastanka humanih infekcija*. Zbornik VII kongres mikrobiologa Srbije, Beograd, 1–2 (CD rom).
27. Pavlović I., Terzin V., Terzin D., Stanković B., Ilić M. (2008): *Parazitska kontaminiranost parkova centralnih opština Beograda tokom 2008. godine*. Zbornik radova i kratkih sadržaja

- XII simpozijuma Epizootiološki dani, sa međunarodnim učešćem, Oplenac–Topola, 177–180.
28. Pavlović I., Petković D., Ćurčin Lj., Ćurčin K. (2010c): *Rezultati parazitoloških pregleda zelenih površina Novog Beograda tokom 2008. godine*. Zbornik radova i kratkih sadržaja XII simpozijuma Epizootiološki dani, sa međunarodnim učešćem, Oplenac–Topola, 181–184.
29. Pavlović I., Anđelić-Buzadžić G. (2010d): *Osnovi dijagnostike parazitskih bolesti životinja za studente visoke poljoprivredne škole strukovnih studija u Šapcu, studijski program: Strukovna veterina*, Naučni institut za veterinarstvo Srbije.
30. Pavlović I., Anđelić-Buzadžić G. (2011): *Parazitske bolesti domaćih životinja sa osnovima parazitologije*. Visoka poljoprivredna škola strukovnih studija u Šapcu, Šabac.
31. Pavlović I., Terzin V. (2012a): *Influence of new strategy of resolve the problem of no owner dogs and cats in Belgrade to preservation of environmental condition*. Book of Abstracts International scientific conference on innovative strategies and technologies in environment protection, Beograd, 44–46.
32. Pavlović I., Antić V., Ćurčin Lj., Milojković N., Ljubić B., Radivojević S., Elezović M., Žunić M., Stanković B., Stokić-Nikolić S., Šekler M., Tambur Z. (2013b): *Đardiazia pasa i njen zdravstveni značaj za urbanu sredinu*. Knjiga apstrakata IX kongresa mikrobiologa Srbije, Beograd (CD rom).
33. Pavlović I., Terzin V., Stanković B., Stefanović S. (2012c): *Uticaj izgradnje parkova za pse (eko zona) na smanjenje parazitske kontaminiranosti parkova centralnih opština Beograda*. Zbornik radova XXIII savetovanja Dezinfekcija, dezinfekcija i deratizacija u zaštiti zdravlja životinja i ljudi sa međunarodnim učešćem, Iriški Venac, 2012c, 259–264.
34. Petković D., Pavlović I. (2010): *Trihuroza pasa*, Zbornik predavanja Simpozijuma veterinarara male prakse SIVEMAP, Beograd, 248–249.
35. Poglayen, G. (2003): *Zoonoses by environmental faecalization*. In Manual of Urban Parasitology: Cities, Animals and Public Health, 1st ed.; Puccini, V., Tarsitano, E., Eds.; Il Sole 24 ORE Edagricole Srl: Bologna, Italy, 110–117.
36. Puccini, V., Tarsitano, E. (2003a): *Introduction to Urban Parasitology*. In Manual of Urban Parasitology: Cities, Animals and Public Health, 1st ed.; Puccini, V., Tarsitano, E., Eds.; Il Sole 24 ORE Edagricole Srl: Bologna, Italy 1–13.
37. Puccini, V., Tarsitano, E. (2003b): *Urban Ecosystem*. In Manual of Urban Parasitology: Cities, Animals and Public Health, 1st ed.; Puccini, V., Tarsitano, E., Eds.; Il Sole 24

- ORE Edagricole Srl: Bologna, Italy, 21–36.
38. Rinaldi L., Biggeri A., Carbone S., Vincenzo Musella V., Catelan D., Veneziano V., Cringoli G. (2006): *Canine faecal contamination and parasitic risk in the city of Naples (southern Italy)* BMC Vet. Res 2: 29 doi:10.1186/1746-6148-2-29.
 39. Soulsby E. J. L. Helminths (1977): *Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. Baillier, Tindall and Cassell ed. London.
 40. Tiago G., Machado Pereira da Silva M-A., Laitano Dias de Castro L., Welter Wendt E., Marreiro Villela M., Elisabeth Aires Berne M. (2011): *Presence of eggs of Toxocara spp. and hookworms in a student environment in Rio Grande do Sul, Brazil*. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, 2011; 20: 176–177.
 41. Tarsitano, E. (2003): *Management, prevention and integrated control of urban parassitosis*. In Manual of Urban Parasitology: Cities, Animals and Public Health, 1st ed.; Puccini, V., Tarsitano, E., Eds.; Il Sole 24 ORE Edagricole Srl: Bologna, Italy pp. 331–341.
 42. Terzin, V., Čukić B., Vukićević-Radić O., Prokić B., Radenković-Damnjanović B., Pavlović I., Dimitrijević S., Marković M., Tufegdžić N. (2011): *Strategija rešavanja problema nevlasničkih pasa i mačaka u urbanim sredinama – primer Beograda*. Zbornik referata i kratkih sadržaja 22. savetovanja veterinara Srbije (sa međunarodnim učešćem), Zlatibor, 316–319.
 43. Terzin, V., Čukić B., Vukićević-Radić O., Prokić B., Radenković-Damnjanović B., Pavlović I., Dimitrijević S., Marković M., Tufegdžić N. (2012): *Strategija grada Beograda o zbrinjavanju napuštenih pasa i mačaka*. Zbornik predavanja XXXIII seminar za inovacije znanja veterinara, Beograd, 69–74.
 44. Valkunova J. (1982): *Parasitological investigation of childrens sand boxes and dog faeces from public areas of old housing districts of Pragues*. Folia Parasit 29: 25–32.
 45. WHO (1978): Expert Committee on Parasitic Zoonoses with the participation of FAO, Geneva.
 46. Woodruff A. W. (1976): *Toxocariasis as a public health problem*. Envir. Health 84: 29–31.

DOI: 10.7251/VJRS1302203K

UDK 619:616-002.828:636.2

Б. Курељушић, Б. Иветић, Б. Савић, Н. Јездимировић, Ђ. Цветојевић, Ј. Курељушић, О. Радановић, Д. Јакић-Димић¹

МИКОТИЧНИ РУМИНИТИС, ОМАЗИТИС И АБОМАЗИТИС КОД ВИСОКОМЛЕЧНЕ КРАВЕ

Кратак садржај

Појава гљивичних инфекција код домаћих животиња, укључујући и прежива-ре, данас добија све више на значају, пре свега због неконтролисане примене антибиотика и кортикостероида у терапији, као и због неких вирусних инфекција код којих постоји имуносупресија. Поред тога, ацидоза бурага је предиспонирајући фактор за умножавање гљивица и њихову трансепителну пенетрацију, са последичним развојем гљивичне инфекције не само преджелудаца него и абомазуса.

У овом раду испитане су лезије румена, омазуса, абомазуса и јетре код краве, угинуле седам дана после партуса, а код које је заживотно установљена ацидоза румена и антитела против вируса говеђе вирусне дијареје и говеђег херпес вируса тип 1. Након угинућа, извршена је обдукција краве, а узорци алтерисаног ткива румена, омазуса, абомазуса и јетре узорковани су за миколошко и хистопатолошко испитивање.

Макроскопске промене на слузници румена и омазуса манифестовале су се у виду мултифокалних округлих црвених жаришта. Њихову микроскопску слику код бојења ХЕ методом карактерисала је вакуоларна дегенерација епитела, неутрофилна инфилтрација ламине проприје и инфаркти као последица тромбозе крвних судова. Лезије абомазуса имале су слику мултиплих улцерација, што је микроскопски код бојења ХЕ методом одговарало коагулационој некрози. Јетра је са сликом масне метаморфозе односно са центробуларном интрацитоплазматском вакуолизацијом хепатоцита. Хистолошким анализом испитиваних органа обојених *Grocott* методом доказане су септиране и несептиране хифе гљивица у крвним судовима и периваскуларно. Из органа са описаним лезијама изоловане су гљивице *Aspergillus fumigatus* и *Mucor spp.*

¹ Др Бранислав Курељушић, др Војин Иветић, др Божидар Савић, др вет. мед. Немања Јездимировић, др вет. мед. Ђорђе Цветојевић, др вет. мед. Јасна Курељушић, мр Оливер Радановић, др Добрила Јакић-Димић, Научни институт за ветеринарство Србије, Београд, Војводе Тозе 14.

У овом случају, вероватно је ацидоза бурага фаворизовала пролиферацију гљивица, а промењени епител олакшао њихов улазак у крвне судове, са последичном тромбозом крвних судова и улцерогенезом.

Кључне речи: руминитис, омазитис, абомазитис, крвава.

Б. Kureljušić, V. Ivetić, B. Savić, N. Jezdimirović, Đ. Cvetojević, J. Kureljušić, O. Radanović, D. Jakić-Dimić¹

MYCOTIC RUMINITIS, OMASITIS AND ABOMASITIS IN HIGH-YIELDING DAIRY COW

Abstract

The occurrence of mycotic infection in domestic animals, including ruminants, is getting more important, especially due to the uncontrolled use of antibiotics and corticosteroids in the therapy, as well as some viral infections which induce immunosuppression. In addition, rumen acidosis is a predisposing factor for reproduction of fungi and their transepithelial penetration, with subsequent development of a fungal infection, which includes both forestomach and abomasus.

In this work, we investigated lesions of rumen, omasum, abomasum and liver in cow, died seven days after parturition in which we established rumen acidosis and antibodies against bovine viral diarrhea virus and bovine herpes virus type 1 during the life. After death, necropsy was performed and samples of altered tissue of rumen, omasus, abomasus and liver were sampled for mycological and histopathological examination. Gross lesions in rumen and omasus were manifested as multifocal round red foci on the mucosal surface. Their microscopic image in HE staining method was characterized by vacuolar degeneration of the epithelium, neutrophilic infiltration of lamina propria and infarcts as a result of thrombosis of blood vessels. Abomasal lesions reveals a picture of multiple ulcerations, which in HE staining method corresponded coagulation necrosis. The liver is characterized by changes characteristic for fatty metamorphosis, respectively with intracytoplasmic vacuolization of centrolobular hepatocytes. Histological analysis of altered organs stained by *Grocott* method revealed septed and not septed fungal hyphae in blood vessels and in perivascular tissue. From organs with described lesions fungi *Aspergillus fumigatus* and *Mucor spp.* were isolated.

In this case, it is likely that ruminal acidosis favored proliferation of fungi, while altered epithelium facilitated their entry into the blood vessels, with subsequent thrombosis of blood vessels and ulcerogenesis.

Keywords: ruminitis, omasitis, abomasitis, cow.

УВОД

Појава гљивичних инфекција код домаћих животиња, укључујући и преживаре, данас добија све више на значају, пре свега због неконтролисане примене антибиотика и кортикостероида у терапији, као и због неких вирусних инфекција код којих постоји имуносупресија (Chihayak и сар., 1988; Sweeney и сар., 1989). Вирус говеђе дијареје и инфективног говеђег ринотрахеитиса могу створити инцијалне лезије на слузници гастроинтестиналног система и тако створити предуслове за настанак гљивичне инфекције (Jensen и сар., 1994; Bazargani, 2008). Поред тога, ацидоза бурага је предиспонирајући фактор за умножавање гљивица и њихову трансепителну пенетрацију, са последичним развојем гљивичне инфекције не само преджелудаца него и абомазуса и јетре (Ohshima и сар., 1976). Описани су и случајеви септичних стања код којих долази до рефлукса киселог садржаја абомазуса у преджелуце и стварања предуслова за умножавање гљивица. Осим тога, контаминирана храна може бити извор инфекције гљивицама, као и стрес у постпарталном периоду (Jensen и сар., 1994). Опортунистичке гљивице из

групе зигомицета, као што су родови *Mucor*, *Rhizopus* и *Absidia* су најчешће узрочници лезија у преджелуцима и абомазусу, мада и *Aspergillus* врсте такође могу имати значаја. У основи патогенезе дешава се тромбоза артериола и венула тунике субмукозе као последица инвазије хифа гљивица, узрокујући хеморагичне инфаркте у захваћеном ткиву. Запаљенски процес се понекад може проширити и на перитонеум, доводећи до хеморагичног или фибринозног перитонитиса. У тежим случајевима, могу бити захваћени већи део вентралне бурагове кесе, делови ретикулума и/ или омазуса. Лезије на слузници преджелудаца изгледају као масивни хеморагични инфаркти са добро израженом демаркационом зоном у виду конгестије. Лезије у абомазусу имају некротични центар окружен хеморагично-конгестираним рубом дијаметра од 1 до 2 цм. Хистолошким испитивањем налази се некроза слузнице, а врло често и субмукозе, уз умерени леукоцитарни инфилтрат, а хифе гљивица се редовно налазе у некротичном ткиву и лумену тромбозованих крвних судова. У хроничним случајевима постоји грануломатозна инфламација слузнице. Метастазе гљивица су понекад могуће у јетри, где долази до

некротичног тромбофлебитиса пор-
тних крвних судова, што се макроско-
пски уочава као мала ирегуларна
подручја инфарцирања окружена хи-
перемичним маргинама (Brown и сар.,
2007).

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

У овом раду испитане су лезије руме-
на, омазуса, абомазуса и јетре код краве,
угинуле седам дана после партуса, а код
које је заживотно установљена ацидоза
румена и антитела против вируса говеђе
вирусне дијареје и говеђег херпес вируса
тип 1. Након угинућа, извршена је обду-
кција краве, а узорци алтерисаног ткива
румена, омазуса, абомазуса и јетре узро-
ковани су за хистопатолошко и миколо-
шко испитивање.

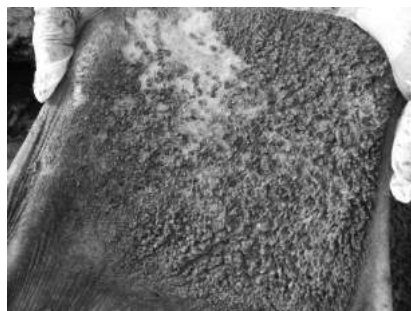
Узорци румена, омазуса, абомазуса
и јетре за хистопатолошки преглед су
фиксирани у 10% пуферизованом
формалину, процесовани стандард-
ним поступком и уклопљени у пара-
финске блокове. Парафински исечци
ткива дебљине 5 μm бојени су
хематоксилин-еозин (ХЕ) и *Grocott*
методом.

Узорци румена, омазуса и абомаз-
зуса за миколошко испитивање су
инокулисани на *Sabouraud* декстрозни
агар и инкубисани на температури од
25°C у аеробним условима у сврху
изолације инфективног агенса. Да би
се избегла бактеријска контаминација,
подлози је додато 20 IU/ml пеницили-
на Г и 40 $\mu\text{g/ml}$ стрептомицин сулфа-
та. Макроскопска и микроскопска ис-

питивања израслих колонија су извр-
шена према Quinn (2002).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Микотични руминитис се каракте-
рисао дифузном десквамацијом епи-
тела мукозе, крвављењем и некрозом
папила и ерозијама (слика 1).



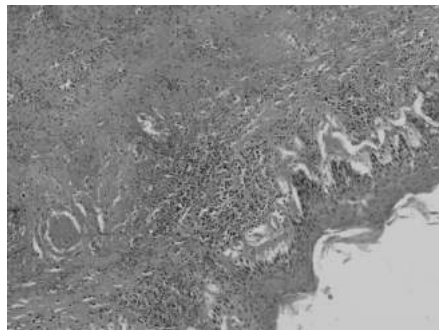
Слика 1. Румен краве – микотични
руминитис

Овакве лезије су установљене у
највећем делу вентралне бурагове
кесе. Сличан налаз описује и Thomson
(1967). Објашњење за овакву дистри-
буцију лезија највероватније лежи у
чињеници да је слезница овог дела ру-
мена континуирано потопољена у те-
чном киселом садржају који има на-
дражајни ефекат. У омазусу су, поред
изражене десквамације епитела муко-
зе и хеморагично инфирцираних жа-
ришта, установљене и улцерације, које
прогредирају у тоталне перфорације
ламина омазуса односно у фенестри-
ране некрозе (слика 2).



Слика 2. Омазус краве – микотични омазитис са перфорацијом ламине омазуса

Jensen и сар. (1994) сматрају да је таргет орган за гљивичну инфекцију управо омазус, јер су у њему, према њиховом истраживању, микотичне лезије биле најучесталије. У нашем истраживању најинтензивније лезије су нађене у омазусу. Разлог за ово је највероватније у танком зиду ламина омази и њиховим снажним контракцијама, као и демаркационом запаљењу око некротичних огњишта. Хистопатолошким испитивањем узорака румена и омазуса обојених хематоксилин-еозин методом, установљена је вакуоларна дегенерација епитела, паракератоза и умерени инфилтрат у ламини проприји састављен претежно од неутрофилних гранулоцита (слика 3).



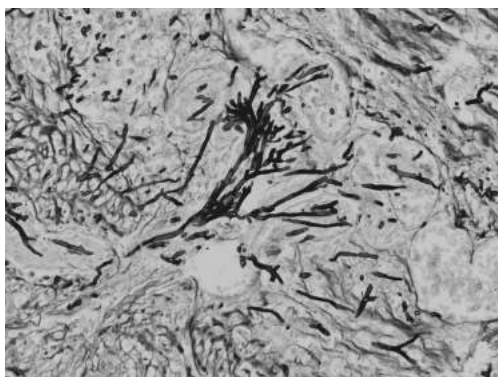
Слика 3. Румен краве – паракератоза и умерени инфилтрат у ламини проприји састављен претежно од неутрофилних гранулоцита, ХЕ, X200

Овакве лезије настају као последица ацидозе, а вакуоларна дегенерација епитела као примарна лезија касније прогредира у руптуру појединачних епителних ћелија, што води настанку ерозија које представљају улазна врата за инвазију бактерија и гљивица (Ohshima и сар., 1976). Налаз у абомазусу је упућивао на микотични улцерозни абомазитис (слика 4).



Слика 4. Абомазус краве – микотични улцерозни абомазитис

Улцерације су мултипле, округлог облика, понекад конфлуирају, а заступљене су на корпусном и пилорусном делу абомазуса. Карактерисао их је некротични центар са дубоко екскавираним дефектом и хиперемично-хеморагични руб, који проминира изнад улкуса и делимично им сужава отвор. Brown и сар. (2007) описују сличне лезије код краве са микотичним абомазитисом проузрокованим са зигомицетама. Хистопатолошким испитивањем узорака абомазуса са улцерацијама установљена је коагулациона некроза у подручју улцерације, тромбоза крвних судова ламине проприје и умерени запаљенски инфилтрат. Хистопатолошком анализом, у узорцима ткива румена, омазуса и абмазуса обојених *Grocott* методом, доказане су септиране и несептиране хифе гљивица у крвним судовима и околном ткиву тунике мукозе и субмукозе (слика 5).



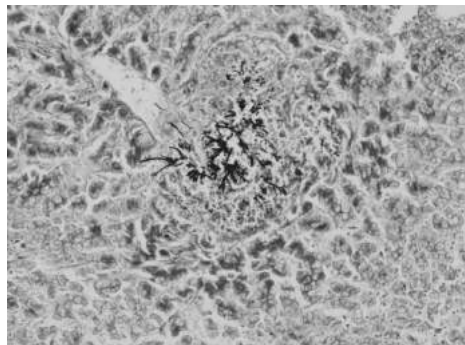
Слика 5. Абомазус краве – септиране и несептиране хифе гљивица у крвним судовима и околном ткиву тунике субмукозе, *Grocott*, X400

Познато је да вазоактивне гљивице (зигомицете), као што су родови *Mucor*, *Absidia* и *Rhizopus*, а ретко и *Aspergillus*, могу да изазову тромбозу крвних судова и последичну исхемију са развојем улцерозних промена (Jensen и сар., 1994; Brown и сар., 2007). Јетра је била увећана, заобљених рубова, браон-жуте боје, одајући утисак масне метаморфозе (слика 6).



Слика 6. Јетра краве – масна метаморфоза

Хистопатолошком анализом јетре у узорцима обојеним ХЕ методом, установљена је централобуларна интрацитоплазматска вакуолизација хепатоцита и фокална подручја некрозе инфилтрирана полиморфонуклеарним гранулоцитима, а у узорцима јетре обојеним *Grocott* методом и хифе гљивица у некротичним подручјима (слика 7).



Слика 7. Јетра краве – хифе гљивица у некроичним фокусима, Grocott, X200

Налаз хифа у јетри се може објаснити хематогеном метастазом процеса из преджелудаца, што је и описано у литератури (Brown и сар., 2007). Истовремену појаву агенса у ткиву јетре и румена неки аутори описују као руминитис-хепатитис комплекс (Baumgärtner, 2007). Из описаних лезија румена, омазуса и абомазуса изоловане су гљивице *Aspergillus fumigatus* и *Mucor spp.* Могуће је да је у овом случају дошло до прекомерне пролиферације гљивица као последица ацидозе румена и/или као последица контаминације силаже са *Aspergillus fumigatus* и *Mucor spp.* Поред тога, ацидоза бурага је предиспонирајући фактор за умножавање гљивица и њихову трансперитонеалну пенетрацију, са последичним развојем гљивичне инфекције не само преджелудаца него и абомазуса. Сасвим је извесно да су вирус бовине вирусне дијареје и вирус инфективног бовиног ринотрахеитиса, иако нису изазвали клиничке манифестације код ове краве, имали имуносупресивно

дејство и допринели патогенези микотичног руминитиса и абомазитиса.

ЗАКЉУЧАК

Ацидоза бурага, проузрокујући хемички руминитис, ствара предуслове за развој микотичног руминитиса, омазитиса и абомазитиса, па чак и микотичног хепатитиса. Они се манифестују у виду хеморагично-некротичних огњишта и мултипних улцерација, као последица тромбозе крвних судова, узроковане ангиоинвазивним гљивицама које се у хистолошким препаратима успешно откривају методом Grocott бојења.

ЗАХВАЛНОСТ: Рад је подржан од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, кроз пројекте ТР 31062 и ИИИ 46009.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baumgärtner W. (2007): *Pathohistologie für die Tiermedizin*, Enke Verlag, Stuttgart.
2. Bazargani T. T., Hemmatzadeh F., Nadjafi J., Sadeghi Nasab A. (2008): *BVDV induced gastro-neuropathy outbreak in a feedlot calves around Tehran (Iran)*, Iranian Journal of Veterinary Research 9: 271–276.
3. Brown C. C., Baker D. C., Barker I. K. (2007): *The alimentary system*. In: Jubb K. F., Kennedy P. C. and Palmer N. editors. *Pathology of domestic animals*. Vol 5th ed. Academic Press, San Diego. USA. 1–297.

4. Chihayak Y., Matsukawsa K., Mizushima S., Matsui Y. (1988): *Ruminant forestomach and abomasal mucormycosis under rumen acidosis*, Vet Pathol 251: 119–123.
5. Jensen H. E., Olsen S. N., Aalbek B. (1994): *Gastrointestinal aspergillosis and zygomycosis of cattle*, Vet Pathol 31: 28–36.
6. Ohshima K., Miura S., Seimiya Y., Chihaya Y. (1976): *Pathological studies on mucormycosis of the forestomach and abomasum in ruminants: a report on six cases complicated with candidiasis or pulmonary aspergillosis*, Jpn J Vet Sci 38: 269–280.
7. Quinn P. J., Markey B. K., Carter M. E., Donnelly W. J. C., Leonard F. C. (2002): *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Blackwell Science Ltd., Iowa State University Press.
8. Sweeney R. W., Divers T. J., Gillette D. M., Whitlock R. H (1989): *Mycotic omasitis and rumenitis as sequelae to sepsis in dairy cattle: six cases (1979–1986)*, J Am Vet Med Assoc 194(4): 552–3.
9. Thomson R. G. (1967): *Rumenitis in cattle*, Can Vet Jour 8: 189–192.



DOI: 10.7251/VJRS1302211S

UDK 363.085.2:636.2

Ж. Сладојевић,¹ Д. Кировски,² Х. Шаманц²

УТИЦАЈ ЕНЕРГЕТСКОГ ДОДАТКА НА БАЗИ ГЛИЦЕРОЛА НА ТЈЕЛЕСНУ КОНДИЦИЈУ ВИСОКОМЛИЈЕЧНИХ КРАВА

Кратак садржај

Циљ рада је био да се утврди утицај енергетског додатка на бази глицерола на тјелесну кондицију крава. Петнаест дана прије тељења одабрано је 80 крава подијељених у двије групе од по 40 крава: контролну и огледну. Кравама огледне групе је у последње двије недјеље засушења и до 60. дана лактације додаван у храну енергетски додаток на бази глицерола. Оцјена тјелесне кондиције (ОТК) одређена је 15 дана прије, као и 7, 30 и 60 дана после тељења. Краве огледне групе су имале значајно вишу вриједност ОТК у односу на контролну групу само 7. дана лактације. Разлика у ОТК између периода засушења и пуерперијума је била у оквиру физиолошки дозвољеног опсега вриједности код огледне групе, док је код контролне групе била виша од дозвољеног, указујући да је код огледних крава постпартални негативан биланс енергије био слабије изражен.

