

UDK 619 (05)

ISSN1840-2887Штампа-Print
ISSN 2303-4475 Online

ВЕТЕРИНАРСКИ ЖУРНАЛ РЕПУБЛИКЕ СРПСКЕ

Veterinary Journal of Republic of Srpska



Вол/Vol XVIII, бр./No 2, стр./page267-492, Бања Лука/Banja Luka, 2018



Aelurostrongylus abstrusus
(опасна мачја плућна нематода)

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. 18, број 2, стр. 267-492, Бања Лука, 2018
Veterinary Journal of Republic of Srpska, Vol. XVIII, No 2, page 267-492, Banja Luka, 2018

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:

Др Владо Теодоровић, Vlado Teodorović, PhD, (Србија-Srbija)

Др Андреј Кирбиш, Andrej Kirbiš, PhD (Словенија-Slovenia)

Др Лазо Пендовски, Lazo Pendovski, PhD, (Македонија, Macedonia)

Др Нихад Феџић, Nihad Fejzić, PhD, (БиХ, В&Н)

Др Миломир Ковач, Milomir Kovač, PhD, (Руска Федерација, Russian Federation)

Др Јанко Иванов, Yanko Ivanov, PhD (Бугарска, Bulgaria)

Др Предраг Слијепчевић, Predrag Slijepčević, PhD (Велика Британија-United Kingdom)

Др Нектариос Д. Гиадинис, Nektarios D. Giadinis (Грчка, Greece)

Др Мајкл Гилсдорф, Michael Gilsdorf, PhD (САД-United State of America)

Др Семир Лончаревић, Semir Lončarević, PhD (Норвешка-Norwegian)

Др Милан Балтић, Milan Baltić, PhD, (Србија-Srbija)

Др Неђељко Карабасил, Nedjeljko Karabasil, PhD, (Србија-Srbija)

Др Лидија Козачински, Lidija Kozačinski, PhD, (Хрватска-Croatia)

Др Жељко Сладојевић, Željko Sladojević, PhD, (БиХ, В&Н)

Др Весна Калаба, Vesna Kalaba, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)

Др Виолета Сантрач, Violeta Santrač, PhD, (БиХ-РС, В&Н-RS)

ЛЕКТОР - ЛЕКТОР: др Игор Симановић, dr. Igor Simanović

Преводац на енглески – Проф. Нивес Јаковљевић

Translator in English: Prof. Nives Jakovljević

РЕЦЕНЗИЈА: списак рецензената

Часопис се упућује на двоструку рецензију еминентним стручњацима зависно од тематике рада

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

ГОДИШЊЕ СЕ ОБЈАВЉУЈЕ 2 БРОЈА ЧАСОПИСА

Часопис је бесплатан и објављује се у електронској верзији и штампа у 300 примјерака
На основу Мишљења Министарства науке и технологије Републике Српске часопис је ослобођен пореза на промет.

Штампа: Comesgrafika, Бања Лука

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

Тел: 051/229-210, E-mail: drago.nedic@virs-vb.com, <http://virs-vb.com/veterinarski-zurnal-rs/>,
<http://doisrpska.nub.rs/index.php/VJRS>

Обим и политика часописа

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

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

Scope and Policy of the Journal

Veterinary Journal of Republic of Srpska was launched in 2001 to offer researchers and professionals in the region and worldwide a place to publish their research findings and work. The Journal is devoted to the advancement and dissemination of scientific knowledge concerning veterinary sciences and related academic disciplines. Veterinary Journal of Republic of Srpska is an open access, peer-reviewed scientific journal published by the PI VETERINARY INSTITUTE REPUBLIC OF SRPSKA „Dr. Vaso Butozan“ BANJA LUKA, Republic of Srpska/B&H, and dedicated to the publication of full research papers, reviews articles, mini review articles, short communications, technical reports, case reports and letters to the Editor. Veterinary Journal of Republic of Srpska is published in Serbian and English, in yearly volumes comprising two issues, on an Open Access model which allows high visibility of articles. Veterinary Journal of Republic of Srpska is indexed as a national journal. Each manuscript will be handled by two reviewers providing quality editorial processing. The instructions for manuscript submission, paper preparing, peer-review procedure and all other details are available on the Journal homepage. This site will guide Authors stepwise through the submission process (Author Guidelines). Veterinary Journal of Republic of Srpska is an Open Access Journal. All articles can be downloaded free of charge and used in accordance with the Creative Commons Attribution 4.0 International License(CC BY 4.0).