Кључне ријечи: енергетски додаток, високомлијечне краве, тјелесна кондиција.

Ž. Sladojević,¹ D. Kirovski,² H. Šamanc³

EFFECT OF GLYCEROL BASED ENERGY SUPPLEMENTATION ON BODY CONDITION SCORE OF DAIRY COWS

The objective of the investigation presented in this study was to establish the effects of a glycerol-based energy supplement in the diet of high-yield dairy cows on their body condition. Eighty cows were selected 2 weeks before calving, and they were divided into two groups with 40 cows: control and experimental. Cows of

¹ Ветерина систем Сладојевић, д.о.о., Градиште, Република Српска.

² Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Београд, Србија.

the experimental group orally received glycerol based energy supplement during the final two weeks of the dry period until the day 60 of lactation. Body condition scoring (BCS) was done 15 days before and 7, 30 and 60 days after calving. Experimental cows had significantly higher BCS only on day 7 after calving compared to control group. Difference in BCS between dry and puerperal period was within physiological value in experimental but higher than physiologically accepted in control group, indicating that negative energy balance in experimental cows was not so pronounced.

Key words: energy supplement, high-yield dairy cows, body condition.

УВОД

Савремена говедарска производња тежи што већој производњи меса и млијека, која је условљена све већим порастом броја становника на нашој планети. Циљеви високе производње млијека су условљени добрим менаџментом на фармама високомлијечних крава, који је основа профитабилности, доброг здравља и репродуктивног статуса крава. Најкритичнији период у производно-репродуктивном циклусу високомлијечних крава је перипартални период, који означава прелазак из стања високог гравидитета у фазу ране лактације (Overton и Waldron, 2004). Током перипарталног периода, врши се престројавање енергетског и метаболичког статуса крава, који је условљен ендокриним промјенама чији је задатак прилагођавање организма на високу производњу млијека. Неадекватна исхрана у периоду засушења и велика угојеност крава доприносе тежем преструктурисању метаболичког и ендокриног меха-

низамa те доводе до метаболичких болести, од којих су најважније: масна јетра, кетоза, субакутна ацидоза бурага, пуерперална пареза, дислокација сиришта на лијеву и десну страну, те репродуктивни и имунолошки поремећаји (Oetzel, 2004). У процјени енергетског статуса високомлијечних крава користи се више параметара, од којих су најважнији метаболички и ендокрини (концентрације глукозе, бета-хидрокси-бутерне киселине, неестерификованих масних киселина, укупног билирубина, укупног протеина, албумина, инсулина, тиреоидних хормона и инсулину сличног фактора раста – 1), као и оцјена тјелесне кондиције крава (Шаманц и сар., 2011). Негативан енергетски биланс који је изражен у раној лактацији, а утврђује се на основу метаболичких и ендокриних показатеља у крвном серуму крава може се процијенити још у фази касног гравидитета кад је биланс енергије позитиван. Прилагођавање организма на високу производњу млијека почиње још у фази касног

гравидитета са појавом повећане липомобилизације масних киселина из тјелесних депоа. Будући да је са повећаном концентрацијом неестерификованих масних киселина (NEFA), повишена и концентрација глукозе у крви, сматра се да је у том периоду очувана метаболичка равнотежа организма. Код неких животиња, управо у том периоду појачава се липомобилизација и долази до појаве масне јетре прије него што животиња уђе у стање негативног биланса енергије, што доводи до појаве болесног стања.

Физиолошки прихватљива концентрација NEFA у крви крава треба да износи до 0,7 ммол/л, при чему она у крви крава у високом гравидитету треба да буде нижа од 0,4 ммол/л (Bobe и сар., 2004). Краве са клиничким знацима кетозе имају концентрацију NEFA вишу од 1,5 ммол/л (Ospina и сар., 2010). Посебни закључци о енергетском метаболизму високомлечних крава током перипарталног периода се могу извести посматрањем односа NEFA и глукозе препартално, те NEFA и триглицерида постпартално (Шаманц и сар., 2005). Уколико је у високом гравидитету метаболизам крава уравнотежен, упоредо са повећањем NEFA повећава се и концентрација глукозе у крви. Вриједности гликемије ниже од 2,77 ммол/л у посљедњој недељи гравидитета указује на веће оптерећење организма. Такође, постпартално повећана концентрација NEFA уз смањење концентрације триглицерида у крви

указује на то да је метаболизам масти усмјерен ка негативном правцу и да је процес липомобилизације и замашћења јетре у току. Мобилисане NEFA из масног ткива као извор енергије или се уграђују у млијечну маст или доспијевају у јетру пропорционално њиховој концентрацији у крви оксидисане до угљен диоксида; (2) могу бити дјелимично оксидисане до кетонских тијела или ацетата који одлазе у циркулацију и служе као извор енергије; (3) могу бити поново естерификоване, када формирају триглицериде или фосфолипиде. Створени триглицериди се из јетре екскретују уз помоћ липопротеина мале густине (VLDL). Смањена синтеза VLDL настаје због замашћења јетре, као и недостатка карнитина, који омогућава транспорт дуголанчаних масних киселина у митохондрије и њихово сагорјевање, што доводи до још већег степена замашћења јетре (Grummer и сар., 2008). Наведени процеси су везани за тјелесну кондицију крава у засушењу и пуерперију, те за начин исхране крава у засушењу, па је управо због тога процјена тјелесне кондиције крава у ова два периода веома важан показатељ енергетског статуса животиње. Краве у оптималној тјелесној кондицији брже се опорављају после тељења и у краћем временском периоду могу да успоставе енергетску равнотежу у односу на производне способности организма. Имајући то у виду, праћење тјелесне кондиције би могло да буде поуздан показатељ енергетског статуса, поготово у перипартал-

ном периоду. Поступком познатим као оцјена тјелесне кондиције (ОТК) одређују се тјелесне резерве, односно релативне резерве супкутаног масног ткива или енергетски депо музних крава. Идеални периоди за оцјену тјелесне кондиције крава су: тељење, 5 до 6 недјеља после тељења – врхунац производње млијека, 150 до 200 дана после тељења и засушење.

Циљ овог рада био је да се на основу оцјене тјелесне кондиције процијени енергетски статус крава које су у периоду око тељења примале енергетски додаток на бази глицерола.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Циљ рада је да се утврди утицај енергетског додатка на бази глицерола на тјелесну кондицију крава. На петнаест дана прије тељења одабрано је 80 крава, подијељених у двије групе по 40 крава, огледну и контролну. Огледној групи је додаван енергетски додаток на бази глицерола 15 дана прије очекиваног термина тељења у дози 250 мл перорално, до 60. дана после тељења свакодневно у дози 300 мл перорално. Обје групе крава су добијале потпуно измјешан оброк два пута дневно, при чему су састав и количина obroка били усклађени са производно-репродуктивним статусом крава. Овим додатком је обезбијеђено 9,30 MJ NEL током засушења, као и 13,95 MJ NEL током лактације (EnergyTop, Biochem GMBH, Germany). Контролна група није добијала енергетски додаток. Оцјена тјелесне кон-

диције (ОТК) извршена је према систему Elanco Animal Health Buletin A1 8478. За оцјену тјелесне кондиције кориштене су методе палпације и ад-спекције пет најважнијих анатомских регија: слабинска регија, регија коријена репа, регија сједних кврга, регија сапи и регија кукова. Према овом систему, ОТК се изражава нумерички од 1 до 5 поена. Свака промјена у тјелесној кондицији за један поен подразумева промјену тјелесне масе за 55 до 75 килограма. На основу добијених података, израчунава се просјечна вриједност и одступања у односу на физиолошке вриједности за поједине фазе производног циклуса. Физиолошке вриједности ОТК за краве у засушењу износи 3,25–4,00, за пуерперални период 3,25–3,75, док за период ране лактације износи 2,50–3,25. Такође је обрачуната и разлика ОТК између засушења и перперијума и она се сматра физиолошки прихватљивом до вриједности 0,7.

Добијени подаци обрађени су дескриптивним статистичким параметрима, од којих су табеларно приказани аритметичка средина ($\bar{x}$) и стандардна девијација (SD). За анализу степена значајности разлика испитиваних параметара кориштен је Студентов „t“ тест.

РЕЗУЛТАТИ

У табели 1.1. приказана је ОТК код крава контролне и огледне групе и статистичка значајност разлике између и унутар група крава.

Табела 1.1. Просјечне вриједности ОТК ($X \pm SD$) крава

	ОТК		Физиолошке вриједности
	Контролна група	Огледна група	
Засушење	$3,51 \pm 0,37$	$3,42 \pm 0,33$	3,25–4,00
Пуерперијум	$2,76 \pm 0,38^{aaa}$	$2,98 \pm 0,22^{***aaa}$	3,25–3,75
30. дан лактације	$3,07 \pm 0,30^{aaabbb}$	$2,96 \pm 0,19^{aaa}$	2,50–3,25
60. дан лактације	$3,12 \pm 0,25^{aaabbb}$	$3,01 \pm 0,17^{aaa}$	2,50–3,25

*** $p < 0,001$ у односу на вриједности одређене код контролне групе крава; ^{aa} $p < 0,01$ у односу на вриједности одређене код огледне групе крава; ^{aaa} $p < 0,001$ у односу на вриједности одређене у засушењу (15. дана прије тељења) код исте групе крава; ^{bbb} $p < 0,001$ у односу на вриједности одређене у пуерперијуму (7. дан лактације) код исте групе крава.

Из табеле 1.1. се запажа да није било значајне разлике у ОТК између двије испитиване групе крава у засушењу (15. дана прије тељења), 30. и 60. дана лактације. Једино су краве огледне групе у пуерперијуму, односно 7. дана лактације, имале вишу вриједност ОТК у односу на краве контролне групе ($p < 0,05$). Код обје групе крава је одмах након тељења дошло до значајног смањења тјелесне кондиције ($p < 0,001$, поје-

диначно), која је била значајно мања у односу на период засушења и 30. ($p < 0,001$, појединачно) и 60. дана лактације ($p < 0,001$, појединачно). Код крава контролне групе је у односу на пуерперални период ОТК била значајно виша 30. дана ($p < 0,001$) и 60. дана лактације ($p < 0,001$).

У табели 1.2. приказане су разлике у просјечној оцјени тјелесне кондиције између засушења (15. дана прије тељења) и пуерперијума.

Табела 1.2. Разлике у оцјени тјелесне кондиције између засушења (15. дана прије тељења) и пуерперијума (7. дан лактације)

	РАЗЛИКА У ОТК		Физиолошке вриједности
	Контролна група	Огледна група	
Засушење/ пуерперијум	$0,80 \pm 0,51$	$0,43 \pm 0,34^{***}$	< 0,7

*** $p < 0,001$ у односу на вриједности одређене код контролне групе крава

Из резултата приказаног у табели 1.2. запажа се да је разлика у ОТК између периода засушења и пуерперијума код огледне групе крава била у оквиру физиолошких вриједности, док је код контролне групе ова разлика била већа

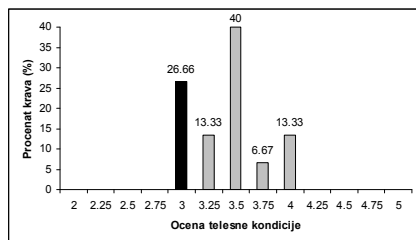
од физиолошки дозвољених вриједности између засушења и пуерперијума.

Ради боље прегледности дистрибуција ОТК унутар група, вриједности су приказане графички, на графиконима од 1.1. до 1.4. На графикону 1.1.

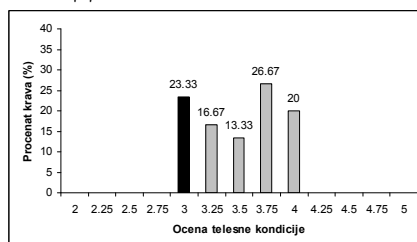
приказана је дистрибуција појединачних ОТК унутар група у засушењу, односно 15. дана прије очекиваног термина тељења.

Графикон 1.1. Проценштална засиуиљеност крава различите тјелесне кондиције 15 дана прије очекиваној тељења

КОНТРОЛНА ГРУПА



ОГЛЕДНА ГРУПА



НАПОМЕНА: Црни правоугаоници означавају оцене тјелесне кондиције ван опсега физиолошких вриједности за овај период производно-репродуктивног циклуса.

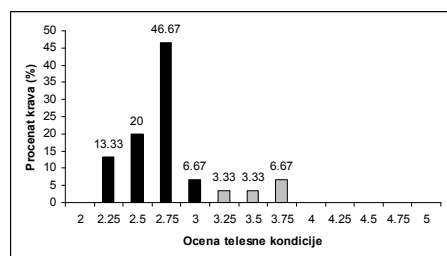
Из графикана 1.1. се запажа да је код обје групе крава већина јединки у периоду засушења имала оптималну тјелесну кондицију. Код контролне групе, 26,33% јединки је имало тјелесну кондицију нижу од физиолошки дозвољене, док је код огледне групе

23,33% јединки имало тјелесну кондицију нижу од физиолошки дозвољене.

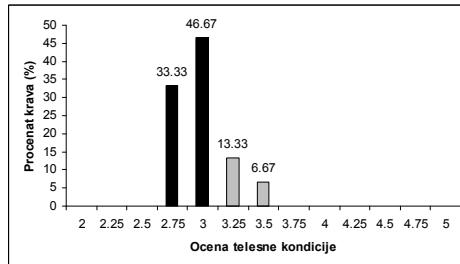
На графикону 1.2. приказана је дистрибуција појединачних ОТК унутар група у пуерперијуму, односно 7. дана лактације.

Графикон 1.2. Проценштална засиуиљеност крава различите тјелесне кондиције седам дана после тељења

КОНТРОЛНА ГРУПА



ОГЛЕДНА ГРУПА



НАПОМЕНА: Црни правоугаоници означавају оцене тјелесне кондиције ван опсега физиолошких вриједности за овај период производно-репродуктивног циклуса.

Из графикана 1.2. се запажа да је 86,47% крава контролне групе имало тјелесну кондицију испод физиолошки дозвољеног опсега вриједности за

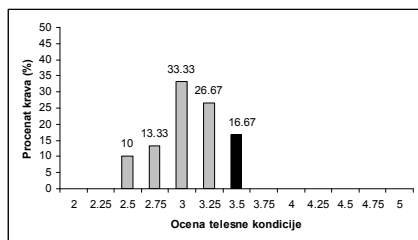
период пуерперијума, док је у огледној групи 80% крава имало ОТК испод физиолошког опсега вриједности. Додатно, у огледној групи крава,

ниједна јединка није имала ОТК нижу од 2,75, док је код контролне групе 30,33% крава имало вриједности ОТК 2,5 односно 2,25.

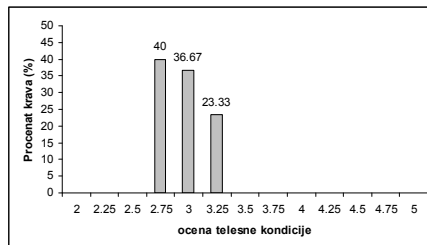
На графикону 1.3. приказана је дистрибуција појединачних ОТК унутар група 30. дана лактације.

Графикон 1.3. Процентуална заступљеност крава различите тјелесне кондиције 30 дана после шелења

КОНТРОЛНА ГРУПА



ОГЛЕДНА ГРУПА



НАПОМЕНА: Црни правоугаоници означавају оцјене тјелесне кондиције ван опсега физиолошких вриједности за овај период производно-репродуктивног циклуса.

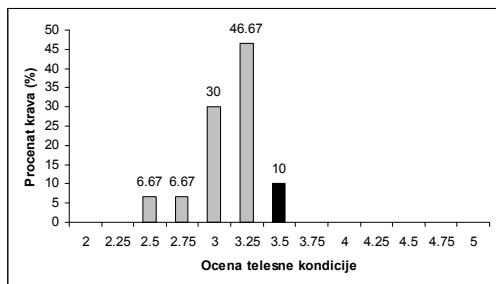
Из графикона 1.3. се запажа да су све краве огледне групе имале ОТК унутар физиолошког опсега вриједности, док је код огледне групе 16,67% крава имало ОТК већу од физиолошки

прихватљивих вриједности за овај период.

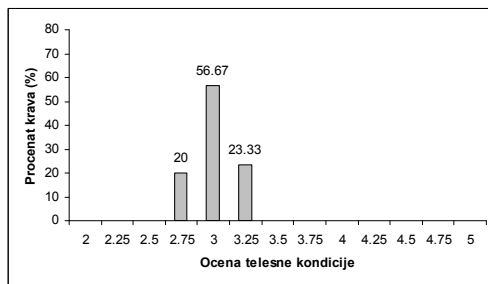
На графикону 1.4. приказана је дистрибуција појединачних ОТК унутар група 60. дана лактације.

Графикон 1.4. Процентуална заступљеност крава различите тјелесне кондиције 60 дана после шелења

КОНТРОЛНА ГРУПА



ОГЛЕДНА ГРУПА



НАПОМЕНА: Црни правоугаоници означавају оцјене тјелесне кондиције ван опсега физиолошких вриједности за овај период производно-репродуктивног циклуса.

Из графикона 1.4. се запажа да су све краве огледне групе имале ОТК унутар физиолошког опсега вриједности, док је

код огледне групе 10% крава имало ОТК већу од физиолошки прихватљивих вриједности за овај период.

ДИСКУСИЈА И ЗАКЉУЧЦИ

Тјелесна кондиција крава је један од клиничких показатеља промета енергије и енергетског статуса јединке (Шаманц и сар., 2008; Roche и сар., 2009; Thourr и сар., 2012). Најзначајније промјене у тјелесној кондицији настају у перипарталном периоду, али се сматра да губитак у тјелесној маси у том периоду не би требало да буде већи од 10% до 12%, односно изражено у оцјени тјелесне кондиције то износи до 0,5 односно 0,7 поена (Шаманц и сар., 2010). Резултати досадашњих испитивања су показали да тјелесна кондиција крава у перипарталном периоду има пресудну улогу у процесу хормоналног и метаболичког прилагођавања крава у раној фази лактације (Morrow, 1976; Brugere-Picoux и Brugere, 1980; Шаманц и сар., 2010). У засушењу, краве могу да буду у товној кондицији, мада када им је тјелесна кондиција и у оптималним границама, резерве масти се могу користити као допунски извор енергије. Степен коришћења тјелесних резерви може да буде далеко већи него што су настале енергетске потребе и неријетко се због тога животиње теже прилагођавају на негативан биланс енергије. У ријетким случајевима, као посљедица настају болесна стања, краве нагло мршаве све до исцрпљивања, па и угињућа (Morrow, 1976). Ако се анализирају резултати испитивања тјелесне кондиције крава укључених у овај оглед, онда се уочавају јасне разлике између вриједности добијених код

крава огледне у односу на краве контролне групе. Наиме, код обје групе крава у антепарталном периоду просјечне вриједности за ОТК су биле приближно исте и са веома малим индивидуалним варијацијама. После партуса, просјечна оцјена ОТК се значајно смањила у односу на вриједности добијене у антепарталном периоду, али је то смањење код крава контролне групе било просјечно 0,80 поена, што је више од препоручене разлике и значајно више него код крава огледне групе код којих је смањење просјечне вриједности ОТК од антепарталног периода до пуерперијума износило 0,43 поена. Такође, код крава огледне групе нису установљене веће варијације у вриједностима ОТК 30. и 60. дана лактације, што није био случај код крава контролне групе. То се може још јасније запазити на графиконима, гдје су приказане дистрибуције вриједности ОТК унутар група у различитим фазама производно-репродуктивног циклуса (графикони од 1.1. до 1.4). Имајући у виду резултате оцјене тјелесне кондиције крава, може се сматрати да је коришћење енергетског додатка имало утицај на процес прилагођавања енергетског метаболизма у перипарталном периоду, чиме су створени услови да се животиње брже опораве после тељења и оспособе за наступајућу лактацију.

Код високомлечних крава, најзначајније промјене у енергетском метаболизму настају управо у периоду око тељења, односно перипарталном периоду.

С обзиром на то да код преживара глюкоза није главни извор енергије, у ту сврху се највише користе масне киселине (Nafikov и Beitz, 2007). То је разлог што се у условима повећаних енергетских потреба као алтернативни извор енергије користе масне киселине из тјелесних депоа масти. С обзиром на то да јетра има кључну улогу у регулацији метаболизма масти, сасвим је јасно да интензивирање процеса липомобилизације увијек представља опасност за настајање мањег или већег степена замашћења јетре (Breukink и Wensing, 1997; Bobe и сар., 2004).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bobe G., Young J. W., Beitz D. C. (2004): *Invited review: pathology, etiology and treatments of fatty liver in dairy cows*, J Dairy Sci 87: 3105–3124.
2. Breukink H. J., Wensing T. H. (1997): *Pathophysiology of the liver in high yielding dairy cows and its consequences for health and production*, Israel J Vet Med 52: 66–72.
3. Brugere-Picoux J., Brugere H. (1985): *Le syndrome de la vache grasse*, Rec Med Vet 156, 195–200.
4. Grummer R. R. (2008): *Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle*, Vet J 176: 10–20.
5. Morrow D. A. (1976): *Fat cow syndrome*, J Dairy Sci 59: 1625–1632.
6. Nafikov R. A., Beitz D. C. (2007): *Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals*, J Nutr, 137: 702–5.
7. Oetzel G. R. (2004): *Monitoring and testing dairy herds for metabolic diseases*, Vet Clin North Am Food Anim Pract 20: 651–674.
8. Ospina P. A., Nydam D. V., Stokol T., Overton T. R. (2010): *Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: critical thresholds for prediction of clinical diseases*, J Dairy Sci 93: 546–54.
9. Overton T. R., Waldron M. R. (2004): *Nutritional management of transition dairy cows: J Dairy Sci, E. Suppl. strategies to optimize metabolic health*. E105–E119.
10. Šamanc H., Sinovec Z., Cernescu H. (2005): *Osnovi poremećaja prometa energije visokomlečnih krava*, Zbornik radova „Ishrana, reprodukcija i zdravlje goveda“, Subotica.
11. Šamanc H., Stojić V., Kirovski D., Jovanović M., Cernescu H., Vujanac I., Prodanović R. (2008): *Uticaj telesne kondicije krava na učestalost i stepen zamašćenja jetre*, Veterinarski glasnik, 62: 3–12.
12. Šamanc H., Kirovski D., Jovanović M., Vujanac I., Bojković-Kovačević S., Jakić-Dimić D., Prodanović R., Stajković S. (2010): *New insights into body condition score and its association with fatty liver in Holstein dairy cows*, Acta veterinaria Beograd, 60: 525–540.
13. Šamanc H., Kirovski D., Stojić V., Stojanović D., Vujanac I., Prodanović R., Bojković-Kovačević S. (2011): *Application of metabolic profile test in*

- the prediction and diagnosis of fattz liver in Holstein cows*, Acta Veterinaria Beograd 61: 543–553.
14. Thorup V. M., Edwards D., Friggens N. C. (2012): *On-farm estimation of energy balance in dairy cows using only frequent body weight measurements and body condition score*, J Dairy Sci 95: 1784–93.
15. Roche J. R., Friggens N. C., Kay J. K., Fisher M. W., Stafford K. J., Berry D. P. (2009): *Invited review: Body condition score and its association with dairy cows productivity, health, and welfare*, J Dairy Sci 92: 5769–801.



DOI: 10.7251/VJRS1302221P

UDK 636.082.312:636.2

Р. Продановић,¹ Х. Шаманц, Д. Кировски, И. Вујанац, Ж. Сладојевић²

НЕКИ АСПЕКТИ ЕТИОПАТОГЕНЕЗЕ ПОРЕМЕЋАЈА У ПОНАШАЊУ КРАВА У ФАРМСКИМ УСЛОВИМА ДРЖАЊА

Кратак садржај

Циљ рада био је да се утврди повезаност биохемијских параметара крви и стереотипног понашања крава. Испитивање је извршено на 80 Холштајн крава подељених у четири групе: засушење, пуерперијум, рана и касна лактација. Процена стереотипног понашања (игра језика) извршена је посматрањем животиња 2–4 часа након јутарњег храњења. У узорцима крви одређиване су концентрације најважнијих биохемијских параметара крви. Поремећаји у виду „игре језика“ су установљени код три од 20 животиња из пуерпералне групе крава када су установљене и значајно ниже вредности гликемије, протеинемije, уремije и магнезијемije у односу на антепарталне вредности. Концентрације билирубина су у том периоду биле изнад, а укупних протеина и магнезијума испод физиолошких вредности. Резултати указују на вероватну повезаност испитиваног стереотипног понашања и биохемијског састава крви.

Кључне речи: краве, стереотипна понашања, биохемија крви, хипомагнезијемја.

R. Prodanović, H. Šamanc, D. Kirovski, I. Vujanac, Ž. Sladojević

SOME ASPECTS OF THE ETIOPATHOGENESIS OF BEHAVIOUR PROBLEMS AMONG COWS IN INTESIVE HOUSING CONDITIONS

Abstract

The objective of this study was to determine the relationship between stereotyped behavior and selected biochemical parameters in dairy cows. A total of 80 Holstein cows were randomly assigned into one of 4 groups: dry, puerperal, early and late lactating. Evaluation of stereotypes (tongue rolling) was performed by observation of animals 2 to 4 hours after morning feeding. Blood samples were

¹ Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Београд, Србија.

² Ветерина систем Сладојевић, д.о.о., Градиште, Република Српска.

taken and analyzed for main biochemical parameters. Tongue rolling was established in 3 of 20 puerperal cows. Puerperal cows had significantly lower values for glicemia, proteinemia, uremia and magnesiemia compared to antepartal cows. Total protein and Mg were below, whereas total bilirubin was above physiological ranges. These results support the possibility to link blood changes to the occurrence of changed behaviour.

Key words: cows, stereotypies, biochemical parameters, hipomagnesiemia.

УВОД

Поремећаји у понашању се код говеда првенствено испољавају оралним стереотипијама, најчешће у виду „игре језика“, када животиње кружним покретима језика теже да дотичу делове коже образа, нарочито углове усана и слузокоже носних отвора (Rushen и сар., 2008). У популацијама говеда описане промене могу некада да буду присутне и код више од 10 посто животиња (Sato и сар., 1994). Погађа све старосне и производне категорије, како у условима стајског, тако, мада ређе, и пашног начина држања. Иако се учесталост стереотипија повећава са старашћу, појава „игре језика“ у запатима који воде порекло од одређених бикова, говори у прилог наследној предиспозицији овог поремећаја (Rosenberger, 1995). Овај поремећај је уочен код свих раса говеда, мада, према наводима из литературе, највише код Џерзеј расе. С обзиром на то да описани симптоми могу да се виде и код алотриофагије, неопходно је разграничити да ли су ове промене у понашању удружене или не са изопаченим апетитом (Adamesteanu, 1967).

Етиопатогенеза стереотипних понашања говеда је још увек недовољно расветљена и у неким случајевима потпуно непозната. Раније је преовладало мишљење да су разлике у темпераменту у популацијама гајеним на ограниченом простору најважнији предиспонирајући чинилац, поготово када је велики временски размак између два храњења. Као предиспонирајући чиниоци помињу се још и скучен простор, пренасељеност објекта, висока амбијентална температура и лоши хигијенски услови држања (Phillips, 2002). Међутим, код различитих врста животиња је доказано да, ако је састав оброка оптималан, сви поменути предиспонирајући фактори не доводе до испољавања оваквих промена у понашању (Lindstrom и Redbo, 2000). Због тога, у последње време све више се истиче да у основи стереотипних понашања могу да буду болести метаболизма удружене са дефицитом макро-и/или микроелемената у исхрани појединих категорија говеда (Redbo и сар., 1992). Има аутора који сматрају да би описане промене у понашању могле да буду последица недовољног при-

лагођавања ендокриног система у одговарајућим условима држања и исхране животиња. Ту се, пре свега, мисли на активност адренкортикалног система (Redbo, 1998). Такође, постоје докази да је склоност променама у понашању генетски одређена (Watt и Seller, 1993). Због свега наведеног, данас се претпоставља да у етиопатогенези „игре језика“ доминира комплексна интеракција између нестимулативних услова држања и рестриктивне исхране, због чега животиње нису у могућности да довољно дуго испољавају природне облике понашања.

Узимајући у обзир да је етиопатогенеза стереотипног понашања на фармама крава још увек недовољно разјашњена, циљ овог рада је био да се утврди да ли постоји веза између промењеног понашања крава и одступања у биохемијским параметрима крви. На тај начин би се могао дати прилог познавању узрока који доводе до овог типа промене понашања код говеда.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Смештај и исхрана животиња

На фарми високомлечних крава Холштајн расе, током месеца августа, испитивано је присуство стереотипног облика понашања. Овим испитивањем обухваћено је 80 животиња, првотелкиња и вишетелкиња, у четири фазе производно-репродуктивног циклуса (засушење, пуерперијум, рана и касна лактација). Из сваке од наведених фаза испитивања методом

случајног избора одабрано је по 20 крава. Испитиване животиње биле су смештене у стајама затвореног типа, и нису биле везане. Смештајни објекти били су опремљени вентилаторима и системима за орошавање. У свим фазама производно-репродуктивног циклуса на фарми животиње су добијале миксиран оброк два пута дневно у размаку од 10 часова.

Процена понашања

Процена понашања извршена је методом пажљивог посматрања животиња 2–4 часа након јутарњег храњења. Из техничких разлога, све животиње укључене у оглед биле су подељене у мање групе од по 10 крава, тако да је у посматрању сваке појединачне групе проведено 30 минута. За процену стереотипног понашања коришћени су критеријуми описани од стране Redbo (1992). Имајући у виду да је „игра језика“ доминантан облик стереотипног понашања код говеда, остали облици поремећаја у понашању нису били предмет испитивања.

Узимање узорака крви

Узорци крви узети су пункцијом вене југуларис од по осам крава из сваке групе животиња, односно крава у засушењу (између 15 и 7 дана пре тељења), пуерперијуму (до 40 дана после тељења), раној лактацији (до 120 дана после тељења) и касној лактацији (од 200 до 300 дана после тељења). У току узимања крви одређивана је концентрација глукозе и бета-хидрокси-бутерне киселине (ВНВА) комерција-

лним тест-тракама (*Precision-Xtra-plus*). У узорцима крвног серума одређиване су концентрације укупних протеина, албумина, урее, укупног билирубина и магнезијума фотометријском методом, коришћењем комерцијалних тест-пакета (*Bio-Medica*).

Статистичка обрада

Резултати испитивања обрађени су стандардним статистичким методама и израчунате су средње вредности и

стандардна девијација. За оцену статистичких значајности разлика средњих вредности примењен је непарни Студентов т-тест за степен поузданости од 95%.

РЕЗУЛТАТИ

Вредности појединих параметара метаболичког профила крава у засушењу, пуерперијуму, раној и касној лактацији приказани су у табели 1.

Табела 1. Параметри метаболичког профила крава у засушењу, пуерперијуму, раној и касној лактацији

Период испитивања	Параметри метаболичког профила						
	Глукоза mmol/l	ВНВА mmol/l	Укупни протеини g/l	Албумини g/l	Уреа mmol/l	Укупни билирубин μ mol/l	Mg mmol/l
Засушење	3,03 $\pm$ 0,15a	0,59 $\pm$ 0,05 a	70,88 $\pm$ 2,55 a	29,35 $\pm$ 1,21 a	6,80 $\pm$ 0,68 a	6,39 $\pm$ 0,48 a	0,81 $\pm$ 0,05 a
Пуерперијум	2,14 $\pm$ 0,16 б	0,94 $\pm$ 0,16 a	64,02 $\pm$ 1,28 б	26,16 $\pm$ 0,74 б	4,93 $\pm$ 0,14 б	10,34 $\pm$ 1,28 б	0,65 $\pm$ 0,04 б
Рана лактација	2,44 $\pm$ 0,11б	0,72 $\pm$ 0,08 a	71,50 $\pm$ 1,60 a	28,56 $\pm$ 0,67 a	7,14 $\pm$ 0,48 a	7,70 $\pm$ 1,46 аб	0,85 $\pm$ 0,05 a
Касна лактација	2,87 $\pm$ 0,11 a	0,59 $\pm$ 0,04 a	76,46 $\pm$ 1,37 a	27,70 $\pm$ 1,10 a	6,56 $\pm$ 0,54 a	7,73 $\pm$ 1,15 аб	0,89 $\pm$ 0,11 a

a,б – различита слова унутар колоне указују на постојање статистички значајне разлике на нивоу $p < 0,05$

Из резултата приказаних у табели 1. запажа се да су се просечне концентрације глукозе, ВНА, укупних протеина, албумина, укупног билирубина, урее и магнезијума у крвном серуму крава у периоду засушења, раној и касној лактацији налазиле у границама физиолошких вредности за говеда. Изузев вредности за концентрацију глукозе, није било статистички значајне разлике у вредностима ових параметара између наведених пе-

риода испитивања. У раном постпарталном периоду (пуерперијум), установљене су значајно ниже вредности гликемије, протеинемije, албуминемije, уремије и магнезијемije у односу на антепарталне вредности ($p < 0,05$), при чему су вредности гликемије и магнезијемije биле испод доње физиолошке границе. Истовремено, код ове групе крава утврђене су хипербилирубинемија и хиперкетонемија, јер су добијене вредности за

концентрације укупног билирубина и бета-хидрокси-бутерне киселине у крви крава биле веће од физиолошких вредности (Šamanc, 1995).

У периоду до 40 дана после тељења (пуерперијум), поремећаји у понашању у виду „игре језика“ су установљени код три од 20 посматраних животиња из тог периода (15%).

ДИСКУСИЈА

Поремећаји у понашању се знатно чешће јављају код крава држаних у интензивном узгоју него код крава у екстензивном узгоју. Разлог је то што се потребе животиња за испољавањем природних облика понашања често занемарују у интензивним системима држања (Rushen и сар., 2008). Најчешће су у питању неповољни утицаји начина држања и режима исхране, као и грешака у технолошком процесу узгоја крава на фармама, који не омогућавају животињама да довољно дуго испољавају природне облике понашања (Phillips, 2002; Corazzin и сар., 2010). Наиме, у интензивним условима производње, животиње мање времена проводе у узимању и преживању хране, често и због смањене количине кабастих хранива у оброку. Сматра се да у оваквим условима експлоатисања, непосредан повод за појаву стереотипног понашања представља незадовољена потреба за узимањем хране (Redbo и сар., 1996; Rushen и сар., 1998). Начин испољавања ових промена у понашању, као и чињеница да се јављају 2–4 часа након храњења,

говори у прилог овом становишту. Чини се да у таквим околностима пресудну улогу у регулисању потребе за узимањем хране, како наводе Redbo и Nordland (1997), има време проведено у узимању хране. То је вероватно разлог зашто се стереотиције знатно ређе јављају у природним условима гајења животиња.

Прелазак из периода засушења у фазу ране лактације доводи до драстичних промена у хормоналном, метаболичком, хранидбеном и социјалном статусу високомлечних крава (Šamanc, 2009). Многобројни неповољни утицаји у перипарталном периоду, који се сматрају стресогеним чиниоцима, истовремено могу да представљају чиниоце одговорне за промене у понашању. Резултати испитивања су показали повећану учесталост стереотипног облика понашања управо код крава у фази пуерперијума, а код тих животиња је установљен и јаче изражен негативан биланс енергије. Ови резултати потврђују налазе неких аутора да је негативан биланс енергије предиспонирајући чинилац за настајање стереотипних понашања код високомлечних крава (Redbo и сар., 1992). Иако су механизми утицаја негативног биланса енергије на поремећаје у понашању још увек предмет многобројних испитивања, специфична природа везе могла би донекле да се објасни смањењем секреције кортикостероида под утицајем адренкортикотропног хормона (Redbo, 1998). Повећана учесталост стереотипних пона-

шања код крава у условима топлотног стреса (Phillips, 2002), који је, као што је познато, такође праћен изразитим негативним билансом енергије, говори у прилог наведеном гледишту.

С друге стране, код скоро свих крава у фази пуерперијума вредности за концентрацију магнезијума у крвном серуму су биле ниже од вредности доњег физиолошког минимума, која за говеда износи 0,70 mmol/L (Šamanc, 2009). Налаз хипомагнезијемije, сам по себи, могао би добрим делом да послужи за тумачење насталих промена у понашању животиња. Наиме, познато је да магнезијум има веома важну улогу у метаболизму неуротрансмитера и ексцитабилности ћелијских мембрана (Chutkow, 1990). Опште је прихваћено да до стереотипних активности долази активацијом нижих структура мозга које контролишу моторна понашања, што се дешава у одсуству нормалног инхибиторног утицаја од стране виших нервних функција (Dantzer, 1986; McCoу и сар., 2000). У условима хипомагнезијемije код људи је доказано да долази управо до нарушавања равнотеже између ексцитаторних и инхибиторних механизма у ЦНС-у (Vink и Nechifor, 2011). Такође, један од могућих начина утицаја магнезијума на промене у понашању јесте и преко допаминергичког система, што је посредовано преко ендогених опиоида (Dantzer, 1986; McCoу и сар., 2000). Доказано је да смањење релативног односа магнезијума и калцијума у

крви доводи до појачаног ослобађања катехоламина у одговору на стрес (Cuciureanu и Vink, 2011). Овај податак може да послужи као објашњење зашто се промене у понашању не испољавају код свих животиња код којих је утврђена хипомагнезијемija. Redbo (1998) наводи да се индивидуалне разлике у степену и интензитету испољавања стереотипија могу приписати индивидуалним разликама у одговору на стресогене чиниоце.

ЗАКЉУЧАК

По свему судећи, стереотипне активности као поремећаји у понашању које се код говеда најчешће испољавају у виду „игре језика“ веома су сложене етиологије и патогенезе. Поред начина држања животиња и дефицитарне исхране, у етиологији настанка ових поремећаја одређену улогу имају генетска предиспозиција и поремећаји неуроендокрине регулације. Учестала појава „игре језика“ у категорији крава код којих је на опсервираној фарми установљена хипомагнезијемija указује на то да би ово патофизиолошко стање могло да буде значајан етиопатогенетски чинилац у промени понашања крава у интензивним условима производње.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adamesteanu I. (1967): *Patologia medicala a animalelor domestice*. Editia a II. Bucurest: Editura Agro-Silvica.
2. Chutkow J. G. (1990): *Magnesium and the central (intradural) nervous system: metabolism, neurophysiological functions*

- and clinical disorders*. In: Sigel H., Sigel A., editors. *Metal Ions in Biological Systems: Compendium on magnesium and its role in biology, nutrition and physiology*. New York: Marcel Dekker Inc pp. 441–461.
3. Corazzin M., Piasentier E., Dovier S., Bovolenta S. *Effect of summer grazing on welfare of dairy cows reared mountain tie-stall barns*. Ital J Anim Sci 2010; 9(3): 304–312.
 4. Cuciureanu M. D., Vink R. (2011): *Magnesium and stress*. In: Vink M, Nechifor M, editors. *Magnesium in the central nervous system*. Adelaide: University of Adelaide Press pp. 251–268.
 5. Dantzer R. (1986): *Behavioral, physiological and functional aspects of stereotyped behaviour: A review and a re-interpretation*. J Anim Sci 62: 1776–1786.
 6. Issi M., Özçelik M., Gül Y. (2009): *Vitamin and some mineral substance levels along with hematological findings in cattle with tongue rolling disease*. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 15: 931–935.
 7. Karatzias H., Roubies N., Polizopoulou Z., Papasteriades A. (1995): *(Tongue play and magnesium deficiency in dairy cattle)*. Zungenspielen und Mangankmangel bei Milchkuhen. Dtsch Tierarztl Wochenschr 102: 352–353.
 8. Lindström T., Redbo I. (2000): *Effect of feeding duration and rumen fill on behaviour in dairy cows*. Appl Anim Behav Sci 70: 83–97.
 9. McCoy M. A., Young P. B., Hudson A. J., Davison G., Kennedy D. G. (2000): *Regional brain monoamine concentrations and their alterations in bovine hypomagnesaemic tetany experimentally induced by a magnesium-deficient diet*. Ret Vet Sci 69: 301–307.
 10. Phillips C. (2002): *Cattle behaviour and welfare*. 2nd rev. ed. Ames: Blackwell Science Ltd.
 11. Redbo I., Emanuelson M., Lundberg K., Oredsson N. (1996): *Feeding level and oral stereotypies in dairy cows*. Anim Sci 62: 199–206.
 12. Redbo I., Jacobsson K. G., van Doorn C., Petterson G. (1992): *A note on relations between oral stereotypies in dairy cows and milk production, health and age*. Anim Prod 54: 166–68.
 13. Redbo I., Nordblad A. (1997): *Stereotypies in heifers are affected by feeding regime*. Appl Anim Behav Sci 53: 193–202.
 14. Redbo I. (1998): *Relations between oral stereotypies, open-field behavior, and pituitary–adrenal system in growing dairy cattle*. Physiol Behav 1998; 64: 273–278.
 15. Redbo I. *The influence of restraint on the occurrence of oral stereotypies in dairy cows*. Appl Anim Behav Sci 35: 115–123.
 16. Rosenberger G. (1995): *Clinical Examination of Cattle*. Oxford: Blackwell Science Ltd.
 17. Rushen J., de Passillé A. M., von Keyserlingk M. A. G., Weary D. M. (2008): *The welfare of cattle*. Dordrecht: Springer.
 18. Sato S., Nagamine R., Kubo T. (1994): *Tongue-playing in tethered Japanese*

- Black cattle: diurnal patterns, analysis of variance and behaviour sequences.* Appl Anim Behav Sci 39: 39–47.
19. Šamanc H. (2009): *Bolesti organa za varenje goveda.* Beograd: Naučna KMD.
20. Vučinić M. (2005): *Ponašanje, dobrobit i zaštita životinja.* Beograd: Veterinarska komora Srbije.
21. Watt D. C., Sellar A. (1993): *A clinico-genetic study of psychiatric disorder in Huntington's chorea.* Psychol Med: 23, 1–46.



DOI: 10.7251/VJRS1302229DJ

UDK 543.068.08:616-008.87

Драгица Ђурђевић-Милошевић,¹ Весна Калаба,² Милка Стијепић³

ПРОЦЕНА МЕРНЕ НЕСИГУРНОСТИ ПРИ ОДРЕЂИВАЊУ БРОЈА БАКТЕРИЈА *ENTEROBACTERIACEAE*

Кратак садржај

Микробиолошке анализе имају значајну улогу у мониторингу квалитета хране, а висока мерна несигурност може потенцијално имати утицај на валидност добијених резултата с обзиром на постојеће микробиолошке критеријуме.

Циљ овог рада је био да се одреди ниво мерне несигурности у оквиру унутар-лабораторијске студије. Контаминирани су узорци стерилизованог млека бактеријом *Escherichia coli* ATCC 25922, а за бројање бактерија *Enterobacteriaceae* коришћена је метода ISO 21528-2. Добијени резултати су коришћени за прорачун стандардне девијације репродукцибилности, и из ње изведене проширене мерне несигурности. Добијени резултати су показали да је стандардна девијација репродукцибилности била 0,11, а проширена мерна несигурност 0,22, изражено преко логаритамске вредности броја колонија.

Кључне речи: *Enterobacteriaceae*, бројање колонија, мерна несигурност.

Dragica Đurđević-Milošević,¹ Vesna Kalaba,² Milka Stijepić³

ESTIMATION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY OF *ENTEROBACTERIACEAE* COLONY COUNT

Abstract

Microbiological analysis play important role in the monitoring of food quality and high levels of microbiological uncertainty must have a potential impact on the compliance of test results with microbiological criteria.

The aim of this paper was to determine the levels of measurement uncertainty obtained in interlaboratory study. Samples of sterilized milk were spiked with

¹ Анахем лабораторија Београд, Моцартова 10.

² Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бања Лука.

³ Висока медицинска школа Приједор, Николе Пашића.

Escherichia coli ATCC 25922 and applied method for counting of *Enterobacteriaceae* was ISO 21528-2. The data sets were analysed to determine the standard deviations of reproducibility, based on log10 colony count values, and thence the relative measures of expanded uncertainty. Obtained results showed standard deviations of reproducibility $S_R=0.11$, and expanded uncertainty 0.22, based on log10.

Key words: *Enterobacteriaceae*, colony count, measurement uncertainty.

УВОД

Enterobacteriaceae је велика породица грам-негативних бактерија које су нормални становници гастроинтестиналног тракта људи и животиња (Donnenberg, 2010). Будући да породици припада више од 70 родова, неки припадници имају посебан значај када је у питању микробиолошка исправност намирница и уопште здравље људи и животиња, нпр. *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Enterobacter*... Нажалост, у новије време је све више информација о израженој резистентности ентеробаактеријацеа према антибиотцима и, следствено томе, проблемима везаним за лечење људи и животиња (Peterson, 2006).

Једна од метода за изолацију и бројање бактерија породице *Enterobacteriaceae* је међународна метода ISO 21528-2:2004 (Анон., 2004), која дефинише ове бактерије као микроорганизме које формирају карактеристичне колоније на ружичасто-црвеном жучном глукоза агару (violet red bile glucose agar – VRBGA), ферментишу глукозу и показују негативну оксидаза реакцију када се проводи тест у скла-

ду са овим делом ISO 21528. Будући да су аналитичке методе извор различитих систематских и рандомских грешака које могу утицати на тачност резултата, пожељно је уз верификацију методе извршити и процену мерне несигурности методе (estimation of measurement uncertainty – MU). Према ISO/TS 19036:2006 (Анон., 2006), мерна несигурност представља величину која карактерише дисперзију резултата која се може повезати са процесом мерења и израчунава се из стандардне девијације репродукцибилности. Репродуцибилност представља блискост слагања између појединачних резултата испитивања на идентичном узорку, користећи исту методу од стране различитих аналитичара у различитим лабораторијама користећи различиту опрему – међулабораторијска репродукцибилност, или различитих аналитичара у истој лабораторији – унутарлабораторијска репродукцибилност. Односно, процена мерне несигурности омогућава одређивање средње вредности која се може користити за поређење укупне варијабилности аналитичке процедуре која се проводи у само једној лабораторији

или између различитих лабораторија (Corry et al., 2007).

Према ISO/TS 19036:2006 (Анон., 2006), постоје различити начини за добијање експерименталних резултата из којих се израчунава стандардна девијација репродукцибилности (S_R), и то:

1. стандардна девијација репродукцибилности добијена на основу резултата унутар лабораторије,
2. стандардна девијација репродукцибилности изведена из међулабораторијске студије, и
3. стандардна девијација репродукцибилности изведена из међулабораторијског тестирања оспособљености (proficiency testing). Приоритет би требало да буде на првој опцији, па је и у овом раду мерна несигурност изведена из унутарлабораторијских експеримената, а тиме и на основу унутарлабораторијске репродукцибилности.

Процена мерне несигурности према Анон. (2006) примењује се за квантитативне методе микробиолошких анализа производа намењених за исхрану људи и животиња, као и узорак из животне средине у поручју производње и руковања храном. Стандард ISO/TS 19036:2006 се не примењује на методе бројања микроорганизама метом MPN (most probable number) техником, или анализе узорака са ниским бројем микроорганизама.

Препорука је да се приликом дизајна експеримената користе природно контаминирани узорци, будући

да се на такав начин добија реалистичнија вредност мерне несигурности. Ако се изводи претходно контаминација узорка, тј. спајковање, захтевају се изузетно контролисани услови да не би дошло до варирања резултата. Спајковање треба извести тако да покрије присуство позадинске микрофлоре, ако је присутна. Уз то, треба водити рачуна да физиолошко стање микроорганизама (нпр. стресно стање) може да утиче на варијације резултата, и требало би да буду што сличнији стањима током рутинског тестирања (Анон., 2006).

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Направљена је суспензија бактерија *Escherichia coli* ATCC 25922 у физиолошком раствору до постизања вредности 4 McF скале на дензиметру. Разређења су припремљена према Анон. (1999), а као разређивач је коришћен физиолошки раствор (Торлак, Београд). Узорак од 10 мл комерцијалног стерилизованог млека је контаминиран (спајкован) са 1 мл разређења 10^{-4} припремљене суспензије бактерија *Escherichia coli* ATCC 25922 и разређен са 90 мл пуферисане пептонске воде (Торлак, Београд). Сукцесивно, десет дана су два аналитичара контаминирали узорак стерилизованог млека према горњој процедури и даље примењивали методу ISO 21528-2 (Анон., 2004). Паралелно са контаминираним узорцима, засејаван је и иницијални узорак ради провере присуства позадинске микрофлоре.