САДРЖАЈ / CONTENTS

1. **Aristomenis Katsiolis, Olga Thanou, Myrsini Tzani, Chrysoula Dile, Marilina Korou, Athanasia Stournara, Evanthia Petridou, Nektarios D. Giadinis**
ИСТРАЖИВАЊЕ ПОТРЕБНИХ ЉУДСКИХ РЕСУРСА
ЗА ЕФИКАСНО И УЧИНКОВИТО СПРОВОЂЕЊЕ
ПРОГРАМА КОНТРОЛЕ И ИСКОРЈЕЊИВАЊА
БРУЦЕЛОЗЕ ОВАЦА И КОЗА У ГРЧКОЈ 270
- Aristomenis Katsiolis, Olga Thanou, Myrsini Tzani, Chrysoula Dile, Marilina Korou, Athanasia Stournara, Evanthia Petridou, Nektarios D. Giadinis**
INVESTIGATION OF THE HUMAN RESOURCES
NEEDS FOR THE EFFECTIVE AND EFFICIENT I
MPLEMENTATION OF THE SHEEP AND GOAT
BRUCellosis PROGRAM IN GREECE283
2. **Snježana Mandić, Danica Savanović, Ana Velemir, Vladimir Marjanović**
EFIKASNOST HACCP SISTEMA U KONTROLI
MIKROBIOLOŠKIH OPASNOSTI U PROIZVODNJI
DIMLJENE PASTRMKE (*Oncorhynchus Mykiss*)297
- Snježana Mandić, Danica Savanović, Ana Velemir, Vladimir Marjanović**
EFFECTIVENESS OF HACCP SYSTEM IN CONTROL OF MICROBIOLOGICAL
HAZARDS
IN THE PRODUCTION OF SMOKED TROUT (*Oncorhynchus Mykiss*)312
3. **Selma Pilić, Nadžida Mlaćo, Amela Katica, Velija Katica, Indira Mujezinović, Jasmin Katica**
HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE OVARIJA
KALIFORNIJSKE PASTRMKE *ONCORHYNCHUS*
MYKISS (WALBAUM, 1792) UZGAJANE U
RAZLIČITIM MIKROAMBIJENTALNIM UVJETIMA326
- Selma Pilić, Nadžida Mlaćo, Amela Katica, Velija Katica, Indira Mujezinović, Jasmin Katica**
HISTOLOGICAL CHARACTERISTIC FEATURES
OF THE RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS*
MYKISS OVARIES (WALBAUM, 1792) GROWN
IN VARIOUS MICROAMBIENT CONDITIONS334
4. **Željko Cvetnić, Maja Zdelar Tuk, Sanja Duvnjak, Irena Reil, Marina Mikulić, Željko Pavlinec, Marija Cvetnić, Silvio Špičić**
TUBERKULOZNE I NETUBERKULOZNE
MIKOBakterije U INFEKCIJI LJUDI I ŽIVOTINJA342
- Željko Cvetnić, Maja Zdelar Tuk, Sanja Duvnjak, Irena Reil, Marina Mikulić, Željko Pavlinec, Marija Cvetnić, Silvio Špičić**
TUBERCULOUS AND NONTUBERCULOUS
MYCOBACTERIA IN HUMAN AND ANIMAL INFECTION356
5. **Ivana Vučićević, Darko Marinković, Vladimir Kukolj, Slađan Nešić, Milan Aničić, Sanja Aleksić-Kovačević**
HISTOLOŠKI I IMUNOHISTOHEMIJSKI PARAMETRI
BITNI ZA KLASIFIKACIJU MASTOCITOMA PASA370
- Ivana Vučićević, Darko Marinković, Vladimir Kukolj, Slađan Nešić, Milan Aničić, Sanja Aleksić-Kovačević**
IMPORTANT HISTOLOGICAL AND
IMMUNOCHEMICAL PARAMETERS
FOR CLASSIFICATION OF CANINE MAST CELL TUMORS381