Одређивање и бројање бактерија *Enterobacteriaceae*, у нашем случају бројање бактерија *Escherichia coli* ATCC 25922, урађено је у складу са ISO 21528-2 (Анон., 2004). Други део ISO 21528 прописује методу, без предбогаћења, за детекцију и бројање бактерија *Enterobacteriaceae*. Примењив је на производе намењене за исхрану људи и исхрану животиња, те узорке из животне средине у подручју производње хране и руковања храном.

Укратко, припремљено децимално разређење суспензије културе инокулира се наливном техником у по две петри плоче за свако разређење. Љубичасто-црвени жуч глюкозни агар (Торлак, Београд), претходно припремљен и охлађен на 44–47°C, налива се у два слоја. Прво се налије 10 мл и хомогинизује са већ претходно наливним инокулумом, а након солидификације подлоге, налије се додатних 15 мл подлоге. Други слој подлоге треба да онемогући сливени раст колонија и да обезбеди полуанаеробне услове. Плоче се инкубирају на 37°C током $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Колоније карактеристичног израста за *Enterobacteriaceae* треба сукултивисати на храњиви агар (Торлак, Београд) као неселективну подлогу, а потом потврдити на тест ферментације глюкозе и присуство енизима оксидазе. За ферментацију глюкозе коришћен је глюкозни агар (Торлак, Београд), а за доказ присуства оксидазе коришћене су траке са реагентом произвођача Merck (Немачка). Број бактерија *Enterobacteriaceae* се рачуна

на основу броја потврђених типичних колонија.

Прорачун мерне несигурности је извршен према ISO 19036 (Анон., 2006):

$$s_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

где су:

y_{ij} – резултати трансформисани у логаритме, тј. Y резултати трансформисани у логаритме, тј. $\log_{10}$ (cfu/g) или $\log_{10}$ (cfu/ml),

i – индекс узорка, $i = 1$ до n , при чему је $n \geq 10$,

j – индекс услова репродукцибилности $j = A$ или B ,

A и B – ознаке за аналитичаре.

Мерна несигурност, одређена према горњим упутствима, може се навести у извештају заједно са резултатима теста као интервал у $\log_{10}$ или као број колонија cfu по граму или милилитру матрикса, или као проценат.

Ако се резултати изразе као $y = \log_{10} x$, а мерна несигурност као стандардна девијација репродукцибилности S_R , онда се проширена мерна несигурност за интервал поврећа 95% и фактор 2 може изразити као $2S_R$, а резултати на један од следећих начина:

- $y \pm 2S_R$ (log),
- $y \log [y - 2S_R, y + 2S_R]$,
- $x \text{ cfu/g}$ или $x \text{ cfu/ml}$ [10^{y-2S_R} , 10^{y+2S_R}],

– x cfu/g или x cfu/ml $[10^y - (10^{y-2SR}/10^y) \%, 10^y + (10^{y+2SR}/10^y) \%]$.

РЕЗУЛТАТИ

Након експерименталне процедуре наведене у методама рада, пребројане су колоније са инкубираних петри плоча које су имале карактеристичан

израст љубичастих колонија са израженом зоном преципитације. Тестиране колоније су показале глукоза позитивну реакцију и оксидаза негативну реакцију. Број израслих колонија је наведен у табели 1. и трансформисан у логаритамске вредности. Узорци следеће пробе, тј. неконтаминирани узорци нису показали пораст на петри плочама са VRBGA.

Табела 1. Прорачун стандардне девијације репродукцибилности

i	X_{iA}	X_{iB}	$y_{iA} = \log_{10}(X_{iA})$	$y_{iB} = \log_{10}(X_{iB})$	$(y_{iA} - y_{iB})^2 / 2$
1	2450	1470	3,389	3,167	0,0246
2	2730	2800	3,436	3,447	0,0001
3	2220	1520	3,346	3,182	0,0135
4	1920	2420	3,283	3,384	0,0051
5	2180	2000	3,338	3,301	0,0007
6	2100	2650	3,322	3,423	0,0051
7	1900	2820	3,279	3,450	0,0147
8	2450	1740	3,389	3,241	0,0110
9	1830	3300	3,262	3,519	0,0328
10	1780	2600	3,250	3,415	0,0135

i – редни број експеримента,

x_{iA} – број колонија, аналитичар А,

x_{iB} – број колонија, аналитичар В,

y_{iA} – логаритамска вредност броја колонија, аналитичар А,

y_{iB} – логаритамска вредност броја колонија, аналитичар В.

Користећи резултате из табеле 1, израчуната је мерна несигурност према формули из метода рада и износи $S_R=0,11$, а проширена мерна несигурност 0,22.

За добијене резултате у $\log_{10}$ cfu/g или cfu/ml при примени методе ISO 21528-2, може се извести у $\log \pm 0,22$.

Нпр. за резултат 10^3 , вредност би требало, с обзиром на проширену мерну несигурност, изразити као:

- $3,0 \log \pm 0,22$,
- $3,0 \log [3,22; 2,78]$,
- 10^3 cfu/ml $[1,7 \times 10^3, 6 \times 10^2]$,
- 10^3 cfu/ml $[10^3 + 70\%; 10^3 - 40\%]$.

ДИСКУСИЈА

Мерна несигурност добијених резултата при провођењу микробиолошких испитивања хране је карактеристика која се може придружити резултатима квантитативних анализа. Уједначеност резултата при испитивању делова истог узорка у различитим лабораторијама представља императив у

развоју микробиолошке аналитке, а тиме и процена мерене несигурности добија све више на значају и постаје предмет интереса не само стручне, већ и научне јавности, пре свега због још увек нерасветљених параметара који утичу на варијације добијених резултата. Тако су Jarvis et al. (2007a) обрадили резултате добијене при одређивању мерне несигурности добијене током провере оспособљености (proficiency testing) добијене из Central Science Laboratory (York) и резултате добијене из интерлабораторијске студије метода проведених у лабораторијама које улазе у састав Health Protection Agency (HPA). Добијени резултати су обрађени у циљу добијања стандардне девијације репродукцибилности (relative standard deviations of reproducibility – RSDR), базиране на декадној логаритмској вредности из бројаних колонија, а затим и проширеној мерној несигурности. Резултати тестирања оспособљености су показали екстремне вредности RSDR чак и до $\pm 30\%$, зависно од тестираног микроорганизама, лабораторије учесника и примењене методе. Код уобичајених узорака RSDR је била око $\pm 12\%$, али у неким случајевима и до $\pm 41\%$. С друге стране, интерне провере су показале RSDR око $\pm 27\%$, зависно од примењене процедуре и испитиваног микроорганизама. Резултати су показали мале разлике у мерној несигурности зависно од типа инокулације (наливна техника, техника размаза или спирални плејтинг). Није уочен утицај различитих матрикса на мерну несигурност. Након

поређења добијених резултата, закључено је да добијене вредности за мерну несигурност у оквиру тестирања оспособљености (proficiency testing) нису битно горе од оних добијених у интра-лабораторијском испитивању.

Резултати међулабораторијског тријала у коме су учествовала по три аналитичара из 19 лабораторија у процени укупног броја бактерија *Enterobacteriaceae* ISO методом показали су да је мерна несигурност репродукцибилности била од 14,0% до 17,4%, а мерна несигурност поновљивости од 4,1% до 6,7%, рачунато преко укупног броја израженог у $\log_{10}$ (Jarvis et al., 2007b).

Augustin et Carlier (2006) истраживали су резултате тестирања оспособљености добијене у French microbiology proficiency scheme (RAEMA) у периоду 1999–2003. Резултати су показали да је релативна стандардна девијација репродукцибилности била $15\pm 5\%$ за укупан број аероба, $20\pm 8\%$ за *Enterobacteriaceae*, и $20\pm 9\%$ за *Escherichia coli*. Сличне вредности су нађене и за многе друге групе микроорганизама, са изузетком сулфито-редукујућих клостридија за које је релативна стандардна девијација репродукцибилности била и до 94%.

С обзиром на горе изложене литературе наводе, наши резултати представљају допринос овој проблематици и представљају иницијално испитивање које треба да се развије у тестирање различитих матрикса и употребу различитих појединачних и

мешаних култура које припадају породици *Enterobacteriaceae*.

ЗАКЉУЧЦИ

Увођење методе у једну лабораторију захтева претходну верификацију, односно прикупљање доказа да је лабораторија у могућности да проводи методу. Мерна несигурност представља величину која карактерише дисперзију резултата, што се може повезати са процесом мерења, а израчунава се из стандардне девијације репродуцибилности. Репродуцибилност представља блискост слагања између појединачних резултата испитивања на идентичном узорку, кориштењем исте методе од стране различитих аналитичара у различитим лабораторијама, уз различиту опрему – међулабораторијска репродуцибилност, или различите аналитичаре у истој лабораторији – унутарлабораторијска репродуцибилност.

Применом смерница из ISO 19036 (Анон., 2006) израчуната је мерна несигурност за бројање ентеробактеријацеа методом ISO 21528-2 (Анон., 2004) и износи $S_R=0,11$, а проширена мерна несигурност 0,22.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анон. (1999): *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs — Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination — Part 1: General Rules for the Preparation of the Initial Suspension and Decimal Dilutions*. ISO 6887-1.
2. Анон. (2003): *Microbiology of Food and Animal Feedingstuffs — Protocol for the Validation of Alternative Methods*. ISO 16140.
3. Анон. (2004): *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count method*. ISO 21528-2.
4. Анон. (2006): *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*. ISO/TS 19036.
5. Augustin J. C., Carlier V. (2006): *Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts*. Food Microbiol 23: 1–38.
6. Corry J. E. L., Jarvis B., Passmore S. M., Hedges A. J. (2007): *A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms*. Food Microbiol 24: 230–253.
7. Donnenberg M. S. (2010): *Enterobacteriaceae [Chapter 218]*. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier 2815–34.
8. Jarvis B., Corry J. E., Hedges A. J. (2007a): *Estimates of measurement uncertainty from proficiency testing schemes, internal laboratory quality*

- monitoring and during routine enforcement examination of foods. J Appl Microbiol* 103: 462–7.
9. Jarvis B., Hedges A. J., Corry J. E. (2007b): *Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. Int J Food Microbiol* 116: 44–51.
10. Peterson D. L. (2006): *Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. Am J Med* 119 (6Suppl1): S20-8; discussion S62–70.



DOI: 10.7251/VJRS1302237T

UDK 614.47:599.742.1

K. Tošić,¹ Z. Mehmedbašić,² A. Nemet,³ M. Aubert⁴

ORAL VACCINATION OF FOXES: PRINCIPLE AND FIELD APPLICATION

Abstract

Oral vaccination of the red fox against rabies using baits revealed very efficient for eliminating rabies in many European countries. The “Program for control and eradication of rabies via oral vaccination of foxes” elaborated by the Veterinary Office plans to perform aerial vaccine bait distribution in Spring and Autumn until 2015 at least. Campaigns have already been carried out in autumn 2011, spring & autumn 2012 over all the territory of BiH, including Public Awareness Campaigns. The role of Doctors of Veterinary Medicine is of paramount importance for educating the public regarding rabies and re-enforcing the epidemio-surveillance of the disease.

Key words: rabies, oral rabies vaccination, monitoring, surveillance, role of the Doctors of Veterinary Medicine.

К. Тошић, З. Мехмедбашић, А. Немет, М. Ауберт

ОРАЛНА ВАКЦИНАЦИЈА ЛИЦИЦА: ПРИНЦИП И ДИСТРИБУЦИЈА НА ТЕРЕНУ

Кратак садржај

Орална вакцинација црвених лисица против беснила, уз коришћење мамака вакцина, показала се као врло ефикасна у искорењивању беснила у многим државама Европе. Програмом за контролу и искорењивање беснила уз примену оралне вакцинације лисица, који је израдио Уред за ветеринарство БиХ, предвиђена је дистрибуција вакцина из ваздуха у пролеће и јесен, у трајању до 2015. године минимално. Кампања дистрибуције вакцина мамака из авиона у

¹ Coordination of Animal Disease Control and Eradication Programme in BiH – Phase II.

² Veterinary Office of Bosnia and Herzegovina.

³ Veterinary Office of Bosnia and Herzegovina.

⁴ Coordination of Animal Disease Control and Eradication Programme in BiH – Phase II.

БиХ спроведена је три пута до сада, и то у јесен 2011. и у пролеће и јесен 2012. године, укључујући кампање јачања свести јавности. Улога доктора ветеринарске медицине је од изузетног значаја за едукацију и подизање свести јавности о беснилу, али и за успостављање епидемиолошког надзора болести.

Кључне речи: беснило, орална вакцинација, мониторинг, надзор, улога доктора ветеринарске медицине.

INTRODUCTION

As in all over Europe, Rabies has been present in the Western Balkan areas in the dog populations for centuries. It followed a steady decline from 1952 in the former Yugoslavia, while sporadic dog rabies cases still occurred in the 1970s in Central Serbia and Kosovo, accompanied by several human cases (Mutinelli et al., 2004). In the 80,s while dog mediated rabies still persisted sporadically, fox mediated rabies progressed from the north-eastern part of Europe invaded the Balkan area where it is still advancing until reaching Greece recently.

More precisely in BiH until the 70's, dogs accounted for 76% of the cases, with the remainder in domestic cats, cattle, pigs and sheep (Rukavina, Lj., 1973). When selvatic rabies spread from the north into BiH in 1982, dog rabies had considered to have been eliminated (Djuricic, B. et al., 1988). This time, the reservoir and the main victim of the disease was the fox as elsewhere in western Europe with a mean 77% of rabies cases recorded in the fox, with spillovers on cattle (5%), badgers and other mustelids (4%), domestic cats (4%),

roe-deer (3,7%), sheep and goats (2,7%) and the dog accounted for 2% only of the records (Blancou et al., 1991).

The first demonstration of the possibility to eliminate fox rabies from an infected area by distributing in spring and autumn baits containing an attenuated rabies vaccine strain have been given by the Swiss team in 1980 (Steck et al., 1982). Very early they developed all the concepts and methods which were thereafter used by other European countries when they started their own programmes several years later. Now, the methods to follow more or less adapted and improved from to the initial ones are summarized in a report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. European Commission entitled "The oral vaccination of foxes against rabies" (2002).

THE "PROGRAM FOR CONTROL AND ERADICATION OF RABIES VIA ORAL VACCINATION OF FOXES" IN BIH

Considering that fox rabies does not respect the administrative borders, and

in order to protect rabies free countries, the European Union decided to fund eradication programmes in most countries in the region. Initiative started in 2009 and during the two following years most countries in the region undertook Rabies control and eradication multi-annual programmes.

In many of the countries in the region the oral vaccination of foxes against rabies started during 2010 & 2011 (see table) and will be pursued twice a year in the coming years.

<i>Oral Rabies Vaccination in the region</i>	
-	Bosnia & Herzegovina – <i>since 2011</i> ;
-	Croatia – <i>since 2011</i> ;
-	Kosovo* – <i>since 2010</i> ;
-	Montenegro – <i>since 2011</i> ;
-	FYR Macedonia – <i>since 2011</i> ;
-	Serbia – <i>since 2010</i>
-	<i>Albania⁵ – plan 2013/2014</i>

Figure 2 describes the Western Balkan countries vaccination where oral vaccination of foxes has been carried out during autumn 2012. This includes the buffer zone of ORV in Slovenia, Hungary, Romania and Bulgaria. Additionally, ORV is also planned to be initiated in Albania and Greece.

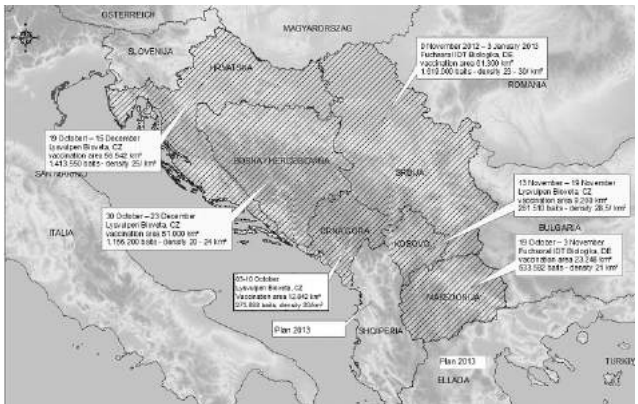


Figure 1. Western Balkan countries where oral vaccination of foxes has been carried out during autumn 2012. (Source: IPA Multi-beneficiary Project, Western Balkans, Team leader: Dr Richard O'Flaherty)

⁵ The European Union provided funds for a five year programme of twice yearly vaccination campaigns covering the entire territory of Albania beginning in autumn 2013 or spring 2014.

The Veterinary Office of BIH developed a “Program for control and eradication of rabies via oral vaccination of foxes”. This document sets out the disease control principles in accordance with the OIE Terrestrial Animal Health Code and WHO recommendations and provides a road map and time frame for medium and long term priority activities.

The rabies control and eradication programme is to be implemented over a short/midterm and a phase and long-term phase:

- The short/midterm phase objective is to reduce the number of rabies cases through progressive control and eradication measures, including oral vaccination of foxes, post-vaccination monitoring and surveillance, as well as preventive measures against re-introduction of disease in disease free areas;
- The long-term objective is to eradicate the disease from Bosnia and Herzegovina and to maintain the disease free status of the country by all control measures, including con-

tinues surveillance and vaccination in case of outbreaks and carrying out post-vaccination monitoring and investigations to better understand the way of transmission, the dynamics and the role of different wildlife animals in BIH, and to prevent the introduction of rabies in disease free areas.

The most visible realization of this programme is the first ORV campaign implemented in autumn 2011.

RESULTS

So far three campaigns of aerial distribution of vaccine baits have been carried out in BIH: during autumn 2011, then spring & autumn 2012. The same number of campaigns has been performed in most of the countries in the region.

The surveillance data, notified to the Rabies Bulletin Europe allow comparing the number of rabies cases recorded during the last year before the start of oral rabies vaccination (2009) with those of the year 2012 after an average of three ORV campaigns had been implemented (Table 1).

Table 1. Number of rabies cases recorded during 2009, the last year before the start of oral rabies vaccination, and during 2012 after an average of three ORV campaigns had been implemented in the region (Source: Rabies Bulletin Europe).

Country	Domestic animals 2009	Domestic animals 2012	Wild life/foxes 2009	Wild life/foxes 2012	Total 2009	Total 2012
Albania	1	2	0	0	1	2
Bosnia - Herzegovina	10	0	15	3	5	3
Croatia	66	21	718	124	784	145
Kosovo* ⁶	0	0	0	0	0	0
Macedonia	0	1	0	2	0	3
Montenegro	7	1	42	0	49	1
Serbia	40	0	141	13	181	13
Total	124	25	916	142	1040	167

We observe a significant decrease in the number of rabies cases: starting from 1040 cases in 2009, this number reached 167 only in 2012. These results are also illustrated by figure 2.

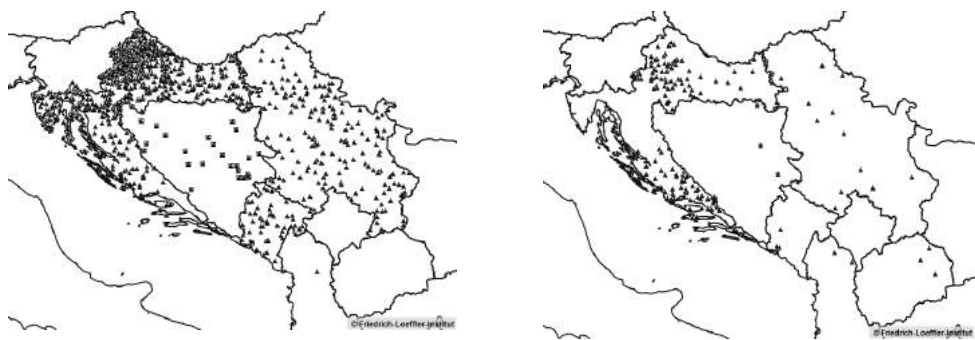


Figure 2. Distribution of rabies cases (all animal species) recorded during 2009 (left), the last year before the start of oral rabies vaccination, and during 2012 (right) after an average of three ORV campaigns had been implemented in the region (Source: Rabies Bulletin Europe)

⁶ *This designation is without prejudice to positions on status, and is in line with UNSC 1244 and the ICJ Opinion on the Kosovo declaration of independence.

DISCUSSION: THE ROLE OF THE DOCTORS OF VETERINARY MEDICINE FOR CONTROL AND ERADICATION OF RABIES IN BIH

Whereas very encouraging, these results do not allow to conclude that the fox rabies epidemics had been decreased significantly. In reality, the decrease in the record of positive cases is also the result of a very low and inconstant epidemio-surveillance effort in the region, and particularly in BIH.

For improving this situation, Doctors of Veterinary Medicine must be recalled that they have two very important roles to play. Their first role is to educate the public of the nature and risks posed by rabies for Humans and for domestic animals. Their second role is to actively contribute to the elimination of fox rabies.

- a) Public education and rabies prevention in domestic animals and Humans.

Doctors of Veterinary Medicine are at the front line for protecting farmers and pet owners from the risk if transmission from their cattle, sheep dogs and pets. They inform their clients on the disease, how to recognise its symptoms, what the risk is and how to prevent it. Additionally they encourage the preventive vaccination of the most exposed domestic animals, i.e. ranking them in decreasing risk: cattle, horses, cats then dogs.

Because they are generally the first public health professionals to be informed of any human contamination and they orientate the potentially

contaminated persons to Medical Doctors, their role for preventing human rabies is crucial.

- b) Contribution to the control and the elimination of rabies.

For organising vaccine bait distribution on the infected areas, one must know which areas are infected. Keeping in mind that rabies symptoms are numerous, inconstant and in any case never pathognomonic, always a laboratory diagnostic is absolutely required, thus, the suspect animals must be transported to the laboratory (in Republica Srpska, this laboratory is the “Dr Vaso Butozan” Veterinary Institute in Banja Luka).

When informing their clients on rabies, Doctors of Veterinary Medicine must motivate them to communicate to them (or to the local veterinary administration) by phone and by any other means about the occurrence of any suspect behaviour in wild or domestic animal species. Farmers, hunters, and any person living in the countryside are generally very well informed of what is a normal behaviour of a fox, at which period of the year it is normal or abnormal to see a fox during daytime in the fields or in the middle of the villages.

However precisely because rabies symptoms are inconstant, all reasons for submitting animals to the rabies laboratory are good reasons: any animal found dead must be submitted to the laboratory wherever it may be found in the woods as well as along a road. Suspect animals are not only the aggressive ones: aggressivity

is only observed in less than 50% of rabid foxes.⁷ As a result any wild or domestic animal who died for no obvious reason (animals claimed to have been “poisoned”), or who died after a loss of appetite must be sent to the laboratory. In the above mentioned study, anorexia was the most frequent symptom (50 out of 53 foxes).

One must remember that a negative result is a result: the only means for insuring that an area is rabies free (an important point again for organising oral vaccination campaigns) is to have a high density of laboratory examination from the area.

CONCLUSION

Oral vaccination of wild animals against rabies has proved to be the most effective method to eliminate fox rabies. EU support and strong collaboration in the region are crucial for eliminating this dangerous zoonosis. They already brought unambiguously positive results, in spite of the difficulty met for:

- the re-enforcement of laboratory diagnostic facilities and capabilities;
- the organization of campaigns which require considerable know-how, practical experience, enthusiasm of all stakeholders (veterinarians, hunters, governmental officials); and

- the political will and financial resources.

However, we are still only half way. The main weakness of the oral vaccination programmes against fox rabies in the region remains the difficulty in organising a correct epidemio-surveillance of the disease.

Because the Doctors of Veterinary Medicine are the best informed public health actors on the terrain, their involvement for increasing the public awareness and motivation for sending to the laboratory all suspect animals will be determinant for the surveillance of the disease and its final eradication.

REFERENCES

1. Blancou J., Aubert M. F. A. and Artois M. (1991): *Fox rabies. in “The natural history of rabies”*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 257–290.
2. George J. P., George J., Blancou J. and Aubert M. F. A. (1980) (in French) [Clinical description of rabies in the Red Fox – Experimental study]. *Rev. Méd. Vét* 131: 153–160.
3. Djuricic B., Petrovic M., Panjevic Dj., Valcic, M. (1988): *Epizootoloska situacija besnila u Jugoslaviji u periodu od 1977. do 1987. godine*. Veterinarski glasnik 42: 483–493.

⁷ 53 foxes used as control animals (during experiments for vaccine research in the Nancy laboratory) had been observed daily following experimental inoculation with rabies virus (from naturally infected foxes). Only 26 (49%) exhibited spells of aggressivity and/or furor (George J.P. et al., 1980).

4. Mutinelli F., Stankov S., Hristovski M., Seimenis A., Theoharakou H., Vodopija I. *Rabies in Italy, Yugoslavia, Croatia, Bosna, Slovenia, Macedonia, Albania and Greece*. (2004): Chapter 8. pp 93–118 in *Historical Perspective of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin*. King A., Fooks A., Aubert M. and Wandeler A. eds. OIE Ed, pp. 383.
5. *Review of rabies case data in Europe to the WHO Collaborating Centre Tübingen from 1977 to 2000*. Rabies Bulletin Europe, 4: 11–19.
6. Rukavina, Lj. (1973): *Pojava bjesnila kod životinja u sjeveroistočnoj Bosni sa osvrtom na faktore koji su pogodovali održavanju i širenju infekcije*. Veterinarski glasnik 47: 743–50.



DOI: 10.7251/VJRS1302245R

UDK 619(497.6Republika Srpska)(71)

С. Росић-Бањанин¹

ОБЈЕКТИВАН ОСВРТ НА ВЕТЕРИНАРСКУ СЛУЖБУ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ И КАНАДЕ

Кратак садржај

Налазимо се на прекретници ветеринарске службе у Републици Српској. Европска унија врши притисак на побољшање службе и тражи бољу контролу кретања животиња, како у оквиру граница Републике Српске, тако и приликом увоза и извоза. Одговорност ветеринара на терену је основа за увођење реда, уз подршку општинске и републичке инспекције. Казне за одгајиваче, месаре и ветеринаре који не поштују законске прописе треба да буду јасне, оштре, спроводљиве и да се примењују. Једино тако можемо да дођемо до правих резултата, не због Европске уније, већ због нашег здравља и здравља наше деце.

Кључне речи: контрола кретања, ветеринарска инспекција, Европска унија.

S. Rosić-Banjanin²

VETERINARY SERVICES OF THE REPUBLIC OF SRPSKA VS. CANADA

Abstract

We are at the crossroads of veterinary service in the Republic of Srpska (RS). The European Union (EU) continues to push us to follow their standards, especially in the area of animal trade both within and across the borders of the RS. The responsibility of the veterinarian working with the farmer is paramount for the control of animal trade, but not without support of the regional and national

¹ Ветеринарска амбуланта са апотеком „Самсара“ д.о.о. Приједор, П. П. Његоша 7, Приједор.

² MSc, DVM, Veterinary practice with pharmacy “Samsara”, P.P. Njegoša 7, Prijedor.

veterinary inspection. Penalties for farmers, butchers and veterinary officers who avoid or break the law should be clear, steep, applicable, and followed. It is the only path to real results, not for the sake of EU, but for the sake of our health and that of our children.

Keywords: animal trade, veterinary inspection, European Union.

УВОД

Република Српска (РС) је млада држава са ветеринарима много старијим од себе и са ветеринарском службом која пролази кроз „транзицију“ региона балканских земаља некадашње СФРЈ. Од завршетка ратних сукоба, ветеринарска служба РС је прошла кроз процес приватизације, по западном принципу „ако ниси вук онда си овца“. И док су се неке колеге одлично снашле у новом светском поретку, други су свој неуспех приписивали свеопштој неправди коју су балансирали са оне стране закона.

У међувремену, са друге стране океана, земље Северне Америке у последњих 20 година доживљавају еномни развој ветеринарске службе, која досеже врхунац медицине о којој хумана медицина Балкана може само да сања. Међутим, то северноамеричко и западноевропско ветеринарско пролеће је строго ограничено на такозвану „малу“ праксу и велике градове које је здрав разум одавно напустио и где се богатство мери висином рате отплате кредита.

Како поредити две толико далеке и толико различите државе? Да ли је уопште могуће сагледати ветеринарску службу *per se* или је овај рад дужан да уђе и мало дубље у неке друге теме?

МЕТОДЕ РАДА

Лично искуство

Рођена сам у Београду, 1977. године за време СФРЈ и неких тадашњих закона и државне ветеринарске службе. Тада ми се чинило типично, а из данашњег угла, врло привилеговано и размажено детињство, са расним кућним љубимцима и кумом ветеринарком. Ратна дешавања на Балкану са почетка 1990-их се у Београду одражавају у економском смислу, и моји родитељи, у жељи за срећенијим животом предају папире за Канаду. Нисам била одушевљена, али у Канаду одлазим са 16 година и жељом да се уклопим. Дипломирам зоологију и животињску физиологију на Универзитету у Торонту (2000), те године када Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Гвелфу не прима студенте. Да бих избегла живот у леру, уписујем магистарске студије на Кате-

дри за физиологију медицинског факултета Универзитета у Торонту, током којих доживљавам приватни преврат, који поново одлаже упис на ветерину. Баш када сам мислила да ми животни сан измиче ван домаћаја заувек, на последњу карту, али у првој класи, уписујем Факултет ветеринарске медицине у Гвелфу 2004. године. Током ветеринарских студија стажирам у OIE-у у Паризу 2006. године у канцеларији за интернационалну трговину (International Trade Department), а 2007. године у Приједору се први пут сусрећем са ветеринарском службом Републике Српске, где одрађујем обавезну праксу у ВС „Алфа-Вет“ Приједор. Из личних убеђења, на последњој години ветеринарских студија, проводим време са ветеринарским инспектором у Канадској агенцији за инспекцију хране (Canadian Food Inspection Agency, CFIA) обилазећи клаонице у околини Торонта, као и колегама дипломираним ветеринарима који раде по прихватиљивим стандардима за животиње у Торонту (Toronto Animal Services). По завршетку студија (2008), запошљавам се у клиници за мале животиње (East York Animal Clinic) у Торонту, а 2009. године долазим у Републику Српску. Прво се запошљавам у ВС „Нова-Вет K&K“ у Омарској, а потом оснивам ветеринарску амбуланту са апотеком „Самсара“ у Приједору (2012). Од почетка 2013. године, ВА „Самсара“ је у Регистру овлашћених ветеринарских организација за спровођење обавезних ветеринарских мера који води Мини-

старство пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Српске.

Законски акти

Листа закона и докумената везаних за ветеринарску службу у Републици Српској (БиХ) и Канади:

Закон о ветеринарству РС (“Сл. глас. РС” 42/08; “Сл. глас. РС” 6/12);

Кодекс ветеринарске етике (Вет. комора РС, 2002);

Закон о ветеринарско-медицинским производима (“Сл. глас. РС” 71/12);

Правилник о ближим условима које морају испуњавати ветеринарске станице, амбуланте, апотеке и друге службе које обављају послове ветеринарске дјелатности (“Сл. глас. РС” 21/95);

Правилник о заштити животиња за држање и условима које морају да испуњавају објекти за држање животиња (“Сл. глас. РС” 93/12);

Правилник о обиљежавању и контроли кретања животиња у БиХ (“Сл. глас. БиХ” 13/10; 79/10; 25/11; 103/11; 41/12);

Закон о заштити и добробити животиња (“Сл. глас. РС” 111/08);

Правилник о поступку додјеле овлашћења за спровођење обавезних ветеринарских мјера и поступку уписа у регистар овлашћених ветеринарских организација (“Сл. глас. РС” 87/12);

Одлука о заразним болестима животиња (“Сл. глас. БиХ” 44/03);

Наредба о мјерама контроле заразних и паразитарних болести животиња и њиховом спровођењу и финансирању у 2013. години ("Сл. глас. БиХ" 6/13);

Закон о ветеринарима Онтарија (Veterinarians Act R.R.O. 1990);

Закон о канадској Агенцији за инспекцију хране (Canadian Food Inspection Agency Act S.C. 1997, с. 6);

Закон о храни и лековима (Food and Drugs Act R.S.C 1985 с. F-27);

Закон о здрављу животиња (Health of animals act S.C. 1990, с. 21);

Кривични закон Канаде (Criminal Code of Canada RSC 1985, с. C-46);

Закон о инспекцији меса (Meat Inspection Act RSC 1985, с.25 (1st Supp.));

Закон о инспекцији риба (Fish Inspection Act RSC 1985, с. F-12);

Закон о административним монетарним казнама у пољопривреди и агро-храни (Agriculture and agri-food administrative monetary penalties act SOR/2000-187).

РЕЗУЛТАТИ

Imperare sibi maximum imperium est

Приликом писања закона, као и приликом читања истих, јасно је да је у сржи скоро сваког закона здрав разум, како канадских, тако и закона Републике Српске. И када циљ не би био новац, већ квалитетно одрађен посао, било би једноставно написати законе и поштовати их. Нажалост,

људска похлепа је довела до трошења непотребних ресурса на заштиту од самих себе. Не смемо да дозволимо да због краткорочног интереса појединца, губи читава струка дугорочно.

Потребно је да сваки појединац почне од себе: помоћни радник или ветеринарски техничар не може и не сме да ради преглед меса на *T. spiralis*, ветеринарски техничар не може и не сме да лечи животиње (лечење обухвата преглед, постављање дијагнозе, интервенцију, прописивање и употребу лекова); доктор ветеринарске медицине не сме да обезбеђује лекове ветеринарским техничарима или држаоцима животиња без претходног ветеринарског прегледа пацијента; доктор ветеринарске медицине са положеним стручним испитом има права да самостално лечи животиње, али ако физички не обавља обавезне мере, онда не сме ни да учествује на подели терена са својом дипломом; ветеринарски инспектор не може да ради преглед меса на *T. spiralis* у слободно време трихиноскопијом. Ово су само неки од примера који се сусрећу у ветеринарској пракси у Републици Српској, а обухватају све нивое ветеринарске службе. Ако чекамо да нас за ове прекршаје ухвати ветеринарска инспекција пре него што себе зауставимо, онда немамо права да се жалимо кад нас та иста инспекција казни за нешто неозбиљно, а видљиво, јер држава очекује свој део. Није реално очекивати да се за кратко време доведе све у ред, и не може појединац

да очекује да ће од сутра радити све како треба, али ако нам је у циљу да имамо солидну и поштовану струку, онда морамо прво ми да почнемо да је поштујемо.

Није потребно да свако седне и прочита све законе, али неопходно је да их знају и разумеју оне колеге које се упусте у отварање приватних амбуланти и станица. Такође, те исте колеге су дужне да о законима који се тичу посла који се обавља у ветеринарској организацији обавесте запослене и предузму мере како би се поштовала добра ветеринарска пракса. Члан 47. Закона о ветеринарству описује сврху ветеринарске делатности и сваки доктор ветеринарске медицине и ветеринарски техничар су дужни да знају основе овог закона. Уз то, сви запослени у ветеринарској организацији су дужни да врше међусобну контролу и едукацију, јер је то једини начин да ветеринарска служба опстане и буде квалитетна.

Део ветеринарске службе чине и колеге ветеринарски инспектори, чија је дужност да проверавају како ветеринарску службу, тако и пољопривредну производњу и трговину. Као колеге којима је дата привилегија да уводе ред и закон, они сами не смеју да крше закон. Најбољи вођа је онај који својим поступцима даје пример осталима. Ветеринарски инспектор који не поштује своју позицију, сам себи ствара више посла.

Ветеринарска комора Републике Српске има стратешки важан положај у ветеринарској струци. Поред постављања стандарда ветеринарске струке описаних у Кодексу ветеринарске етике, ВК РС представља везу између свих доктора ветеринарске медицине у Републици Српској. ВК РС је дужна да својим радом оправда свој положај и да заштити и себе и своје чланове кроз поштовање својих кодекса. Ресор за ветеринарство при Министарству пољопривреде, шумарства и водопривреде РС и Инспекторат РС треба да размисле о преношењу дела своје одговорности на ВК РС кроз законску регулативу.

Ресор за ветеринарство при Министарству пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Српске, као и Канцеларија за ветеринарство при Министарству спољне трговине БиХ имају троструку улогу у ветеринарској служби Републике Српске. Прво, кроз израду закона и правилника имају позицију вође ветеринарске службе РС. Друго, како би њихови правилници и закони имали смисла у оквиру свеопште економске ситуације у РС, ове две канцеларије су дужне да прикупљају повратне информације са терена. Закони написани без реалног увида у ситуацију на терену стварају немогућу мисију, па имају репулсивно дејство чак и на поједнице који би волели да раде по закону. Трећа улога је политичке природе и везана је за одржање интегритета Републике Срп-

ске у склопу европских интеграција Босне и Херцеговине.

За разлику од Републике Српске, ветеринарска служба у Канади се првенствено базира на међусобној контроли колега, као и заштити корисника ветеринарских услуга, док је ветеринарска инспекција искључиво на државном нивоу и примарно се бави контролом хране животињског порекла и међународном трговином.

Контролу саме ветеринарске службе врше ветеринарске коморе на нивоу провинција (нпр. College of Veterinarians of Ontario), које су дужне да издају и продужавају лиценце. Кршење ветеринарског етичког кодекса, као што је издавање лекова без претходног ветеринарског прегледа, санкционише се путем укора или одузимања лиценце, уколико ветеринарска комора добије притужбу на рад неког од доктора ветеринарске медицине. Саморегулација за професију значи две ствари. Прво, ветеринари су укључени у процес одређивања правила која регулишу професију и друго, ветеринари су одговорни за сопствено понашање, а ветеринарска комора пружа помоћ и надзор. Улога и ауторитет ветеринарске коморе је уређена Законом о ветеринарима (1990). Ветеринарска комора је задужена и за акредитацију ветеринарских организација. Финансирање ветеринарске коморе је базирано на плаћању годишње чланарине, која се разликује у зависности од врсте лиценце коју ветеринар поседује.

Ветеринари који раде као ветеринарски инспектори имају другачију врсту лиценце од ветеринара који се баве лечењем животиња и, поред Закона о ветеринарима, морају да поштују Закон о Агенцији за инспекцију хране (1997). Уколико ветеринарски инспектор уочи неправилности, прописане казне се разликују по тежини прекршаја и више су ако је починилац зарадио новац на основу прекршаја. Такође, тежина прекршаја се мери и са претходним прекршајима ако их има, као и са намером, немаром, могућом или почињеном штетом. Државни ветеринарски инспектори контролишу и колеге ветеринаре уколико њихова ветеринарска делатност утиче на квалитет људске хране или на здравље људи (Закон о здрављу животиња, 1990).

ДИСКУСИЈА

„Ја рекох и душу спасих“

Није реално правити поређење између ветеринарске службе Републике Српске и Канаде. То подсећа на поређење између детета и одрасле особе. Канада је последњи пут ратовала на својој територији 1812. године, против Сједињених Америчких Држава, а конфедерација је створена 1862. године, како би се уједињењем заштитили од јужних суседа. Па ипак, ни данас нема систем који омогућава праћење животиња „од штале до тањира“. Да ли је могуће да тако уређена земља, са тако поштенom владом, становништвом, и ветеринарском слу-

жбом није била у могућности да постави здравље људи на прво место, или то никад и није био циљ.

Супротно домаћем веровању, канадски закони су створени да заштите државу од нежељеног криминала и скупих судских поступака. Контрола и инспекција је фокусирана на послове у којима постоји могућност високе зараде. За финансијски незанимљиве ситуације, са малом количином ризика, инспекција у Канади није заинтересована и оставља одговорност на појединцу. Одличан пример је вакцинација против беснила, где, иако Закон налаже вакцинацију против беснила на годишњем нивоу, ветеринари нису дужни да пријаве власнике паса који то нису урадили, а шанса да власник пса наиђе на контролу током шетње или код куће су минимални. Пријава паса и вакцинација против беснила је дужност власника и уколико непоштовање Закона исплива када пас угризе појединца, казна спада на терет власника.

У интересу канадске државе није ни добробит животиња, јер једина законска одредба везана за заштиту животиња датира из 1892. године и по њој су животиње власништво, а казнене одредбе се свде на исте као и за уништавање нечијег телевизора, аута и слично (Кривични закон Канаде, 1985). Јачина одређених групација, као што су пољопривредници или ловци, одражава се сваки пут када љубитељи животиња покушају да заштите

животиње кроз предлоге о измени и допуни канадског Кривичног закона.

Принцип међусобне контроле и личне одговорности није специфичан за ветеринарску службу, већ је део канадског школовања, где професори не троше време на контролу ђака и студената. Преписивање је декларисано као прекршај који угрожава друге ђаке и студенте, и очекује се од колега да пријаве превару и преписивање како би себе заштитили од нелојалне конкуренције.

Насупрот канадској уређеној држави, где држава регулише све где може добро да заради, а заштиту оставља појединцу, ако је за то финансијски способан, у Републици Српској стање и није тако лоше. Рат је уништио ред и закон какав је постојао раније, а током ратног безакоња дошли су „нови суци у Бањој Луци“, којима треба времена да доведу земљу у нови ред и закон. У природној жељи за успехом, већина људи је спремна да заобиђе закон у нади да неће бити откривени, а држава, саткана од истих таквих, интервенише само тамо где највише губи. Као ђаци у нашој, а не канадској школи, сви против професора. И док варају прво себе, па државу, сањају о некој бољој држави, било којој, само не овој. И сутра би, када би их само пустили, живели тамо негде, и поштовали тамо неки закон, јер имају погрешну преамбулу да је тај туђи закон створен да њих заштити.

ЗАКЉУЧЦИ

Треба да одлучимо шта нам је циљ, здравље нас и наше деце, или уређена држава која у процесу уређења губи потпуни смисао живота. Доктори ветеринарске медицине у Републици Српској не поштују своју службу, а очекују од других поштовање. Не треба очекивати од тако младе државе да буде довољно организована да нас заштити од самих себе. То не раде ни државе десет пута старије од наше. Колегијалност се не мери прикривањем и заташкавањем лоше ветеринарске праксе, већ спровођењем службе која не дозвољава да послови везани за здравље животиња, а самим тим и здравље људи, пролазе неконтролисано.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анон. (1985): *Кривични закон Канаде* (Animal Cruelty Section of Criminal Code of Canada RSC 1985, с. C-46), www.laws-lois.justice.gc.ca
2. Анон. (1985): *Закон о храни и лековима* (Food and Drugs Act R.S.C. с. F-27), www.laws-lois.justice.gc.ca
3. Анон. (1990): *Закон о здрављу животиња* (Health of animals act S.C. с.21), www.laws-lois.justice.gc.ca
4. Анон. (1990): *Закон о ветеринарима Онџарија* (Veterinarians Act R.R.O. Regulation 1093). www.e-laws.gov.on.ca
5. Анон. (1995): *Правилник о ближим условима које морају испуњаваати ветеринарске станице, амбуланте, апотеке и друге службе које обављају послове ветеринарске дјелатности*. „Службени гласник Републике Српске“ 21, 580–586.
6. Анон. (1997): *Закон о Канадској агенцији за инспекцију хране* (Canadian Food Inspection Agency Act S.C., с.6). www.laws-lois.justice.gc.ca
7. Анон. (2002): *Кодекс ветеринарске етике*. Општи акти Ветеринарске коморе Републике Српске, www.vetkom.rs.ba
8. Анон. (2008): *Закон о заштити и добробити животиња*. „Службени гласник Републике Српске“ 111.
9. Анон. (2008): *Закон о ветеринарству у Републици Српској*. „Службени гласник Републике Српске“ 42: 2–19.
10. Анон. (2012): *Закон о измјенама и допунама Закона о ветеринарству у Републици Српској*. „Службени гласник Републике Српске“ 6, 59–64.
11. Анон. (2012): *Закон о ветеринарско-медицинским производима*. „Службени гласник Републике Српске“ 71, 30–43.
12. Анон. (2012): *Правилник о послици додјеле овлашћења за спровођење обавезних ветеринарских мјера и послици уписа у регистар овлашћених ветеринарских организација*. „Службени гласник Републике Српске“ 87, 18–23.
13. Анон. (2012): *Правилник о заштити животиња за држање и условима које морају да испуњавају објекти за држање животиња*. „Службени гласник Републике Српске“ 93.

DOI: 10.7251/VJRS1302253M

UDK 615.918:637.12

Т. Марковић,¹ М. Зеленовић, Н. Митровић, В. Кадирић, Б. Иванић, З. Ђерић,² Ј. Лучић³

КОНВЕРЗИЈА АФЛАТОКСИНА Б1 ИЗ СТОЧНЕ ХРАНЕ У М1 АФЛАТОКСИН МЛИЈЕКА И МОГУЋНОСТИ ЊЕНЕ РЕДУКЦИЈЕ

Кратак садржај

Афлатоксини су група микотоксина које као секундарне метаболите синтешишу гљивице *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*. Најчешће се контаминирају кукуруз, кикирики, сјеме памука, али могу бити присутни и на пашњачким травама и неадекватно припремљеној силажи. Постоји неколико типова афлатоксина: Б1, Б2, Г1, Г2, М1 и М2. За млекарску производњу најважнији је Б1 токсин у сточној храни јер се у организму краве метаболише у афлатоксин М1, који је доказано токсичан и потенцијално канцероген за људе. Максимална дозвољена концентрација М1 афлатоксина у сировом млијеку по европским стандардима је 0, 05 µг/кг, док је дозвољена вриједност укупног афлатоксина у храни за музне краве 0, 005 мг/кг (5 ппб). Посебно је истакнута могућност редукције садржаја афлатоксина у хранивима, смањење ресорпције у дигестивном тракту преживара и смањење концентрације М1 токсина у млијеку.

Кључне ријечи: афлатоксини, сточна храна, млијеко, деконтаминација.

Т. Marković,¹ М. Zelenović, N. Mitrović, V. Kadirić, Z. Đerić,² J. Lučić³

CONVERSION OF AFLATOXIN B1 FROM FEED IN AFLATOXIN M1 OF MILK AND THE POSSIBILITY OF ITS REDUCTION

Abstract

Aflatoxins are a group of mycotoxins synthesized by fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* as secondary metabolites. Commonly contaminate corn,

¹ Ветеринарски завод д. о. о. „Теолаб“, Дворови, Бијељина.

² Агенција за сигурност хране, Мостар.

³ Пољопривредно-медицинска школа Брчко.

peanuts, cotton seed, but may be present on the pasture grass and inadequately prepared silage. There are several types of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2. For dairy production B1 toxin in feed is the most important because the cow organism metabolizes him into aflatoxin M1, which has been proven toxic and potentially carcinogenic to humans. Maximum allowable concentration of aflatoxin M1 in milk by European standards is 0.05 mg / kg, while the total allowed value of aflatoxin in feed for dairy cows 0.005 mg / kg (5 ppb). Especially is emphasized the possibility of reducing the aflatoxin content in the feed, reducing the absorption in the digestive tract of ruminants and reducing the concentration of toxin M1 in milk.

Keywords: aflatoxin, feed, milk, decontamination.

УВОД

Афлатоксини су микотоксини од највећег значаја за млекарску индустрију. Производе их гљивице *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*, док су недавна истраживања показала да су *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus nomius* и *Aspergillus pseudotamarii* такође афлатоксин продукујуће (Kurtzman и сар., 1987; Goto и сар., 1997; Ito и сар., 2001). Највећи број микотоксина налази се на зрну биљака гајених у сушним условима, али могу бити присутни и на пашњачким травама и понекад у сијену. Афлатоксини су најчешће присутни у кукурузном зрну, сјемену памука, кикирикију и понекад у сојином зрну. Неадекватно спремљена кукурузна силажа може садржати значајне количине афлатоксина. Постоји неколико врста афлатоксина: В1, В2, Г1, Г2, М1 и М2. Име су добили на основу боје којом флуоресцирају након озрачивања. Због доказане канцерогености ових материја како за људе,

тако и за животиње, неопходан је њихов стални мониторинг у храни. Према нашем правилнику, потпуна крмна смијеша за исхрану крава музара не смије садржати више од 0,005 мг/кг (5 ппб) укупног афлатоксина, док је за М1 афлатоксин у млијеку горња граница 0,05 µг/кг (ппб). Амерички критеријуми су блажи и дозвољавају 0,02 мг/кг (20 ппб) афлатоксина у потпуној смијеши за краве музаре и 0,5 ппб (µг/кг) М1 токсина у млијеку.

СУДБИНА АФЛАТОКСИНА У ОРГАНИЗМУ КРАВЕ

Биолошки ефекат микотоксина на организам животиње зависи од количине токсина унесеног храном и дужине конзумирања такве хране. Након конзумације хранива контаминираним афлатоксином В1, краве почињу излучивати афлатоксин М1 млијеком након 12–24 часа, док се максималне

концентрације у млијеку постижу тек за неколико дана. Након престанка конзумације контаминираних хране, потребно је да прође три дана да би концентрација афлатоксина пала на недетектибилан ниво (van Egmond, 1989). Код преживара, за разлику од моногастричних животиња, не долази до губитка апетита ако је храна контаминирана микотоксинима. Доза афлатоксина од 13 мг/дан није утицала на унос хране код млијечних крава (Applebaum и сар., 1982). Екстремно високе дозе афлатоксина од 50 до 150 мг/дан (од 3 до 9 мг/кг хране) дате у болусу са желатинозном капсулом доводе до значајног пада у козумацији хране због дигестивних и метаболичких поремећаја које изазивају овако високе дозе (Mertens и Watt, 1977). Исти аутори су показали да прашина у сувим хранивима заједно са присуством буђи и спора доводи до пада палатабилности хране код преживара.