6. Lejla Velić, Toni Eterović, Silvijo Špičić, Željko Cvetnić, Amina Hrković Porobija, Benjamin Čengić, Selma Filipović, Tarik Bajrović ZNAČAJ UPOTREBE ALERGIJSKOG KOŽNOG TESTA NA BRUCELIN U DIJAGNOSTICI BRUCELOZE GOVEDA	392
Lejla Velić, Toni Eterović, Silvijo Špičić, Željko Cvetnić, Amina Hrković Porobija, Benjamin Čengić, Selma Filipović, Tarik Bajrović THE IMPORTANCE OF BRUCELLIN ALGERIC SKIN TEST FOR DIAGNOSIS OF BOVINE BRUCELLOSIS	400
7. Миљан Добријевић, Оливер Стевановић, Дејан Вујанић ANTE MORTEM ДИЈАГНОСТИКА AELUROSTRONGYLUS ABSTRUSUS (RAILLIET, 1898) КОД ДОМАЋЕ МАЧКЕ У РЕПУБЛИЦИ СРПСКОЈ (БИХ)	408
Miljan Dobrijević, Oliver Stevanović, Dejan Vujanić ANTE MORTEM ДИЈАГНОСТИКА AELUROSTRONGYLUS ABSTRUSUS (RAILLIET, 1898) КОД ДОМАЋЕ МАЧКЕ У РЕПУБЛИЦИ СРПСКОЈ (БИХ)	417
8. Ивана Давидов, Миодраг Радиновић, Зорана Ковачевић, Михајло Ердeљан, Аннамарија Галфи, Саша Илић ПОЈАВА ТРИХОФИТОЗЕ КОД ТОВНЕ ЈУНАДИ	428
Ivana Davidov, Miodrag Radinović, Zorana Kovačević, Mihajlo Erdeljan, Annamaria Galfi, Saša Ilić TRICHOPHYTOSIS IN BEEF CATTLE	437
9. Amina Hrković-Porobija, Aida Hodžić, Mensur Vegara, Lejla Velić, Aida Kavazović, Almira Softić, Tarik Mutevelić, Ermin Šaljić MASNO-KISELINSKI SASTAV LIVANJSKOG SIRA	446
Amina Hrković-Porobija, Aida Hodžić, Mensur Vegara, Lejla Velić, Aida Kavazović, Almira Softić, Tarik Mutevelić, Ermin Šaljić FATTY ACID COMPOSITION OF LIVNO CHEESE	454
10. Jovan Bojkovski, Branislav Stanković, Jasna Prodanov-Radulović, Milan Maletić, Slobodanka Vakanjac, Nemanja Zdravković PROCENA BIOSIGURNOSNIH MERA NA KOMERCIJALNIM FARMAMA SVINJA	463
Jovan Bojkovski, Branislav Stanković, Jasna Prodanov-Radulović, Milan Maletić, Slobodanka Vakanjac, Nemanja Zdravković ASSESSMENT OF BIOSECURITY MEASURES ON COMMERCIAL PIG FARMS	475
УПУТСТВО АУТОРИМА ЗА ПРИПРЕМАЊЕ РУКОПИСА INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	487

DOI 10.7251/VETJ1802270K

UDK 619:616.981.42-07:636.32/.38(495)

Оригинални научни рад

ИСТРАЖИВАЊЕ ПОТРЕБНИХ ЉУДСКИХ РЕСУРСА ЗА ЕФИКАСНО И УЧИНКОВИТО СПРОВОЂЕЊЕ ПРОГРАМА КОНТРОЛЕ И ИСКОРЈЕЊИВАЊА БРУЦЕЛОЗЕ ОВАЦА И КОЗА У ГРЧКОЈ

Aristomenis KATSIOLIS^{1*}, Olga THANOU¹, Myrsini TZANI¹, Chrysoula DILE¹, Marilina KOROU¹, Athanasia STOURNARA², Evanthia PETRIDOU³, Nektarios D. GIADINIS^{4*}

¹ Одјељење за зоонозе, Управа за здравље животиња, Министарство за рурални развој и храну, Атина, Грчка

² Одјељење за ветеринарске лабораторије. Национална референтна лабораторија за бруцелозу, Лариса, Грчка

³ Лабораторија за микробиологију и инфективне болести, Аристотел Универзитет Солун, Грчка

⁴ Клиника за фармске животиње, Факултет ветеринарске медицине, Аристотел Универзитет Солун, Грчка

* **Коресподентни аутор:** 1. Aristomenis Katsiolis, akatsiolis@minagric.gr 2. Nektarios D. Giadinis, ngiadini@vet.auth.gr

Кратак садржај: Програм контроле бруцелозе оваца и коза је један од најважнијих програма из здравља животиња са значајним посљедицама на пољу животињског здравља, јавног здравља и међународне трговине. У имплементацију овог програма укључено је неколико фактора, а његов успјех зависи од доступности ефикасног, добро обученог и потпуно ангажованог особља. Узимајући у обзир лоше резултате програма контроле бруцелозе оваца и коза у Грчкој, углавном због ограниченог броја ветеринара у регионалним ветеринарским службама, ова студија има за циљ да приступи броју људских ресурса, тачније ветеринара који су неопходни за ефикасну и успјешну стратегију контроле бруцелозе у Грчкој. Због тога се анализирају подаци добијени имплементацијом програма у периоду 2012–2015. година. Такође, размотрени су сви релевантни проблеми и економске и финансијске околности-спољни фактори који утичу на ефикасност програма. Налази из ове студије указују на то да би око 485 ветеринара са 485 асистената помогло у потпуној имплементацији контроле бруцелозе и искорјењивању болести грчких оваца и коза.

Кључне речи: Бруцелоза, Грчка, програм бруцелозе, особље

УВОД

Пренос бруцелозе на људе је од зонотског значаја и односи се на директан контакт са инфицираним ткивима или излучевинама заражених животиња или на конзумацију непастеризованог млијека или њихових производа (Атлури ВЛ, 2011). Бруцелоза је ендемична у земљама око медитеранског басена (Едгардо Морено 2014), док Грчка има највишу стопу случајева међу европским земљама (Европски центар за превенцију и контролу болести, 2015). Бруцела мелитенсис је повезана са великим бројем случајева обољења људи. (М.Ј. Корбел 2006).

У Грчкој имплементација програма контроле бруцелозе оваца и коза (О и К) започета је 1977. године, регулисана законом (Предсједнички декрет 332. 1977.) и резултовала је значајним смањењем клиничких случајева код животиња и људи. Првобитно је спроведена подкожна вакцинација младих оваца и коза (од 3-6 месеци старости). Током периода од 1992. до 1998. године, централни надлежни орган (ЦНО), Дирекција за здравље животиња Министарства за рурални развој и храну, одлучио је да редизајнира национални програм сузбијања бруцелозе код животиња постепено укидајући вакцинисање у неким подручјима и покрећући програм искорјењивања бруцелозе заснован на серолошким тестовима животиња и издавању и убијању заражених оваца и коза. У почетку овај нови приступ примјењен је на острвима (1992. године), затим на Пелопонезу

(1993), а потом је читава земља (1994.) укључена у програм ерадикације.

Ова промјена резултовала је драматичним повећањем случајева бруцелозе код људи и животиња, углавном због непотпуне и оскудне примјене програма искорјењивања. То се може објаснити на следећи начин-радни сати потребни за око 15.000.000 узорака крви били су вишеструки у односу на вакцинацију само замјенских животиња, што је износило скоро 3.000.000 (15-20% укупне популације). Постојеће особље није могло одговорити на повећане захтјева програма. Да би се овај проблем ријешио, масовно вакцинисање женки, младих и одраслих оваца и коза наново је спроведено на копну и на острву Евиа, док је на острвима, гдје је распрострањеност бруцелозе била мања, настављен програм ерадикације (1999). Стратегија вакцинације вратила се на острва Лесвос и Лерос 2003. године и на Тасос 2008. године због пријављених случајева обољења људи на овим острвима.

До 2012. године вакцинације за овце и козе нису биљежене за сваку појединачну животињу, већ као збир животиња на имању. Вакцинисане животиње нису биљежене у било каквој бази података и могле су се препознати само појединачно по тетоважи на десном уву, уколико су биле означене. Одлуком министарства 4888/130873 / 31.12.2012 (ГГ ИИ / 3545) (Едгардо Морено 2014) тетовирање је било укинато (јер је било болно за животиње, опасно

за особе које су га изводиле, узимало превише времена итд.). Умјесто тога, уведена је индивидуална регистрација вакцинисаних животиња на табеларном листу по обиљежју (ушне маркице или болус, појединачни идентификациони број животиње (ИД)).

Идентификациони бројеви животиња морају бити уписани у Централну базу података (ЦБП) од стране овлашћеног особља, али то није било строго примјењено. Нажалост, због чињенице да све вакцинисане животиње у земљи нису регистроване под идентификационим бројем (прије 2012. године), изузетно је тешко за централни надлежни орган (ЦНО), који је надлежан за процјену ефективности програма на централном нивоу, да дође до тачних резултата (број живих вакцинисаних животиња у поређењу са укуп-

ном популацијом животиња), стога се ЦНО ослања на процјене броја вакцинисаних животиња од стране регионалних ветеринара који су одговорни за имплементацију програма на локалном нивоу и вођење евиденције.

У периоду између 2012. и 2015. године, програм бруцелозе у Грчкој дјели земљу у две зоне: 1) зону вакцинације (ZV), у којој су овце и козе вакцинисане једном у животу (старије од 3 мјесеца) док се мужјацима рутински узимају узорци крви за даље серолошко тестирање сваких 6-12 месеци (старијим од 6 месеци) и 2) Зону искорјењивања (ЗИ), у којој се узимање узорака крви (сваких 6-12 месеци) и клање примјењује на свим зараженим животињама (старијим од 6 мјесеци) (Министарска одлука, 2012)

Табела 1. Зона вакцинације (зв). Подаци се односе на 31. децембар сваке године

Година	Активне фарме (број)	Овце и козе (број)	Вакцинисане животиње (број)	Невакцинисане животиње (број)	Покривеност вакцинацијом (%)
2012.	103.569	11.871.587	7.683.545	4.188.042	64,72
2013.	90.719	11.642.501	8.696.434	2.946.067	74,69
2014.	87.937	11.562.550	8.525.347	3.037.203	73,73
2015.	54.817	9.106.569	7.181.215	1.925.354	78,85