Различити подаци су добијени у погледу руминалне биодеградације афлатоксина Б1. Једни аутори су запазили значајан пад иницијалне концентрације Б1 након инкубације са руминалним соком (Engel и Hagemeister, 1978), док други нису добили сигнификантне резултате (Kiessling и сар., 1984). Због чињенице да су метаболити афлатоксина Б1, као што су афлатоксикол и афлатоксин М1, детектовани у румену (Trucksess и сар., 1983), Auerback и сар. (1998б) тражили су ове метаболите када се афлатоксин Б1

in vitro инкубира са руминалним соком. Они су потврдили да афлатоксикол настаје из означеног Б1 афлатоксина дејством руминалне флоре, али нису успјели да нађу афлатоксин М1. Ови аутори су поставили претпоставку да афлатоксин М1 из румена настаје трансформацијом афлатоксина Б1 у јетри и да у румену доспијева преко румино-хепатичне рециркулације. Због чињенице да је биодеградација афлатоксина Б1 у румену ниска, и да је токсичност афлатоксикола приближно иста токсичности нативног токсина, нема јасних доказа о детоксификацији афлатоксина у румену преживара. Као липофилна једињења мале молекулске масе афлатоксини се ресорбују дифузним транспортом. Главно мјесто метаболизма и детоксикације афлатоксина је јетра. У јетри се афлатоксини оксидишу у јако реактивне молекуле, способне да везују критичне молекуле у ћелији као што су нуклеинске киселине и функционални протеини и на тај начин утичу на малигну трансформацију. Афлатоксин М1 настаје у јетри хидроксилацијом афлатоксина Б1. Други афлатоксини М серије нађени су у млијеку и вјероватно потичу из јетре: М2, ГМ1, ГМ2, М2а, ГМ2а. За мљекарску производњу од највећег значаја је афлатоксин М1 због његове доказане токсичности. Од укупне количине унесеног афлатоксина Б1 у јетри се конвертује и излучи млијеком мање од 3% (0,3%–2,2% (Stoloff, 1979; Paterson и сар., 1980)). Према најновијим истраживањима, постоји повезаност између

мљечности крава и конверзије Б1 афлатоксина у М1 млијека. Тако, код крава које имају производњу млијека мању од 35 кг/дан конверзија је 2,5%, док је код крава са производњом већом од 35 кг/дан конверзија 5,4% (Britzi и сар., 2013).

У току биотрансформације афлатоксина, у јетри долази до озбиљних оштећења, што потврђује промјена нивоа јетриних ензима у серуму (табела 1). Због велике метаболичке ак-

тивности, јетра високомлијечних крава је често у лошем стању, што је чини осјетљивом на токсине. Новија истраживања су показала да афлатоксин Б1 и његов метаболит афлатоксикол индукују хепатокарциногенезу код животиња и људи. Према међународној агенцији за истраживање рака (IARC), афлатоксин М1 је класификован у Б2 групу као агенс са токсичношћу и могућом канцерогеношћу за људе.

Табела 1. Дисфункција јетриних ензима код афлатоксикозе преживара

Лактат дехидрогеназа	повећање	Ray и сар. (1986)
Аспартат трансминаза	повећање	Ray и сар. (1986), Buonaccorsi и сар. (1981), Atroshi и сар. (2000)
Укупни билирубин	повећање	Ray и сар. (1986), Lynch и сар. (1972)
Триодтиронин	повећање	Applebaum и Marth (1983)
Албумин, фибриноген	смањење	Buonaccorsi и сар. (1981)
Протромбин, псеудохолинестераза		Buonaccorsi и сар. (1981)
В-липопротеини	смањење	Buonaccorsi и сар. (1981)
Глутамат оксалацетат трансминаза	повећање	Helferich и сар. (1986)
Сорбитол дехидрогеназа	повећање	Helferich и сар. (1986)

ЕФЕКАТ АФЛАТОКСИНА НА ПРОДУКТИВНОСТ МЛИЈЕЧНИХ ГРЛА И РЕЗИДУЕ У МЛИЈЕКУ

Акутна афлатоксикоза са дневном дозом од 50 до 150 мг афлатоксина доводи до наглог пада уноса хране и продукције млијека са повећањем процента млијечне масти (Mertens и

Watt, 1977). Дневна доза од 13 мг непречишћеног афлатоксина Б код крава у средини лактације узрокује смањење производње млијека, али нема знакова поремећаја здравственог стања код посматраних крава. Стадо музних крава које је добијало кукуруз контаминиран са 120 $\mu\text{g/kg}$ (120 ппб) афлатоксина у трајању од једне године је имало значајан пад произво-

дње млијека, удружен са репродуктивним и здравственим проблемима (Guthrie и Beddel, 1979). Аутори су забиљежили повећање производње млијека за 28% три недјеље након уклањања контаминираниог кукуруза из оброка. Британски аутори Jones и Ewart (1979) пратили су стадо од 140 музних крава које су добијале оброк који је садржао брашно кикирикија контаминирано афлатоксином B1, B2, G1 и G2. Концентрација B1 токсина у укупном obroку је била око 0, 02 мг/кг (20 ппб), што је данас максимална дозвољена концентрација афлатоксина у obroку за краве музаре у САД-у. Након три дана од уклањања брашна кикирикија из оброка, дошло је до престанка дијареје, док је продукција млијека благо порасла у наредних 5–8 дана. Тјелесна кондиција крава је такође поправљена. Међутим, у поређењу са контролном групом крава које никада нису добијале храну контаминiranу са афлатоксином, краве из експеримента са брашном кикирикија се нису опоравиле у потпуности.

Као што је већ наведено, код крава конверзија афлатоксина из хране у млијеко варира и креће се од 0,3% до 5,4%. Користећи C14 – обиљежени афлатоксин, Helferich и сар. (1986) су мјерили ниво излучивања афлатоксина код коза. Од укупно унесене дозе афлатоксина храном, млијеком је излучено 1,05%, 30,9% урином и 52,3% фецесом. Након 120 часова од уношења афлатоксина, кумулативни прела-

зак његових метаболита у млијеко крава је приближно 1%. Узимајући ову вриједност као фиксну, максимална дозвољена концентрација афлатоксина у obroку за краве музаре је 5 мг/кг (5 ппб) по европским стандардима.

МЕТОДЕ РЕДУКЦИЈЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ АФЛАТОКСИНА У ХРАНИ ЗА МУЗНЕ КРАВЕ И МЛИЈЕКУ

Због чињенице да су афлатоксини секундарни метаболити гљивица, прије свега *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus*, први корак борбе је смањење нивоа контаминације у пољу. Постоји неколико стратегија за смањење контаминације микотоксинима у пољу, а данас је у развијеним земљама најраширенији метод хемијски третман усјева фунгицидима, алтернативне методе су гајење генетски модификованих биљака или класично укрштање у циљу стварања биљака отпорних на контаминацију гљивицама (Brown и сар., 1999). Након вршидбе, биљке треба чувати у одговарајућим складишним условима. Ови услови подразумевају садржај влаге у биљкама мањи од 13% и релативну влажност ваздуха мању од 50 процената (Jay, 1992).

У сврху смањења концентрације афлатоксина, храна се може третирати прије давања животињама. Третман памуковог сјемена контаминiranог афлатоксином са 1,5% амонијаком и

10% воде у трајању од 21 дан редукује ниво афлатоксина М1 у млијеку 85%–90% (Price и сар., 1982; Ewaidah, 1984) или у месу животиња (Allam и сар., 1999). Третман хране са 61% водоник-пероксидом и накнадним загријавањем на 80 °C у трајању од 30 минута је дало приближно сличне резултате као амонијак (Allam и сар., 1999). Оксидативну деградацију и детоксификацију озоном тестирали су McKenzie и сар. (1997). Додатак 4% калцијум-хидроксида и 0,5% параформалдехида при притиску од 2 атмосфере у трајању од 20 минута у аутоклаву редуковао је садржај афлатоксина са 401 на 29,5 $\mu\text{g/kg}$ (Piva и сар., 1985). Зрачење сировог млијека артефицијално контаминираног афлатоксином М1 ултравиолетним зрацима у трајању од 20 минута на 25 °C смањило је ниво токсина за 60,7% (Yousef, 1986). Додавање 0,5% водоник-пероксида у млијеко поспјешује третман ултравиолетним зрацима пошто је смањење концентрације М1 токсина 89,1%. Третмани амонијаком, водоник-пероксидом, ултравиолетним зрацима и озоном значајно редукују садржај афлатоксина у хранивима, али због техничких разлога нису нашли примјену у комерцијалној производњи хране.

Веома различити подаци су добијени када се тестирала осјетљивост афлатоксина М1 из млијека на третман високим температурама. Purchhase и сар. (1972) тестирали су неколико топлотних третмана на сма-

њење концентрације афлатоксина у млијеку. Најефикаснијим се показало спреј-сушење пошто је садржај афлатоксина М1 у млијеку снижен за 86%. Стерилизација је дала смањење од 81%, сушење на ваљцима 75%, сушење на ваљцима при сниженом притиску 64%, евапорација 61%, пастеризација на 80 °C у трајању 45 секунди 61%, пастеризација на 72 °C у трајању од 45 секунди 45% и пастеризација на 62 °C у трајању од 30 минута 32%. Choudhary и сар. (1998) дошли су до резултата да стерилизација на 121 °C у трајању од 15 минута умањује проценат М1 афлатоксина за 12,21%, док кување млијека умањује садржај М1 афлатоксина за 14,50%. Bakirci (2001) је дошао до резултата да пастеризација снижава ниво М1 токсина у млијеку за 7,62%, док је Deveci (2007) дошао до резултата да пастеризација занемарљиво редукује ниво афлатоксина М1. Други аутори су пак дошли до резултата да је афлатоксин М1 отпоран на температуре пастеризације и стерилизације (Van-Egmond и сар., 1977; Wiseman и Marth, 1983; Yousef и Marth, 1989; Govaries, 2001). Анализе вршене у ветеринарском заводу „Теолаб“ показале су да температура пастеризације од 65 °C у трајању од 30 минута не инактивише афлатоксин М1 у млијеку. Такође је потврђено да замрзавање млијека на -20 °C у трајању од три дана не инактивише М1 токсин. Евидентно је да истраживања новијег датума показују да топлотни третмани имају мало или нимало утицаја на разградњу М1 афла-

токсина, што би се могло приписати прецизнијим методама детекције које се користе у новије вријеме.

Због компликованости претходно наведених метода редукције, за сточаре је тренутно најприхватљивије додавање адсорбенса. Ове материје селективно везују микотоксине у дигестивном тракту, спречавајући њихову ресорпцију и посљедичне негативне ефекте. Phillips и сар. (1988) демонстрирали су да хидратисани натријум-калцијум-алуминосиликат успјешно везује афлатоксин и спречава његову ресорпцију. Такође је експериментисано са бентонитом, анјон размјењивим смолама, катјон размјењивим смолама, активним угљем и каолином. Као задовољавајући адсорбент се показао модификовани (естерификовани) ћелијски зид квасаца (Dewegowda и сар., 1988; Evans и Dawson, 2000; Firmin и сар., 2011). Према њиховим подацима, 0,05% глукомана у оброку везује 58%–75% афлатоксина у широком рН опсегу. Лактобацили, бифидобактерије и пропионобактерије су адсорбавали и до 80% афлатоксина Б1 у *in vitro* и *in vivo* условима (El Nezami и сар., 1998; Aho-kas и сар., 1998; Pierides и сар., 2000). Активни угаљ додат храни у концентрацији 0,25% нема ефекта на концентрацију М1 афлатоксина у млијеку (Diaz и сар., 2004). На тржишту Босне и Херцеговине најдоступнији су препарати на бази зеолита, који се додају у сточну храну у концентрацији од 0,2% до 0,5%. Ниже концентрације се

додају у превентивне сврхе док се више користе када је храна контаминирана токсинима. Ове материје спадају у групу природних алуминосиликата, потпуно су нетоксични за животиње и имају способност да вежу токсине и друге штетне материје у своју јонску решетку. Тако везани токсини не могу да се ресорбују у дигестивном тракту и животиње их излучују изметом заједно са самим солима. Када се упореди цијена препарата на бази зеолита са потенцијалним бенефитима, њихова употреба је сасвим оправдана у свакодневној сточарској производњи. Ипак, због разлике у квалитету ових препарата, исте је потребно набављати од поузданих произвођача који имају доказе о њиховом квалитету.

ЗАКЉУЧАК

Имајући у виду високе критеријуме за максималну дозвољену концентрацију афлатоксина М1 у сировом млијеку, намеће се потреба за кориштењем квалитетних компоненти при производњи хране за музне краве. Да би се ово остварило, потребна је добра производна пракса у току цијелог циклуса производње сировог млијека, с обзиром на то да су могућности за смањење концентрације афлатоксина М1 већ присутног у млијеку јако дискутабилне. Потребно је умањити могућност за контаминацију на пољу, у току жетве, транспорта и чувања сточне хране. Неопходно је вршити контролне прегледе улазних компоненти на садржај афлатоксина Б1. С обзиром на то да постоје задовољава-

јуће методе за редукцију афлатоксина Б1 у крмивима, као и да постоје могућности смањења његове ресорпције у дигестивном тракту животиња, исте је потребно увести као рутинске поступке у производњи сировог млијека. Не мање важан разлог за увођење ових поступака је заштита здравља музних крава, јер је доказано да високе концентрације афлатоксина Б1 у крмивима негативно утичу на здравствено стање музних грла. Утицај ниских концентрација Б1 токсина и његов кумулативни ефекат у дужем временском периоду тек треба испитати. Препорука Светске здравствене организације за садржај афлатоксина М1 у млијеку је смањење испод дозвољених граница, са тежњом ка производњи млијека без афлатоксина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Britzi M., Friedman S., Miron J., Solomon R., Cuneah O., Shimshoni J. A., Ashkenazi R., Armer S., Shlosberg A (2013): *Cary-Over of Aflatoxin M1 in High Yielding Israeli Cows in Mide and Late-Lactation*, Toxins (Basel). January; 5: 173–183.
2. Code of Practice for the Reduction of Aflatoxin B1, in Raw Materials and Supplemental Feedingstuffs for Milk Producing Animals, Cac/Rcp 45-1997.¹
3. Chase L. E., Brown D. L., Bergstrom G. C., Murphy S. C (2013): *Aflatoxin M1 in milk, Dairy Nutrition Fact Sheet*, January, 2013 Revised.
4. Diaz D., Hagler W. J., Blackwelder J., Eve J., Hopkins B., Anderson K., Jones F., Whitlow L. (2004): *Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed*, Mycopatologia 157: 233–41.
5. Firmin S., Morgavi D., Yiannikouris A., Boudra H (2011): *Effectiveness of modified yeast cell wall extracts to reduce aflatoxin B1 absorption in dairy ewes*, J Dairy 94: 5611-9. doi: 10.3168/jds.2011-4446.
6. Jouany, J. P. (2001) The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle. In: *Science and Technology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium*. Nottingham University Press (Ed. T. P. Lyons and K. A. Jacques), UK, pp. 191-224.
7. Mohammadi, H. (2001): "A review of aflatoxin M₁, milk, and milk products," in *Aflatoxins—Biochemistry and Molecular Biology*, chapter 19, InTech, Rijeka, Croatia
8. Pathirana U. P. D., Wimalasiri K. M. S., Silva K. F. S. T., Gunarathne S. P. (2010): *Investigation of Farm Gate Cow Milk for Aflatoxin M₁*, Tropical Agricultural Research 21: 119–125.
9. Pennington A. J., Aflatoxin M₁ in Milk
http://www.uaex.edu/Other_Areas/publications/PDF/FSA-4018.pdf

DOI: 10.7251/VJRS1302261P

UDK 619:616.441:636.7

Горан Параш,¹ Смиљана Параш,² Огњен Вујиновић,³ Огњен Витковић,¹
Бојан Лукач,¹ Игор Чегар¹

ХИПОФУНКЦИЈА ТИРЕОИДНЕ ЖЛИЈЕЗДЕ КОД ПАСА: ПРИКАЗ СЛУЧАЈА

Кратак садржај

У малој пракси данас, за озбиљан рад, готово је незамисливо радити без лабораторијских анализа. Ово потврђују бројни примјери за које је због сличности клиничких симптома неопходна диференцијална дијагностика. Хипотиреоидизам је поремећај функције, који се карактерише смањењем концентрације хормона штитасте жлијезде у циркулацији и смањењем или изостанком његовог биолошког дејства на периферна ткива.

У нашем случају, имамо женку златног ретривера стару седам година. Њен амбулантни картон је углавном испуњаван због нередовних менструалних циклуса, промјена на млијечној жлијезди и слабијег апетита. Касније су настале и промјене на кожи, за које смо установили да нису посљедица утицаја биолошких агенаса, већ хормоналног дисбаланса. Дијагноза је хипотиреоидизам, а терапија се своди на употребу синтетског Т-4 у одговарајућој дози.

Кључне ријечи: пас, хипотиреоидизам, дијагностика, терапија.

Goran Paraš,¹ Smiljana Paraš,² Ognjen Vujinović,³ Ognjen Vitković,¹ Bojan Lukač,¹ Igor Čegar¹

HYPOFUNCTION OF THE THYROID GLAND IN DOGS: CASE REPORT

Abstract

In a small practice is almost unthinkable to do without laboratory analysis today, it is hard work. This is supported by numerous examples which are due to the similarity of clinical symptoms is necessary differential diagnosis. Hy-

¹ Ветеринарска амбуланта „ММ СООР“, Бања Лука.

² Природно-математички факултет, Бања Лука.

³ Агенција за обиљежавање животиња, Бања Лука.

pothyroidism is a disorder of function of thyroid gland, which is characterized by reduced concentrations hormones in the circulation and the reduction or absence of biological effects in peripheral tissues.

In our case, we have a female golden retriever 7 years old. Her medical files is generally fulfilled due to irregular menstrual cycles, changes in the milk gland, reduce appetite. Later there appeared changes in the skin, and we found that they didn't the result of biological agents, but it was hormonal imbalances. The diagnosis was hypothyroidism, and treatment included use of synthetic T-4 in the appropriate dose.

Keywords: dog, hypothyroidism, diagnosis, treatment.

УВОД

Штитаста жлијезда (lat. *glandula thireoidea*) састоји се од два режња (*lobusa*), повезана једним мање или више развијеним појасом жлезданог ткива (*isthmus*). Режњеви су код већине домаћих животиња смјештени у предњем дијелу врата, са обје стране почетног дијела душника. Код паса није ријетка појава акцесорних дијелова жлезданог ткива расутих дуж трахеје, од грклана, све до дијафрагме.

Хистолошку грађу штитасте жлијезде карактеришу фоликули, чији се зид састоји од једнослојног епитела, док је лумен фоликула испуњен хомогеном, желатинозном материјом која се назива колоид. Он се састоји од гликопротеина високе молекулске масе – тиреоглобулина. Њега производе у луче фоликулске ћелије. Биосинтеза хормона штитасте жлијезде, специфична је по томе што се њени хормони, триодтиронин (Т3) и

тироксин (Т4) коначно синтетишу у лумену фоликула. За њихову синтезу је неопходан јодид, чија је количина унутар фоликулских ћелија 20–30 пута већа него у плазми, јер га оне фиксирају и концентрују.

На секрецију хормона штитасте жлијезде значајан утицај имају тиреостимулишући хормон (TSH) из аденохипофизе и тиреотропни ослобађајући хормон из хипоталамуса (TRH). Од укупне количине хормона штитасте жлијезде, у слободном стању се налази око 0,05%–0,5%, док је остатак везан за протеине крвне плазме. Т3 и Т4 се путем крви транспортују до свих ткива у организму и, слично стероидима, дјелују након проласка кроз ћелијску мембрану.

Унутар ћелије врши се дејодинација Т4 и добија се Т3 који се везује за рецепторе на мембрани митохондрија и рецепторе у једру ћелије. Тако се везивањем за митохондрије повећава

потрошња кисеоника у ћелији и расте ниво базалног метаболизма, а везивањем за рецепторе у једру повећава транскрипција и транслација, праћена синтезом нових протеина у ћелији. Хормони штитасте жлијезде утичу на ниво базалног метаболизма, раст и диферентовање ћелија у различитим ткивима и на бројне метаболичке процесе.

Хипофункција тиреоидне жлијезде може бити:

- хипофункција са атрофијом и ишчезавањем тиреоидног ткива (тиреопривна хипотиреоза),
- хипофункција са хипертрофијом и хиперплазијом тиреоидеје (хипотиреоза са струмом).

Узроци могу бити примарни, лимфоцитни тиреоидитис и идиопатска фоликуларна атрофија, због патолошких промјена на самој жлијезди, тиреопривна хипотиреоза је најчешћа код паса, секундарни због промјена у секрецији TSH из аденохипофизе. Терцијарни облик болести настаје услед поремећаја у секрецији TRH из хипоталамуса и није описан код паса. За кожу се каже да је огледало здравља и већина промјена у организму различите етиологије манифестује се на кожи.

Тако је и у овом нашем примјеру. Власник је доводио кују златног ретривера са симптомима проријеђене длаке, нерегуларног полног циклуса, увећани појединачно мамарни ком-

плекси, сомнолентно стање уз слабије изражен апетит, за који би се могло рећи да животиња бира храну. Активност је знатно смањена, а тјелесна маса уравнотежена за ову расу. Током једног полног циклуса дошло је до планираног парења и концепције, након које су окоћена витална штенад.

Годину дана касније поново се дешавају проблеми са полным циклусом који завршавају пиометром, због чега се одлучујемо на овариохистеректомију. Смирују се симптоми везани за промјене на млијечној жлијезди, али су промјене на кожи унапредовале. Дошло је до хиперпигментације коже, али и до престанка раста длаке на мјесту гдје смо припремали оперативно поље. Прегледом општег стања одлучили смо се за лабораторијски налаз крви. Осим хематолошке анализе диференцијалне крвне слике, урадили смо концентрацију тиреоидног хормона, слободног FT4 и добили вриједност 5,3 pmol/l, док су физиолошке вриједности од 10,3 pmol/l до 23,1 pmol/l.

Установили смо да се ради о хипотиреози и да су све промјене највјероватније везане за функцију ове жлијезде. Поред промјена на кожи и репродуктивном систему, могу се појавити полинеуропатије, кардиомиопатије, смањен мотилитет цријева и др. Све то зависи од степена промјена у функцији ове жлијезде. T4 је показатељ укупне синтезе у штитњачи, али још важнији је слободни FT4 јер је он показатељ интензитета лучења из

штитне жлијезде, затим периферног претварања Т4 у Т3, као и елиминације хормона у даљем метаболизму. Често смо у ситуацији да имамо сличне промјене на кожи паса, гдје су налази брисева и скарификата коже негативни и гдје употреба антибиотика, антимикотика, антиектопаразита не даје никакве резултате.

Дијагноза се поставља на основу клиничких симптома и лабораторијске анализе крви. Диференцијално-дијагностички треба је разликовати од других дерматоза, нарочито хормоналне етиологије, хиперестрогенизма, кушинга, сезонског недостатка мелатонина. Ми смо у терапији користили „Летрокс“ левотироксин, синтетички, који је доступан на тржишту од 25, 50, 75, 100, 150 и 200 микрограма. Користили смо 50 микрограма једном дневно и за три недјеље добили одличне резултате. Летаргија је нестала већ за недјељу дана, поправио се апетит и опште стање, куја је била много расположенија и активнија, а за потпуни опоравак длаке је требало око два мјесеца. Уз ову терапију смо користили витаминско-минералне додатке као потпорну терапију (Canilete). Озби-

љнији рад у дијагностици малих животиња незамислив је без лабораторије. Пажљиво посматрање и детаљан преглед животиње уз што комплетније анамнестичке податке и увид у раније здравствено стање основ је за успјех у дијагностици и терапији.

ЛИТЕРАТУРА

1. Татјана Божић (2007): *Патолошка физиологија домаћих животиња*. Научна КМД, Београд.
2. З. Анђелковић, Љ. Сомер, М. Перовић, Б. Аврамовић, Љ. Миленкова, Н. Костовска, А. Петровић (2001): *Хистолошка грађа орјана*. Бонафидес, Ниш.
3. Велибор Стојић (2012): *Физиологија домаћих животиња*, Научна КМД, Београд.
4. Keith A. Hnilica (2010): *Small Animal dermatology - A Color Atlas and Therapeutic Guide* Elsevier Health Sciences.
5. G. T. Wilkinson, R.G Harvey (1994): *A color atlas of small animal dermatology: a guide to diagnosis*. Mosby – Wolfe.