У зони искорјењивања, газдинства се класификују у четири категорије према здравственом стању “М+” за позитивна газдинства, “М1” за газдинства непознатог статуса “М2” за газдинства са негативним резултатима, “М4s” за службено слободна газдинства (неактивно) и “М4” за службено

слободна газдинства. Прецизније, у случају да је газдинству додјељен статус “М1” (односно непознато стање о присутности бруцелозе), потребно је у наредних 6 до 12 мјесеци имати негативне резултате у погледу присуства бруцелозе. Ако су резултати првог узимања узорака крви негативни

фарма стиче право преласка на статус “M2”. Уколико су резултати негативни и након другог тестирања узорака крви газдинство стиче статус “M4”. (службено слободно од бруцелозе)

У зони вакцинације фарме су класификоване као 1) “вакцинисане”, 2) “невакцинисане” и 3) “фарма са позитивним животињама”. Вакцина садржи живе Бруцела мелитенсис бактерије; сој РЕВ-1, које су патогене за људе (брошура о вакцинама, 2004). Стога, процес вакцинације треба извести на мјесту заштићеном од вјетра и прашине. Сва лица укључена у процес вакцинације (ветеринар, помоћник и власник фарме) дужни су да се придржавају адекватних мјера биосигурности. Поред тога, не би требало да стоје у правцу супротном од вјетра. Нико други не би требао бити присутан на мјесту гдје се изводи вакцинација због повећаног ризика инфекције ваздухом или додиром капљица вакцине с ткивом слузокоже. Трудне жене морају бити ван фарме и исту не посјећивати у наредних неколико дана. Вакцинацију изводи службени ветеринар. Од 2013. године, Одјељење за ветерину Дирекције за руралну економију и ветерину сваке регионалне јединице, одобрило је приватним ветеринарима учешће у реализацији програма (Приручник за инструкције, 2016).

2010. године у Грчкој су се појавиле додатне потешкоће у спровођењу програма повезане са социоекономском ситуацијом. Најзначајнији проблем

је било смањење трошкова у јавном сектору, што је довело до замрзавања плата јавних службеника и смањења њихових додатних бонуса, прековременог рада и путних трошкова (Пипини М, 2014). Поред тога државна подршка за кретање геотехничара је према члану 9 Закона 3833/201012, ограничена на шездесет (60) дана са сто двадесет (120) дозвољених одредбом претходног Закона конкретније чланом 2 Закона 2685/1999 (Закон 2685/1999). Прекорачење ограничења од 60 дана (до 80 дана) дозвољено је само за рјешавање насталих догађаја који подржавају посебне потребе сервиса (хттпс 2016а). Поред наведеног, следећи фактори су негативно утицали на имплементацију програма: а) ограничење надокнаде километарских удаљености [члан 9 Закона бр. 2685/1999, тј. за удаљеност од 20-40 км, накнада износи једну трећину ($\frac{1}{3}$) од 10.000 ГРД-а¹, б) два Закона о осигурању (Закон 3863 и Закон 3865 из 2010) који су фаворизовали масовно пензионисање углавном жена ветеринара (хттпс 2016б), и ц) одредба члана 11 Закона 3833 од 201012 “једно регрутовање на пет пензионисања”. Програм контроле бруцелозе има за циљ заштиту здравља животиња и заштиту јавног здравља. До сада предвиђени циљеви нису остварени. Сврха ове студије је испитивање минималног могућег особља (у облику групе од два члана) ради ефикасне и учинковите примјене програма.

¹ ГРД-Грчка драхма до 2001. године

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

За ову студију кориштен је упитник затвореног типа, који је послат од стране Одјељење за зоонозе (ОЗ) Дирекције за здравље животиња (ДЗЖ) Министарства за рурални развој и храну (МРРХ) свим ветеринарским одјељењима (ВО) Грчке у периоду од 2012. до 2015. године. Упитник је послат на крају сваког семестра (30. јуна) и на крају сваке године (31. децембра), тако да су званични ветеринари који су га попуњавали били упознати са његовим изгледом и садржајем. Упитник је имао два дијела ; први се односио на зону вакцинације и укључивао је 42 питања, а други на зону искорјењивања и имао је 29 питања. Дио из зоне вакцинације имао је 6 подсекција: Привреда и становништво; Вакцинација са РЕВ-1, узимање крви, епизоотиологија и епидемиологија, људски ресурси и циљеви.

Од укупно 42 питања која се тичу Регионалних јединица зоне вакцинације (ЗВ), кориштена су поља 41 и 42 из подсекције Циљеви, тј. “Група може за један дан вакцинирати просјечан број (41) ... женки или сакупити (42) ... узорка крви ». Што се тиче зоне искорјењивања (ЗИ), од укупно 29 питања кориштено је поље 27, тј. “Група може сакупити просјечан број (27) ... узорака крви у једном дану”. Тиме је постало могуће израчунати приближни капацитет групе (једног ветеринара и једног помоћника) за сваку регионалну јединицу, на основу посебних околности и искустава

ветеринара који су примјењивали програм дуги низ година.

Сљедећи фактор који је требало оцијенити јесте број дана који службени ветеринари по закону има право радити ван своје канцеларије. Ово је познато као “рад на терену” који има сваки запослени у јавном сектору и за који прима надокнаду. У Грчкој од 2010. године, максимални број “дана на терену” предвиђен законом (Закон 3833, 2010) износи “60”. Ако се број вакцинација или крвних узорака помножи са “60”, резултат одражава укупан број животиња које је могуће вакцинирати или узорковати крв у одређеној регионалној јединици током године дана. Још један важан елемент који је процјењиван у зони вакцинације је резултат поља 14 подсекције Вакцинација са РЕВ-1: “Од укупне популације животиња у нашој регионалној јединици, (13)% оваца и коза је вакцинирано и још увијек постоји (14) ... невакцинисаних животиња”. У зони вакцинације фундаменталан параметар је број невакцинисаних женки. Нажалост, од укупно 60 регионалних јединица, неколико их није доставило податке. Конкретније, 2013. године једна и 2015. године две регионалне јединице. 2012 и 2014 године сви су одговорили на упитник.

Број запослених који су радили у програму произашао је из подсекције Људских ресурса из упитника. Прецизније за зону вакцинације

кориштена поља су била: “У Дирекцији за руралну економију и ветерину на нашој периферији (региону) тренутно ради (31) ... ветеринар (сталних и са уговором на неодређено), (32) ... остали запослени (административно особље, радници итд.), (33) ... ветеринари (сезонски) и (34) ... остали запослени (сезонски). За зону искорјењивања поља која се односе на људске ресурсе су иста само другачије нумерисана.

Због погодности и због тога што је израчунавање другог и трећег услова сложено и мање важно у односу на први, ова студија је била усредсређена

на израчунавање потребних група заснованих само на броју невакцинисаних женских животиња. У скоро свим регионалним јединицама, подаци о покривености вакцинама, као и броју преосталих невакцинисаних животиња, добијени су из искуства ветеринара, локалних архива и најближег могућег статистичког приступа. Тачност података посланих од званичних ветеринара свих ветеринарских одјељења није провјеравана већ су прихваћени како су примљени.

РЕЗУЛТАТИ

Након тога, резултати произашли из одговора које је централни надлежни орган добио на годишњем нивоу су детаљно приказани и даље разматрани. (Документ 2012, Документ 2013, Документ 014, Документ 2015). У периоду од 2012. до 2013. године број активних газдинстава (који имају живе животиње) и оваца и коза одређен је приближном процјеном коју су урадили ветеринари на фармама које су узгајале животиње у њиховој регионалној јединици, или су добијене директно из Централне базе података (ЦБП). За 2014. и 2015. годину утврђивање ових бројева засновано је на регистрацији коју су фармери направили у централној бази података за претходну годину. Број активних газдинстава и број оваца и коза од 2014. године па надаље сматра се прецизнијим.

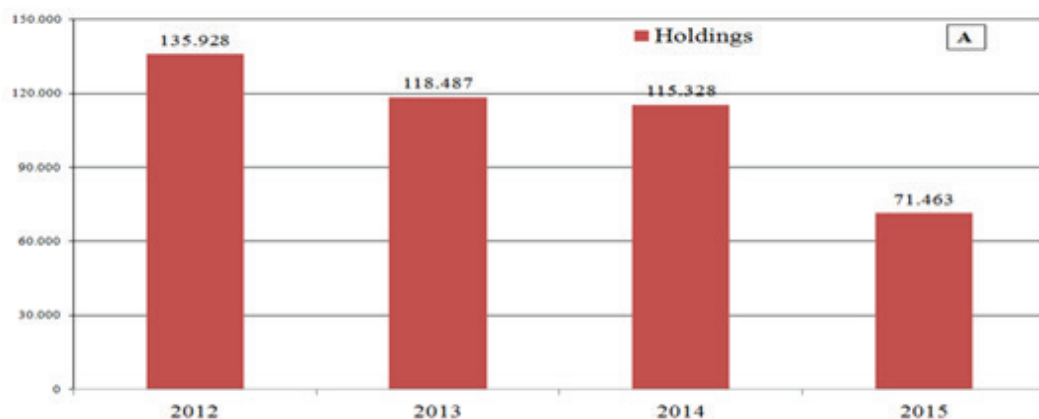
Као што је приказано у табели 1, у зони вакцинације је број активних газ-

динстава у 2012. био 103.569 и претрпио је значајно смањење у 2015. години. када их је било 54.817. До овог смањења је углавном дошло због масовног брисања неактивних газдинстава из централне базе података. Из истог разлога опао је и број живих оваца и коза у односу на 2012. годину. Мужјаци су укључени у општу популацију животиња и износили су 5-10% укупне популације. Број вакцинисаних животиња добијен је индиректно од одбитка невакцинисаних животиња од укупне популације животиња укључених у схему вакцинације. Број невакцинисаних животиња добијен је комплетирањем 14. питања у упитнику.