DOI: 10.7251/VJRS1302265N

UDK 616.981.42(497.6)»2009/2012»

Цено Хадовић, Зорана Мехмедбашић Девеџић, Александар Немет,
Свјетлана Батинић¹

КОНТРОЛА БРУЦЕЛОЗЕ У БОСНИ И ХЕРЦЕГОВИНИ У ПЕРИОДУ ЈАНУАР 2009. – ДЕЦЕМБАР 2012. ГОДИНЕ

Кратак садржај

Бруцелоза малих и великих преживара први пут је утврђена у Босни и Херцеговини половином 1985. године на територији општине Коњиц и запријетила да постане врло озбиљан здравствени проблем. До 2000. године не постоје адекватни подаци о заступљености бруцелозе у Босни и Херцеговини. Ипак, на основу садашњих података, евидентно је да се у наведеном периоду болест раширила на ширем подручју Босне и Херцеговине, да би у 2008. години дошло до кулминације броја случајева бруцелозе код животиња и људи, при чему је дијагностиковано 22.122 случаја код оваца и коза, 260 случајева код говеда, те пријављено 994 случаја болести код људи.

С обзиром на одлучан став који је ветеринарска служба Босне и Херцеговине заузела о питању сузбијања бруцелозе, кроз провођење мјера вакцинације малих преживара и мониторинга бруцелозе код говеда, у периоду од 2009. до 2012. године забиљежен је изразит пад појаве ове болести како код животиња, тако и код људи.

Циљ овог рада је да прикаже провођење и резултате мјера контроле бруцелозе у Босни и Херцеговини у периоду 2009–2012. године.

Кључне ријечи: бруцелоза, вакцинација, мониторинг, Босна и Херцеговина.

¹ Канцеларија за ветеринарство БиХ, Сарајево.

Dženo Hadžović, Zorana Mehmedbašić Devedžić, Aleksandar Nemet, Svjetlana Batinić

CONTROL OF BRUCELLOSIS IN BOSNIA AND HERZEGOVINA FOR THE PERIOD JANUARY 2009 – DECEMBER 2012

Abstract

Brucellosis in small and large ruminants was determined for the first time in Bosnia and Herzegovina in 1985 at the territory of municipality Konjic when it threatened to become a very serious health issue. Until 2000 there are no adequate data concerning occurrence of brucellosis in Bosnia and Herzegovina. However, on the basis of the current data it is evident that the disease has spread on the wider territory of Bosnia and Herzegovina within that period. Culmination of human and animal cases of brucellosis was in 2008, when 22.122 cases of brucellosis was diagnosed in sheep and goats, 260 cases in cattle and 994 human cases was reported.

In relation with the determined approach of the Veterinary Service of Bosnia and Herzegovina in terms of prevention of brucellosis through the enforcement of vaccination of small ruminants, monitoring in cattle in the period 2009 - 2012 there was a serious decrease in occurrence of the disease, both in animals and humans.

The aim of this paper is to present the implementation and results of the brucellosis control measures in Bosnia and Herzegovina in the period 2009 - 2012.

Keywords: Brucellosis, vaccination, monitoring, Bosnia and Herzegovina.

УВОД

Бруцелоза (*Brucellosis*) спада у најраспрострањеније природножарисне инфекције зоонозног карактера. Примарно, то је болест домаћих животиња, али и људи, код којих се манифестује акутним и хроничним

током [2, 3]. Узрочник су бактерије (мали кокобацили) из рода *Brucella*, који обухвата шест врста, различитих по вирулентности и афинитету према домаћину [4, 5]. Појединачни случајеви бруцелозе животиња (углавном преживара) на територији Босне и

Херцеговине регистровани су прије и након драматичних и трагичних догађаја (1991–1995). Примјењивана су правила за контролу болести по моделу „тестирај и уклони“, као ефикасан модел при спорадичној појави болести. Нагли пораст броја обољелих људи у 2008. години представљао је разлог за значајнија дијагностичка испитивања животиња [13]. Резултати су приказани у табели бр. 1. Проблем

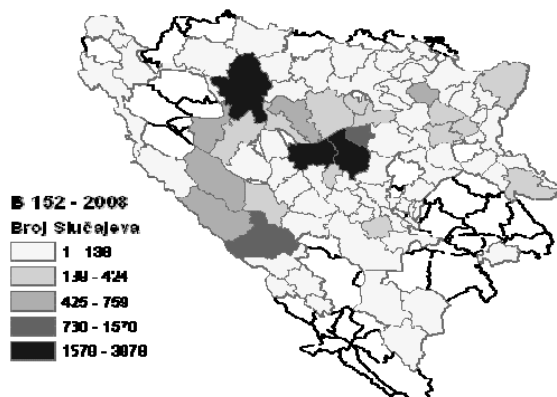
контролисања болести преносивих на људе (зооноза) путем директног или индиректног контакта, као и путем уношења хране животињског поријекла (углавном млијека и млијечних производа који нису пастеризовани), представља приоритет у раду ветеринарског сервиса у Босни и Херцеговини. Резултати су приказани у табели бр. 1.

Табела 1. Преглед резултата дијагностичких испитивања на бруцелозу у 2008. години

Ентитет	Овце и козе			Хумани серуми		
	Испитано	Позитивно	Поз. %	Испитано	Позитивно	% поз.
РС	211500	6980	3,30			
ФБиХ	328000	17600	5,36			
Укупно БиХ	539500	24580	4,55	2984	994	33,3

На слици бр. 1. представљамо број жаришта и случајева у 2008. години на нивоу све 143 општине, колико их има у Босни и Херцеговини.

Слика 1. Географски приказ стања бруцелозе у 2008. години



Према процјенама, дијагностички је претражено око 70% популације малих преживара, првенствено оваца, приликом чега је дијагностиковано 24.580 позитивних оваца и коза, те утврђено постојање 2007 жаришта болести и захваћено око 60% територије земље. Те године је претражено око 80.000 говеда те утврђено 260 позитивних случајева код истих. Уништено је око 70.000 животиња и настала је директна штета за буџет земље у износу од око 15 милиона КМ [13]. Узрочник је потврђен у референтној лабораторији у Француској као *Bruceella melitensis biovar 2*. С обзиром на величину земље, дисперзију серопозитивних животиња, величину стада и нарочито на начине држања и локалне навике становништва, Босна и Херцеговина се определијелила за примјену јединственог модела контроле и сузбијања болести у цијелој земљи. Добити подаци су представљали основу и сазнање о:

- а) преваленци болести на простору БиХ (4,55%),
- б) могућим путевима ширења болести,
- в) степену угрожености здравља људи, али и определијелили
- г) начин контроле болести.

Велики број обољелих људи, нарочито у руралним срединама и међу експонираним групама, у корелацији је са бројем откривених жаришта бруцелозе животиња, мада се оправдано

процјењује да је број обољелих људи и оних који нису опсервирани много већи од званично потврђених [12].

Ветеринарска служба у Босни и Херцеговини је морала, без обзира на бројна ограничења, припремити и институционализовати модел борбе против бруцелозе заснован на резултатима испитивања, што је требало да заустави ширење болести међу животињама и смањи пренос болести на људе [9, 10]. Бруцелоза је представљала велики здравствени проблем, али и значајно социјално-економско питање, посебно у контексту привређивања огромног броја сеоског становништва, поготово у брдским и планинским дијеловима земље. Номадски и полуномадски начин држања животиња, нарочито оваца, изостанак контроле кретања животиња, неидентификоване животиње, недовољно конзистентни материјални ресурси, ограничења власти у компетенцијама, недовољна сарадња ветеринарског и здравственог система представљали су значајна ограничења за ефикасну примјену било којих, струци познатих, рјешења [7, 13]. Контрола болести подразумијева низ мјера и поступака који се проводе у циљу смањења преваленце и инциденце на дозвољен ниво, тако да се избјегне озбиљна опасност за животињску популацију и људско здравље. За постизање кључних циљева потребна је политичка одлука, компетентне службе и

новац. У складу са тим су и FAO препоруке, које подразумевају [15]:

- а) међусекторске кооперативне акције на пољу ветеринарства и здравства, којима би се смањио број оболелих животиња и подигла свијест људи о питању превенције,
- б) националну стратегију контроле ризика базирану на присуству болести на локалном (БиХ) нивоу и лекцијама наученим из примјера других земаља,
- в) покретање акционог плана базираног на шест основних компоненти контроле која може бити покренута и на бази некомплетних информација и података:
 - основно серо-преовлађујуће испитивање животиња, домаћинства, заједница и села,
 - програм контроле заснован на резултатима испитивања,
 - примјена договорених активности о питању контроле које би проводиле компетентне националне ветеринарске и здравствене службе заједно са приватним сектором,
 - лабораторијска контрола агенаса који су проузроковали поbacher,
 - праћење резултата контроле квалитета и промјена у јављању болести,
 - рано упозоравање на ширење болести на нова подручја [15].

Упоредо са анализом бруцелозе малих преживара, вршена су дијагности-

чка испитивања и других животињских врста, првенствено говеда, мада у почетку у ограниченом обиму и само над категоријама говеда у производњи млијека. С обзиром на то да су, према традицији, узгој оваца у БиХ и говеда дио заједничког имања и да дијеле исти животни простор, потребно је било дотадашњи програм контроле здравственог статуса говеда проширити на све категорије.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Провођење вакцинације и провјере имуногености вакцине код малих преживара те провођење мониторинга бруцелозе код говеда проведено је на цјелокупној територији Босне и Херцеговине. Током периода вакцинације, обухваћен је комплетан фонд популације малих преживара, с тим да је само прве године проведена масовна вакцинација оваца и коза свих старосних категорија, док је осталих година приоритет био на млађим категоријама (до шест мјесеци), док су изузетак представљале одрасле јединке које нису претходних година обухваћене вакцинацијом због гравидности. Када је у питању провођење мониторинга код говеда, по годишњем плану је предвиђено узорковање крви 125.000 млијечних говеда старијих од 12 мјесеци и расплодних бикова старијих од 24 мјесеца. У склопу провођења наведених мјера контроле, кориштена је обавезна заштитна опрема која се састоји од рукавица (нитрилних), маски за нос и уста, као и наочала.

Код провођења провјере имуногености вакцине, од свих јединки узета је крв пункцијом вене југуларис, из које је центрифугирањем (10 мин. на 3000 рпм) издвојен серум. Узорци серума анализирани су у ветеринарским референтним лабораторијама, и то на Ветеринарском факултету у Сарајеву и на Ветеринарском институту „Др Васо Бутозан“ у Бањој Луци. За анализу серума кориштене су двије врсте метода, скрининг и конфирмацијске методе, односно у овом случају РБ (росе бенгал) и РВК (реакција везивања комплемената). Код провођења мониторинга бруцелозе код говеда, поред набројаних референтних лабораторија, четири друге ветеринарске дијагностичке лабораторије су укљу-

чене само за провођење скрининг метода, али не и конфирмацијских.

РЕЗУЛТАТИ

Стратегијом вакцинације и мониторинга се могао подићи ниво отпорности животиња и ограничити ширење болести. Програм масовне вакцинације малих преживара и упоредна контрола других животињских врста на бруцелозу (првенствено говеда) почео се проводити 2009. године, а вакцинација младих животиња се наставила и трајаће осам година (до 2016. године), након чега ће се утврђивати статус земље по признатим процедурама. У табели бр. 2. су приказани постигнути резултати у провођењу програма масовне вакцинације малих преживара.

Табела 2. Преглед броја вакцинисаних оваца и коза и статус вакцинисаних младих животиња

Година	Број вакцинисаних оваца и коза (одрасле и младе животиње)	Број вакцинисаних младих животиња (до 6 мј. старости)	Број потврђених случајева бруцелозе код људи
2008.	-	-	994
2009.	666.474	-	458
2010.	296.421	177.631	168
2011.	178.744	165.290	72
2012.	180.913	171.867	68

За вакцинацију је коришћена Rev1 вакцина, припремљена за конјунктивалну апликацију, шпанског произвођача CZV [1, 2]. Број вакцинисаних животиња у првој години представља обухват од 85%–90% популације малих преживара у земљи. Резултати

добijени наконведеног мониторинга статуса вакцинисаних младих животиња (20–80 дана пост-вакц.) показују серопозитиван одговор код скоро 90% животиња. Активности вакцинације малих преживара пратила је осмишљена информативна кампања и

перманентна едукација ветеринарског особља и сточара (држалаца животиња). Ветеринарски радници су користили прописану заштитну опрему, као и особље које је асистирало у послу. И поред предузетих мјера опреза и заштите, један број људи ангажованих на вакцинацији (углавном ветеринарских радника) показао је серопозитивност на бруцелозу или је имао повећане титре антители на бруцелозу, али без клиничких знакова болести. Јасна објашњења од стране експерата из хуманог здравственог

сектора о могућим разлозима ових акцидентата нису добијена, мада преовладава мишљење да је преекспонираност у потенцијално инфективним просторима и непрофесионално поступање у кориштењу заштитне опреме допринијело овој ситуацији. Упоредо са провођењем вакцинације малих преживара, врши се и дијагностичка контрола говеда (свих категорија старијих од 12 мјесеци) на присуство бруцелозе. Резултати истих су приказани у табели бр. 3.

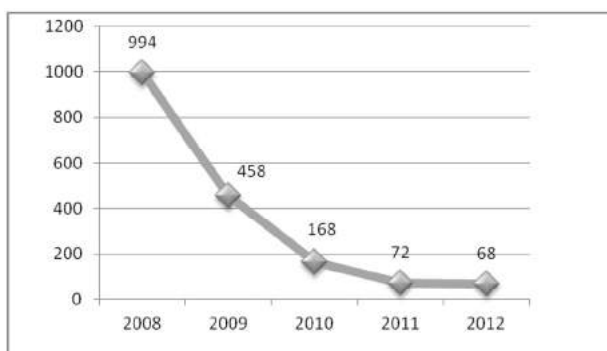
Табела 3. Резултати спровођења мониторинга бруцелозе код говеда

Година	Ентитет	Бр. узорак	Позитивно
2011.	ФБиХ	64.789	18
	РС	47.850	8
2012.	ФБиХ	67.251	16
	РС	64.789	10

Међутим, примарни циљ у изради Оперативног програма за контролу бруцелозе у БиХ представља смањење броја обољелих људи, који у суштини представља најбољи показатељ успје-

шности спровођења програма. С тим у вези, на графикону 1. су регистровани случајеви хумане бруцелозе у БиХ, за период 2008–2012. године.

Графикон 1. Регистровани случајеви хумане бруцелозе у БиХ, за период 2008–2012. године



ДИСКУСИЈА

Босна и Херцеговина има разнолику географску структуру и значајан дио становништва живи у брдско-планинском подручју земље [7]. Ове руралне заједнице су традиционално одређене на бављење сточарством као извором егзистенције, без већих алтернатива за друга занимања. Стога би наставак примјене мјера уклањања болесних и сумњивих животиња, без замјенског фонда, довео до биолошког смањења сточног фонда, првенствено малих преживара и говеда [8, 9]. Такву ситуацију сточари сами не би могли успјешно превазићи и неминовно би се јавиле егзистенцијалне миграције сеоског становништва. Искуства других земаља стечена у сузбијању и искорјењивању бруцелозе су драгоцјена, али смо у БиХ покушали афирмисати властити приступ проблему бруцелозе и досадашњи резултати дају наду у успјех одабране стратегије. Наш оптимизам је заснован на ефикасном управљању програмом и потврђеној компетентности ветеринарске службе (без обзира на то о ком се њеном нивоу или сегменту ради).

ЗАКЉУЦИ

Босни и Херцеговини предстоји дуготрајан процес сузбијања бруцелозе, чији ће успјех зависити и од других фактора, у првом реду: досљедне политичке и финансијске подршке пројекту, успостављању надзора над кретањем животиња, потпуној и ажу-

рној идентификацији животиња, досљедном провођењу дијагностичких контрола и других врста животиња (првенствено говеда) [10], сарадње са здравственим сектором, сарадње и повјерења фармера, едукације различитих група и учесника у програму контроле бруцелозе, позитивне информативне кампање, праћења ефеката усвојених мјера и благовремених корекција у складу са објективним околностима на терену и сл. [11]. Бруцелоза представља проблем региона те је неопходна сарадња свих држава на плану заустављања ширења, сузбијања и искорјењивања бруцелозе, посебно имајући у виду захтјеве за слободном трговином и отвореним тржиштем, присутну порозност граница и друге чињенице од значаја за праћење и контролу болести [6, 13].

ЛИТЕРАТУРА

1. Alton G. G. (1990): *Rev1 Brucella melitensis vaccine. A review of ten YEARS of study*. Vet. Bull 37: 793–800.
2. Blasco J. M. (1997): *A review of the use of B.melitensis Rev1 vaccine in adult sheep and goats*. Prev. Vet. Med 31: 415–420.
3. Garin Bastuji B. (1996): *Contol programmes of B.melitensis infection in sheep and goats, In: FAO/WHO/OIE round table on the use of Rev1 vaccine in smal ruminants and catle (B Garin-Bastuji, A*

- Benkirane, eds), CNEVA, Maisons-Alfort, France, 3–6.*
4. Paul Nikoleti (2009): *Brucellosis: Past, Present, Future*, Book of Abstracts, Meta NET Project Thematic Scientific Conference: Brucellosis in Mediterranean Region, Struga–Ohrid.
 5. J. M. Blasco (2009): *Control and eradication strategies of B. Melitensis infection in sheep and goats*, Book of Abstracts, Meta NET Project Thematic Scientific Conference: Brucellosis in Mediterranean Region, Struga–Ohrid.
 6. Menachem Banai (2009): *Vaccination against endemic Brucella melitensis within the framework of a national control program*, Book of Abstracts, Meta NET Project Thematic Scientific Conference: Brucellosis in Mediterranean Region, Struga–Ohrid.
 7. Недић Н. Д. Ветеринарско-еидемиолошка ситуација у Републици Српској и Босни и Херцеговини. Зборник кратких садржаја. 14. годишње савјетовање ветеринара Републике Српске, 25–28, Јахорина, Хотел Бистрица, 3–6.6.2009.
 8. Недић Д. Анализа стања заразних болести животиња и планирање њихове сузбијања. Зборник радова и крајњих садржаја. Симпозијум XI епизоотиолошки дани, 5–8, Апатин, Бања Јунаковић, 1–4.4.2009.
 9. Недић Д. Менаџмент и припрема националних планова за неуправљене случајеве појаве болести животиња. Ветеринарски журнал Републике Српске, Vol. VIII, број 2, 91–98. Бања Лука 2008.
 10. Недић Д., Мехмедбашић Зорана, Чобанов Д., Танковић С.: Анализа актуелне ветеринарско-еидемиолошке ситуације у Босни и Херцеговини. Зборник кратких садржаја, 13. годишње савјетовање ветеринара Републике Српске, 19–20, Теслић, 4–7.6.2008.
 11. Toni Kirandijski (2009): *Brucellosis in small ruminants in the Republic of Macedonia*. Book of Abstracts, Meta NET Project Thematic Scientific Conference: Brucellosis in Mediterranean Region, Struga–Ohrid.
 12. Тркуља Р., Сантрач Виолета, Деспотовић Д., Недић Д.: Бруцелоза у Републици Српској. Зборник кратких садржаја, 13. годишње савјетовање ветеринара Републике Српске, 21–22, Теслић, 4–7.6.2008.
 13. Недић Д., Тркуља Р., Мехмедбашић Девеџић Зорана, Хаковић Џ.: Управљање борбом против бруцелозе. Зборник реферата и кратких садржаја, 124–125, 21. савјетовање ветеринара Србије, Златибор, 15–18.9.2010.
 14. FAO/OIE/WHO (1997): *Animal Health Yearbook*, FAO Animal Production and Health Series, FAO, Rome Italy.

Oliver Stevanović,¹ Darko Marinković²

ZASTUPLJENOST I TIPOVI TUMORA MLEČNE ŽLEZDE KOD KUJA U BIOPSIJSKOM MATERIJALU

Kratak sadržaj

Mlečna žlezda kuja je podložna neoplastičnim i neneoplastičnim patološkim promenama. Neoplazije ili tumori mlečne žlezde (TMŽ) predstavljaju najučestalije tumore kuja i samim tim važan problem u veterinarskoj medicini. Retrospektivnom studijom su obuhvaćene sve patološke alteracije u uzorcima mlečne žlezde pasa koje su dijagnostikovane u razdoblju od 1. januara 2008. godine do 15. novembra 2012. godine u laboratoriji Katedre za patologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Tkivni uzorci predstavljaju biopsijski materijal mlečne žlezde pasa koji je histopatološki analiziran. Istražen je uticaj starosti i rase na pojavljivanje patoloških promena na mlečnoj žlezdi pasa. Analizirano je i klasifikovano 258 patoloških promena mlečne žlezde pasa. Kod ženki je dijagnostikovano 257 (99,7%), a kod mužjaka jedna (0,3%) promena na mlečnoj žlezdi. Hiperplazija i displazija mlečne žlezde, kao i duktalna ektazija predstavljaju jedine neneoplastične promene utvrđene u retrospektivnoj analizi sa prevalencom od 3,90%. Prosečna starost 257 kuja sa patološkim promenama na mlečnoj žlezdi iznosila je $9,53 \pm 2,79$ godine sa opsegom od 1 do 17 godina. Patološke promene su dijagnostikovane kod 32 rase kuja. Najčešća maligna alteracija je bila prosti karcinom (49,8%), dok je benigni mešoviti tumor bio najzastupljenija benigna neoplazma (5,2%). Najučestalije rase sa TMŽ bile su mešanci, terijeri i španijeli, dok je prosek godina obolelih kuja iznosio 9,53 godine i nije se značajno menjao u zavisnosti od tipa promene.

Ključne reči: mlečna žlezda, kuje, neoplastične promene.

¹ Apsolvent Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Bulevar oslobođenja, 11000 Beograd.

² Docent, Katedra za patologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Bulevar oslobođenja, 11000 Beograd.

Oliver Stevanović,¹ Darko Marinković²

PREVALENCE AND TYPES OF BITCH MAMMARY GLAND TUMORS IN THE BIOPSY MATERIAL

Abstract

Mammary gland of bitches is susceptible to neoplastic and nonneoplastic pathological changes. Neoplasia or tumors of the mammary gland (TMG) are the most common tumors in female dogs and therefore an important issue in veterinary medicine. The retrospective study included all pathological alterations that were diagnosed between 1. January 2008 and 15 November 2012 in the the laboratory in the Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine in Belgrade. Tissue samples are biopsy material of mammary gland, which was histopathologically analyzed. We studied the effect of age and race on the incidence of pathological changes on the mammary gland. During a investigation period we analyzed and classified 258 pathological changes of mammary gland in dogs. In the females were diagnosed 257 (99.70%), and in males one (0.30%) alteration of mammary gland. Hyperplasia / dysplasia and mammary ductal ectasia are the only nonneoplastic changes that were found in a retrospective analysis with prevalence 3,90%. The average age of the 257 bitches with pathological changes on the mammary gland was 9.53 ± 2.79 years, with a range from 1 to 17 years. Pathological changes were diagnosed in the 32 races. The most common malignant transformation was simple carcinoma (49.80%), while the benign mixed tumor was the most common benign neoplastic change (5,20%). The most prevalent breed with TMG were crossbreed, terriers and spaniels, while the average age of patients was 9.53 years and did not change significantly depending on the type of change.

Key words: mammary gland, female dogs, neoplastic, changes.

UVOD

Mlečna žlezda kuja je podložna neoplastičnim i neneoplastičnim patološkim promenama. Tumori mlečne žlezde (TMŽ) predstavljaju najučestalije neo-

plazme kuja i samim tim važan problem u veterinarskoj medicini. Načinjeni su mnogi naponi u pravcu usvajanja kriterijuma za standardizaciju dijagnoze, razumevanja patološkog ponašanja i na-

predovanja tumora, kao i za procenu prognostičkih faktora, uključujući morfologiju, istraživanja onkogeni i genske alteracije. Etiologija tumora mlečne žlezde nije poznata, ali faktori rizika koji su povezani sa povećanom incidencijom pojavljivanja TMŽ kod kuja su detaljno proučeni. Hormonalni uticaj i gojaznost mladih kuja su faktori koji povećavaju mogućnost nastanka TMŽ (Alenza i sar., 1998). Veća stopa pojavljivanja TMŽ je zapažena kod kuja starijih od šest godina, s maksimalnim rizikom kod starosti od devet do 11 godina. TMŽ se retko pojavljuju kod kuja koje su mlađe od dve godine (Brodey i sar., 1983). Povećana incidenca je zapažena kod velikih i malih rasa pasa (Brodey i sar., 1983; Dorn i sar., 1968). Rasna predispozicija je zapažena, ali varira zavisno od studije. Najčešća dispozicija uočena je kod pudli, a zatim kod poentera, retrievera, setera i španijela (Moulton, 1990; Zatloukal, 2005). S druge strane, neki autori smatraju da predispozicija rasa zavisi od same zastupljenosti rase u populaciji pasa (Alenza i sar., 2000).