Покривеност вакцинацијом израчуната је на основу процента вакцинисаних оваца и коза у укупној популацији оваца и коза, како је наведено у упитницима. При израчунавању покривености вакцинацијом мужјаци (5-10%)

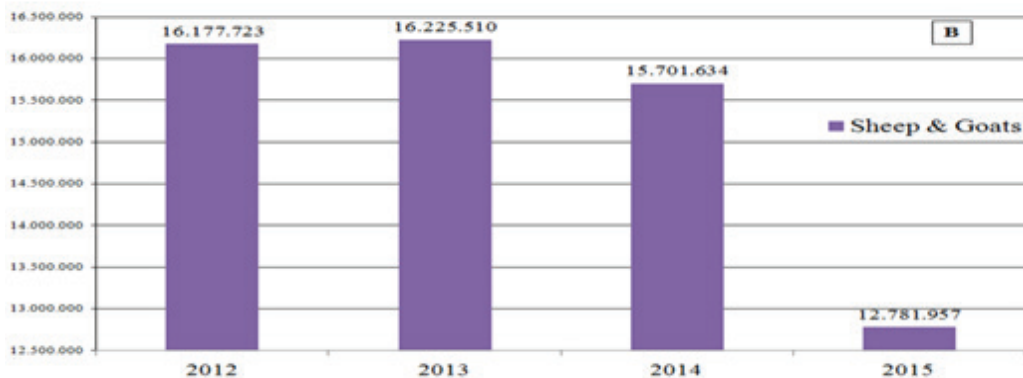
нису узети у обзир. За 2013. годину стопа смањења активних фарми у цијелој земљи износила је 12,83%, за 2014. годину износила је 2,67%, а за 2015. годину 38,03%. Стога смањење учешћа

фарми узетих у обзир за програм износило је 47,43% у периоду 2012–2015. Стопа смањења броја оваца и коза износила је 3,23% у 2014. години, а за 2015. годину 18,59%.



*холдингс-газдинства

Слика 1. Приказ броја газдинстава оваца и коза у цијелој земљи



Слика 2. Приказ броја оваца и коза у цијелој земљи по годинама

Тачна регистрација популације оваца и коза је кључни параметар за одређивање неопходних људских ресурса за спровођење програма. Пошто су М2 и М4 газдинства у зони искорјењивања

“незнатна” у поређењу са укупним бројем, дошло је до индикативног израчунавања најмање једног сакупљања узорка крви од укупног броја оваца и коза у зони ерадикације. Ос-

новни и главни параметар који је неопходан је стварни број животиња старијих од 6 месеци у регионалној једи-

ници јер су узорци крви узети од свих животиња старијих од 6 мјесеци (Табела 2).

Табела 2. Зона искорјењивања (ЗИ). Подаци се односе на 31. децембар сваке године

Година		2012.	2013.	2014.	2015.
Газдинство и животиње у програму	Газдинства	28.155	27.827	28.543	16.646
	Овце и козе	4.306.136	4.583.015	4.138.404	3.675.388
Непознат статус (M1)	Газдинства	19.231	26.689	24.332	14.862
	Овце и козе	3.603.942	4.376.260	3.550.050	3.257.763
Позитивно газдинство (M+)	Газдинства	44	37	30	33
	Овце и козе	16.887	16.523	12.779	12.004
Газдинство са негативним резултатима (M2)	Газдинства	1.968	565	2.647	1.350
	Овце и козе	181.065	96.361	498.160	317.253
(неактивно) Службено слободна газдинства (M4s)	Газдинства	6.692	134	2	72
	Овце и козе	460.016	19.118	110	18.398
Службено слободна газдинства (M4)	Газдинства	220	402	380	329
	Овце и козе	44.226	74.753	83.605	69.970

За бржу и сигурнију примјену вакцинасања или узорковања крви потребне су најмање двије особе (“група”) и власник животиња или неко ко је задужен за њихово хватање и држање током вакцинације / узорковања. “Група” се састоји од службеног ветеринара који припрема вакцину и убризгава је у десно око животиње или узима узорак крви и његовог помоћника који биљежи вакцинисане / узорковане жи-