U zavisnosti od histoloških kriterijuma, određeno je da polovina (42%–55%) tumora koji su odstranjeni hirurškim putem sa mlečne žlezde ima zloćudan karakter (Priester, 1979; Sorenmo, 2003). S druge strane, postoje i kontroverzna zapažanja. Naime, Simeonov i Stoikov (2006) tvrde da su u svojoj studiji imali 81% malignih i samo 19% benignih tumora mlečne žlezde. Karcinomi čine 80%–95% svih malignih tumora (Moulton i sar., 1970), sarkomi

5%–10%, dok se karcinosarkomi vrlo retko javljaju (Benjamin i sar., 1999). Adenomi čine 60% svih benignih tumora mlečne žlezde, za njima slede benigni mešoviti tumori sa približno 30% i na kraju papilomi kanala sa približno 10% svih benignih tumora. Fibroadenomi su vrlo retki tumori mlečne žlezde (Benjamin i sar., 1999). Kao što se da zapaziti, rađena su mnoga retrospektivna istraživanja koja se bave epizootološkim, patološkim i kliničkim osobinama TMŽ (Brodey i sar., 1966; Dorn i sar., 1968; Zatloukal i sar., 2005; Sontas i sar., 2009; Ežerskytė i sar., 2011). Međutim, u zavisnosti od mesta gde je studija vršena i klasifikacija koje su korišćene prilikom dijagnoza i gradacija tumora, dobijeni su različiti rezultati koji ne mogu dati konačan i odgovor o navedenim osobinama TMŽ kod kuja.

Stoga, cilj našeg ispitivanja je da prikazemo pojavljivanje, odnos i klasifikaciju histoloških tipova patoloških promena mlečne žlezde kuja koje su dijagnostikovane u laboratoriji Katedre za patologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu. Uz ovo, analizirali smo mogućnost uticaja rase i starosti kuja na pojavljivanje pojedinih patoloških promena na mlečnoj žlezdi kuja.

MATERIJAL I METODE

Retrospektivnom studijom su obuhvaćeni svi TMŽ koji su dijagnostikovani u razdoblju od 1. januara 2008. godine do 15. novembra 2012. godine u laboratoriji Katedre za patologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu.

Tkivni uzorci predstavljaju biopsijski materijal mlečne žlezde kuja koji je histopatološki analiziran. Uzorci za histopatološka ispitivanja fiksirani su u 10% puferizovanom formalinu ne duže od 48 sati, nakon čega su procesovani u automatskom tkivnom procesoru. Tkiva su uklapana u parafinske kalupe, a tkivni isecci debljine 3–5µm bojeni su uobičajenom hematoksilin-eozin (HE), Gomori i PAS metodom. Imunohistohe-mijske metode korištene su po potrebi.

Dostupni podaci o starosti i rasi kuja, broju dijagnostikovanih patoloških promena i odnosu između tipova promena su analizirani i klasifikovani. Za klasifikaciju TMŽ je uzeta šema iz 1999. godine koja je objavljena u WHO biltenu od strane Mis-dorpa i saradnika. Prikupljeni podaci su statistički obrađeni (aritmetička sredina – X, standardna devijacija – SD, standardna greška – SEM, interval varijacije – Iv) u GraphPad softveru za deskriptivnu stati-stiku.

REZULTATI

Za vreme istraživanja, koje je obuhva-tilo period od 1. januara 2008. godine do 15. novembra 2012. godine, analizirano je i klasifikovano 258 patoloških promena mlečne žlezde pasa. Kod kuja su dijagno-stikovane 257 (99,7%), a kod mužjaka sa-mo 1 (0,3%) promena, i to adenom mlečne žlezde kod nemačkog ovčara. Neoplastične lezije su dijagnostikovane u 247 (96,1%), dok su neneoplastične preomene zapažene u 10 (3,9%) slučajeva. U laboratoriji Katedre za patologiju ukupno je dijagnostikovano 1422 tumora različitih pasa, što znači da je zastupljenost neoplazmi i ostalih lezija na mlečnoj žlezdi kuja iznosila 18,07%. Hiperplazija/ displazija mlečne žlezde i duktalna ektazija predstavljaju jedine neneoplastične promene utvrđene u retrospektivnoj analizi. Detaljniji rezultati o učestalosti tumora po godinama prika-zani su u tabeli 1:

Tabela 1. Prikaz broja dijagnostikovanih tumora mlečne žlezde kuja po godinama u retrospektivnoj studiji

Dijagnostikovane promene	2008.	2009.	2010.	2011.	2012. (nov.)	Ukupno
Maligni tumori	55	41	45	32	26	199
Benigni tumori	5	8	8	5	6	32
Ostali tumori	1	1	3	5	6	16
Hiperplazija/ displazija	5	1	3	0	1	10

U daljem toku istraživanja, tipovi navedenih promena mlečne žlezde upoređeni su sa starošću kuja i statistički obrađeni (tabela 2). Prosečna starost 257 kuja sa patološkim promenama na mlečnoj žlezdi iznosila je $9,53 \pm 2,79$ godine sa opsegom od 1 do 17 godina.

Tabela 2. *Tabela odnosa statistički obrađene starosti kuja i tipova patoloških promena na mlečnoj žlezdi (u dva slučaja nisu bili poznati rezultati)*

Tip patološke promene	X	SD	SEM	Iv	N
Maligni tumori	9,67	2,77	0,19	1–17	199
Benigni tumori	9,20	2,65	0,46	4–14	32
Ostali tumori	8,40	3,58	0,90	3–13	16
Hiperplazija/ displazija	9,68	1,75	0,61	7–12	8

Takođe je izvršena analiza i klasifikacija TMŽ kuja po Misdorpu i sar., iz 1999. godine. Dobijeni su sledeći rezultati:

Tabela 3. *Histopatološki tipovi tumora mlečne žlezde*

Histološki tip promene	Broj (N)	Procentat (%)
Maligni tumori	199	77,4
Prosti karcinom	128	49,8
Karcinom <i>in situ</i>	1	0,4
Kompleksni karcinom	18	7,0
Karcinom u mešovitom tumoru	46	17,9
Osteosarkom	4	1,5
Karcinosarkom	1	0,4
Fibrosarkom	1	0,4
Benigni tumori	32	12,5
Prosti adenom	5	2,0
Kompleksni adenom	4	1,6
Fibroadenom	9	3,6
Benigni mešoviti tumori	13	5,1
Papilom	1	0,4
Neklasifikovani tumori	16	6,2
Lipom	8	3,1
Hemangiopericitom	1	0,4
Osteom	1	0,4
Plazmocitom	1	0,4
Planocelularni karcinom	1	0,4
Mastocitom	1	0,4
Kutan limfom	1	0,4
Maligni melanom	1	0,4
Fibromiksom	1	0,4
Hiperplazija/ displazija	10	3,9
Hiperplazija	4	1,6
Displazija	4	1,6
Duktalna ektazija	2	0,8

Tabela 4. *Nalaz tumora mlečne žlezde kod pojedinih rasa pasa*

Rasa	Broj promena	Maligni tumori	Benigni tumori	Ostali tumori	Hiperplazija/displazija
Svi psi	257	199	32	16	10
Mešanac	81	66	8	5	2
Epanjel breton	2	2	-	-	-
Terijer	21	15	4	2	-
Nemački ovčar	11	9	1	-	1
Dalmatinac	3	2	-	-	1
Jazavičar	1	1	-	-	-
Španijel	21	17	3	1	-
Pudla	33	28	2	-	3
Ptičar	2	2	-	-	-
Z. retriver	14	11	2	-	1
Pekinezer	10	4	2	3	1
Bigl	2	2	-	-	-
Doberman	7	7	-	-	-
Šnaucer	6	5	-	1	-
Bišon	1	1	-	-	-
Poenter	1	1	-	-	-
Bulldog	2	1	1	-	-
Bolonjezer	1	1	-	-	-
Labrador	3	-	2	1	-
Bokser	2	1	1	-	-
Šarplaninac	2	1	1	-	-
Ši-cu	2	2	-	-	-
Rotvajler	3	3	-	-	-
Seter	2	1	1	-	-
Pinč	3	2	1	-	-
Čau-čau	2	1	-	1	-
Američki staford	2	1	-	1	-
Sibirski haski	1	1	-	-	-
Čivava	1	1	-	-	-
Mops	1	-	-	1	-
Ptičar	2	2	-	-	-
Maltezer	6	5	1	-	-
Nepoznato	6	3	2	-	1

Pored prikazanih podataka, naglašen je odnos karcinoma i sarkoma kod malignih tumora mlečne žlezde. Naime, broj karcinoma je bio 193 (97,0%), a broj sarkoma pet (2,5%), dok je dijagnostikovani i jedan karcinosarkom (0,5%).

Na kraju istraživanja prikazan je broj pojedinih rasa kuja sa histopatološkim tipom alteracije mlečne žlezde (tabela 4).

DISKUSIJA

Prema podacima iz svetske veterinarske literature, ukupna prevalenca neoplastičnih promena mlečne žlezde je 25% od svih dijagnostikovanih neoplazija kod pasa (Jones i sar., 1997). U našoj studiji smo primetili nešto manju prevalencu (18%) tumora mlečne žlezde pasa, najverovatnije usled manjeg broja ženki u populaciji pasa. Međutim, zbog raznovrsnosti histoloških tipova nastali su različiti koncepti vezani za klasifikaciju i histogenezu ovih neoplazmi, što je ponovo dovelo do različitih taksonomskih sistema (Martins i sar., 2002). Prema našim shvatanjima, ova tvrdnja autora je još jedan razlog zbog čega u literaturi postoje velika odstupanja u pojavljivanju i odnosu TMŽ na druge tumore kod pasa. Analizom patoloških alteracija mlečne žlezde kuja uvrstili smo i neneoplastične lezije (hiperplaziju/ displaziju) zato što se ove promene mogu smatrati preneoplastičnim (Brodey i sar., 1983). U današnjim shvatanjima i metodološkim pristupima u kancerogenezi postoje zapažanja da su

hiperplastične i displastične promene moguće početne faze neoplastičnog procesa (Rejthar, 2002). Takođe, Misdorp i sar. (1999) u svojoj klasifikaciji TMŽ koja je zasnovana na morfologiji i histogenezi, zajedno sa Goldschmidt i sar. (2011) u novoj klasifikaciji i preporučenoj gradaciji navedenih tumora, hiperplazije i displazije svrstavaju u neoplazme mlečne žlezde. Maligni tumori su se pojavljivali u većoj meri (77,4%) u odnosu na benigne (12,5%). Međutim, Sontas i sar. (2009) u svom radu izveštavaju da su se maligni pojavljivali čak u 78% slučajeva, Simonov i Stoikov (2006) u 81% slučajeva, dok prema podacima Ežerskytė i sar. (2011) i Sorenma (2003) maligni tumori su se pojavljivali u nešto manjem broju, odnosno 55% u odnosu na benigne.

U slučajevima analize histopatoloških tipova koji su klasifikovani prema Misdorpu i sar. (1999), zapaža se da su maligni mešoviti tumori mlečne žlezde bili učestaliji od kompleksnih karcinoma. Prema ranijim istraživanjima naših autora (Magaš i sar., 2006; Jelesijević i sar., 2001), ali i drugih autora (Sontas i sar., 2009; Ežerskytė i sar., 2011), odmah posle prostog karcinoma po učestalosti su bili kompleksni karcinomi. Slično tome, u našem istraživanju zapažen je povećan broj benignih mešovitih tumora u odnosu na proste adenome. Prema podacima iz literature (Sontas i sar., 2009), prosti adenomi su najfrekventnije neoplazme. U našoj studiji najpredisponiranije rase za pojavu tumora

mlečne žlezde su bili mešanci, pudle, terijeri i španijeli. Prema zapažanjima drugih autora, uočavaju se velika odstupanja u zavisnosti od studije. Tako npr. Brodey i sar. (1983) tvrde da se TMŽ najmanje pojavljuju kod mešanaca, dok Rutteman (1990) u svojim istraživanjima zaključuje suprotno, tj. da su mešanci upravo predisponirani na TMŽ. Zatloukal i sar. (2005) u svojoj studiji, koja se upravo bavi uticajima rase i starosti kao faktorima rizika u nastanku TMŽ kuja, tvrde da je najveći rizik za nastanak tumora kod hrtova, pudli i koker španijela. Alenza i sar. (2000) tvrde da ne postoje rasne predispozicije prema TMŽ. Razlika u podacima o rasnoj predispoziciji se najverovatnije javlja kao posledica zastupljenosti pojedinih rasa pasa u populaciji koja je ispitivana. Podaci iz našeg ispitivanja ukazuju na to da pudle predstavljaju jednu od najpredisponiranijih rasa za nastanak TMŽ, što je u saglasnosti sa ispitivanjima koja su sprovedi Sontas i sar. (2009) i Rutteman i sar. (1990). Prosek godina kuja sa TMŽ u našoj studiji je bio 9,53 godine sa opsegom od 1 do 17, što se razlikuje od drugih studija, gde je prosek godina pasa bio preko 10 godina (Schneider, 1969; Boldizsar i sar., 1992; Zatloukal i sar., 2005). Prema literaturnim podacima, psi kod kojih su dijagnostikovani benigni tumori mlečne žlezde oboljevali su dve godine ranije, nego psi kod kojih su dijagnostikovani maligni tumori (Moulton, 1990; Zatloukal i sar., 2005). U našoj studiji to nije bio slučaj, jer prosek godina pasa sa benignim TMŽ (9,20 godina) nije bio

upadljivo manji od pasa sa malignim TMŽ (9,67 godine). Prosek godina pasa sa hiperplazijama odnosno displazijama se nije značajno razlikovao od proseka godina pasa sa neoplastičnim promenama.

Bez obzira na veliki broj istraživanja kod nas i svetu, patologija TMŽ je još ostala veliki predmet interesovanja u veterinaskoj medicini. Naš rad predstavlja nastavak istraživanja naših autora (Magaš i sar., 2006; Jelesijević, 2001) koji su se bavili imunofenotipskim osobinama i predikcionim faktorima TMŽ. Samo kontinuiran rad može da upotpuni epizootiološku, kliničku i na kraju patološku sliku TMŽ. Upravo iz tog razloga redovno treba vršiti retrospektivne studije kako bi se analizirala zastupljenost i distribucija TMŽ kod kuja, što će praktičarima omogućiti lakše razumevanje ovog čestog problema u kliničkoj praksi.

ZAKLJUČCI

- Neoplastične promene mlečne žlezde kuja u našoj studiji bile su zastupljene u 96,10% slučajeva, za razliku od hiperplazija i displazija, koje su se pojavile u 3,90% slučajeva.
- Najčešća maligna alteracija je bila prosti karcinom, dok je benigni mešoviti tumor bio najzastupljeniji od benignih promena.
- Najzastupljenije rase sa dijagnostikovanim tumorima mlečne žlezde bile su mešanci, terijeri, pudle i španijeli.

- Prosek godina obolelih pasa je 9,53 godine i nije se značajno razlikovao u zavisnosti od tipa promene.

LITERATURA

1. Alenza D. P., Rutteman G. P., Pena L., Beynen A. C., Cuesta P. (1998): *Relation between habitual diet and canine mammary tumors in case-control study*. J Vet Int Med 12: 132–139.
2. Alenza D. P., Pena L., Del Castillo N., Nieto A. I. (2000): *Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours*. J Small Anim Pract 41: 287–291.
3. Boldizsar H., Szenci O., Muray T., Csenki J. (1992): *Studies on canine mammary tumours. I. Age, seasonal and breed distribution*. Acta Vet Hung 40: 75–87.
4. Benjamin S. A., Lee A. C., Saunders W. J. (1999): *Classification and behaviour of canine mammary epithelial neoplasm based on life-span observations in beagles*. Vet Pathol 36: 423–436.
5. Brodey R. S., Fidler I. J., Howson A. E. (1966): *The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy, and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms*. J Am Vet Med Assoc 149: 1047–1049.
6. Brodey R. S., Goldschmidt M. H., Roszel, J. R. (1983): *Canine mammary gland neoplasms*. J Am Anim Hosp Assoc 19: 61–90.
7. Dorn C. R., Taylor D. O., Schneider R., Hibbard H. H., Klauber M. R. (1968): *Survey of animal neoplasms*. In: Albeda and Contra Costa (eds.) *Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda county*. J Natl Cancer Inst 40: 307–318.
8. Ežerskyte A., Zamokas G., Grigonis A., Juodžiukyniene N. (2011): *The retrospective analysis of mammary gland in tumors*. Vet Med Zoot 75: 3–8.
9. Goldschmidt M., Pena L., Rasotto R., Zappuli V. (2011): *Classification and grading of canine mammary tumors*. Vet Path 48: 117–131.
10. Jelesijević T., Jovanović M., Knežević M., Aleksić-Kovačević S. (2003): *Quantitative and qualitative analysis of AgNOR in benign and malignant canine mammary gland tumors*. Acta vet (Beograd) 53: 353–360.
11. Jones T. C., Hunt R. D., King N. W. (1997): *Veterinary pathology*. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997, pp. 1192–1996.
12. Magaš V., Jović S., Nešić V., Bacetić V., Aleksić Kovačević S. (2007): *Morphological and immunohistochemical assays of surgically removed mammary gland tumors in bitches*. Acta vet (Beograd) 57: 37–45.
13. Martins F., Tamaso E., Guerra L. (2002): *Retrospective review and systematic study of mammary tumors in dogs and characteristics of the*

- extracellular matrix*. Braz J Vet Res Anim Sci 39: 38–42.
14. Misdorp W., Else W., Helmen E., Lipscomb T. P. (1999): *Histological classification of mammary tumours of the dog and the cat*. Armed Forces Institute of Pathology and American Registry of Pathology and the World Health Organization Second Series, Vol. 7. AFIP, Washington, DC, USA.
15. Moulton J. E. (1990): *Tumours of the mammary gland*. In: Moulton JE (ed). *Tumours in Domestic Animals*. 3rd edition. University of California Press, London, UK, pp. 518–552.
16. Priester A. (1979): *Occurrence of mammary neoplasms in bitches in relation to breed, age, tumor type, and geographical region from which reported*. J Small Anim Pract 20: 1–11.
17. Rejthar A. (2002): *Biologije vzniku a rustu nador*. In: Rejthart A., Vojtešek, B. (Ed.): *Obecna patologioe nadoroveho rustu*, Grada Publishing, Praha, pp. 15–104.
18. Rutteman R. (1990): *Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update*. In vivo 4: 33–40.
19. Schneider R., Dorn C. R., Taylor D. O. (1969): *Factor influencing canine mammary cancer developments and post surgical survival*. J Natl Cancer Inst 43: 1249–1261.
20. Simeonov R., Stoikov D. (2006): *Study on the correlation between the cytological and histological tests in the diagnostics of canine spontaneous mammary neoplasms*. Bul Jo of Vet Med 9: 211–219.
21. Sontas H., Ozyogurtcu H., Gurel A., Ekici H. (2009): *Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumours: a retrospective study*. Arch Med Vet 41: 53–59.
22. Sorenmo K. (2003): *Canine mammary gland tumors*. The veterinary clinics of North America. Small Animal Practice 33: 573–596.
23. Zatloukal J., Lorenzova J., Tichy F., Necas A., Kecova H., Kohout P. (2005): *Breed and age as risk factors for canine mammary tumours*. ActaVet Brno 74: 103–109.

УПУТСТВО АУТОРИМА ЗА ПРИПРЕМАЊЕ РУКОПИСА

„Ветеринарски журнал Републике Српске” је научно-стручни часопис који издаје Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бања Лука. Часопис је основан 2001. године од стране Друштва ветеринара Републике Српске. Излази два пута годишње. Штампана се у 300 примјерака, а доступан је и *on-line* на интернет страници Института: www.virsvb.com. Часопис објављује радове на српском језику са кратким садржајем на енглеском језику. Радови иностраних аутора се објављују на енглеском језику са кратким садржајем на српском језику.

У часопису се публикују: **оригинални и стручни научни радови, прегледни радови, кратка саопштења** и рад у форми **приказа случаја** водећих стручњака из области ветеринарске медицине и биомедицинских наука, али и других области од значаја за основну област. У „Ветеринарском журналу Републике Српске” могу се наћи рубрике у форми научно-популаризујућих текстова и информативних чланака из области ветеринарске медицине у Републици Српској и региону.

Сви рукописи приспјели на адресу часописа просљеђују се на стручну рецензију. Зависно од теме рукописа, главни и одговорни уредник бира најмање два, а по потреби и више рецензента. Рецензија је анонимна. Уколико рецензенти процијене и предло-

же корекције, уредник враћа рад са наглашеним сугестијама рецензента за преправке. Коначна рецензија може бити позитивна, негативна и условно позитивна. Дефинитивну одлуку о публикавању рукописа доноси главни и одговорни уредник са редакционим одбором.

Ваше рукописе можете слати путем електронске поште на адресу главног и одговорног уредника: drago.nedic@virsvb.com.

Молимо све уважене ауторе да своје радове пишу јасно, концизно, граматички исправно и да се придржавају следећих упутстава. Радови који не испуњавају следеће критеријуме неће бити прихваћени.

ОПШТА УПУТСТВА

Текст рукописа треба да се припреми у програму *MS Word* ћирилицом или латиницом (*Serbian Cyrillic, Serbian Latin*). Фонт треба да буде *Times New Roman*, величина фонта *12 pt* са једноструким проредом. Све маргине треба подесити на 2,54 mm, а величину странице на А4 са обостраним поравнавањем са увлачењем сваког пасуса. Текст рада не треба да буде дужи од 15 страница са прилозима.

У тексту треба избјегавати скраћенице и непотребне симболе. Треба избјегавати стране ријечи, а ако је нужно, треба их превести на српски језик. Латинске називе писати у *ишлалику*, а за називе лијекова користити генеричка имена. Апарати и уређаји се наводе под оригиналним трговачким именима и са именом произво-

ђача. Бројеве треба писати са зарезом и са максимално двије децимале. Користити мјерне јединице Међународног система јединица – SI систем. Фотографије, графиконе и табеле треба уврстити у рад, али због квалитета штампе је повољно слати их и у посебном фолдеру уз рад. Пожељно је да илустрације имају висок квалитет.

Уз рад треба доставити декларацију аутора која се може преузети са сајта часописа.

СТРУКТУРА РАДА

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

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

Насловна страна

На насловној страни написати:

- назив чланка – треба бити кратак и информативан. Пише се искључиво великим словима. Величина слова 12 (pt). У наслову не треба наводити скраћенице;
- имена аутора – написати испод наслова. Обавезно нагласити пуна

имена и презимена аутора. У суперкриптуму нагласити бројеве који означавају у фусноти институције у којима су аутори запослени;

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

Кратак садржај

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

Увод

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

Материјал и методе

Материјал и методе морају да јасно и концизно опишу оглед, материјал и животиње на којима су експерименти изведени, као и методе које су коришћене у огледу.

Резултати

Резултате треба приказати у виду текста, табела, графикона и одређених илустрација. Табеле треба да буду

јасне и прегледне, са обавезном легендом у којој је дато објашњење скраћеница и симбола. Сваки прилог треба да има наслов (изнад табела, односно испод графикана и слика), у коме треба бити јасно назначено шта прилог приказује.

Дискусија

У дискусији треба извршити компарацију сопствених резултата са резултатима страних и домаћих аутора који су обрађивали проблем и исте или сличне теме.

Закључак

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

Литература

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

У списку литературе референце треба нумерисати арапским бројевима и сложити их по азбучном (ћирилица) или абecedном (латиница) реду.

Наводе се на следећи начин:

Научни чланак:

Недић Д., Тешић М., Балтић М., Плавшић Б., Тајдић Н., Мириловић М.

(2011): *Management and control program for suppression and eradication of classical swine fever in Serbia*. Acta Vet 61: 295–307.

Књига:

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

Поглавље књиге:

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

Монографија:

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

Рад или кратак садржај из зборника радова:

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

Хвала на сарадњи!

АДРЕСА ЧАСОПИСА:

ЈУ Ветеринарски институт
Републике Српске „Др Васо
Бутозан“, Бања Лука
Бранка Радичевића 18, 78000 Бања
Лука
Телефон/ факс: +387-51-229-210
E-mail: drago.nedic@virsvb.com
Web: www.virsvb.com



9 771840 288002