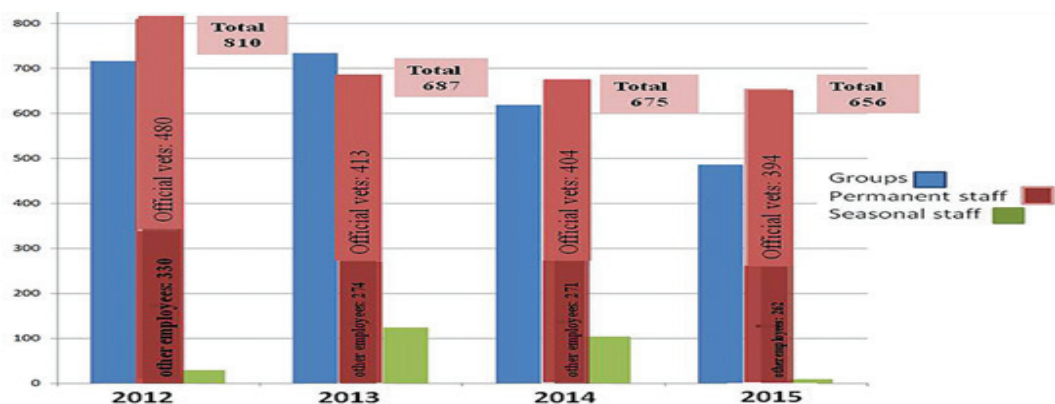
вотиње у каталог и генерално помаже ветеринару. Смањење броја регистрованих газдинстава, броја оваца и коза након 2013. године, као и популације животиња које треба да буду вакцинисане или серолошки тестиране, резултирало је постепеним смањењем укупног броја потребних група (Табела 3).

Табела 3. Сажета табела са подацима о популацији животиња, стада и људским ресурсима за период 2012-2015, у цијелој земљи

Година	2012	2013	2014	2015
Газдинства регистрована у централну базу	135.928	118.487	115.328	71.463
Број оваца и коза	16.177.723	16.225.510	15.701.634	12.781.957
Број животиња за вакцинисање или узорковање	8.089.886	7.837.837	7.305.702	5.743.742
Укупан број потребних група	716	734	618	485
Стално особље (ветеринари+други запосленици)	810 (480+330)	687 (413+274)	675 (404+271)	656 (394+262)
Сезонско особље (ветеринари+други запосленици)	29 (5+24)	123 (59+64)	103 (50+53)	9 (7+2)

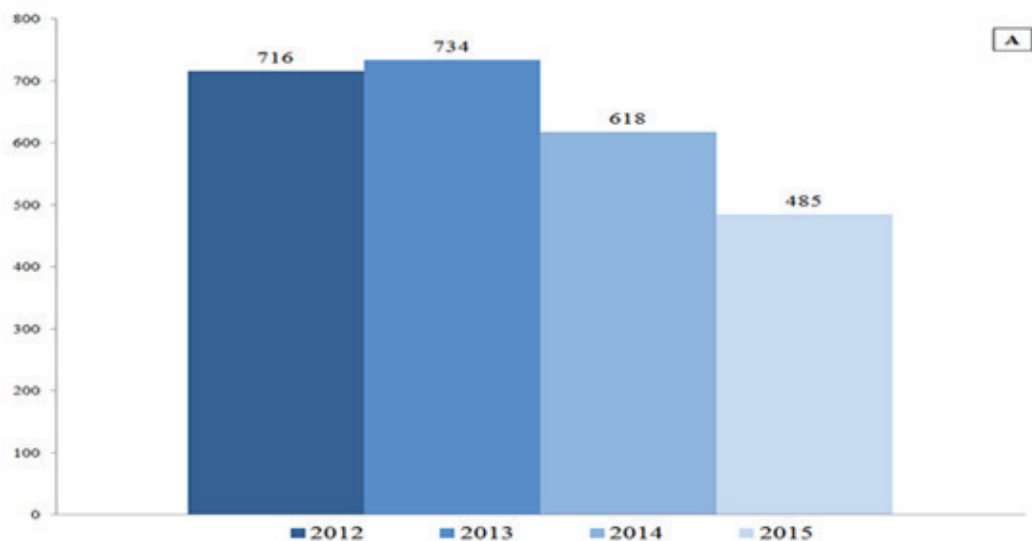
Јасно је илустровано смањење сталног особља (ветеринари и други технички / административни службеници) који раде на имплементацији програма за 2012-2015. годину. За 2013. годину смањење је износило (15,18%) 10,78%, за 2014. годину 1,75%, а за

2015. годину 2,97%. То је довело до укупног смањења сталног особља за године 2012-2015 (19,35%) од 14,95%. Док је за број сезонских запосленика регрутованих у овом периоду, очигледно да варира.

**Слика 3. Приказ аналогije броја стално запослених, група и сезонски запослених у периоду 2012-2015.**

Katsiolis и сар.:

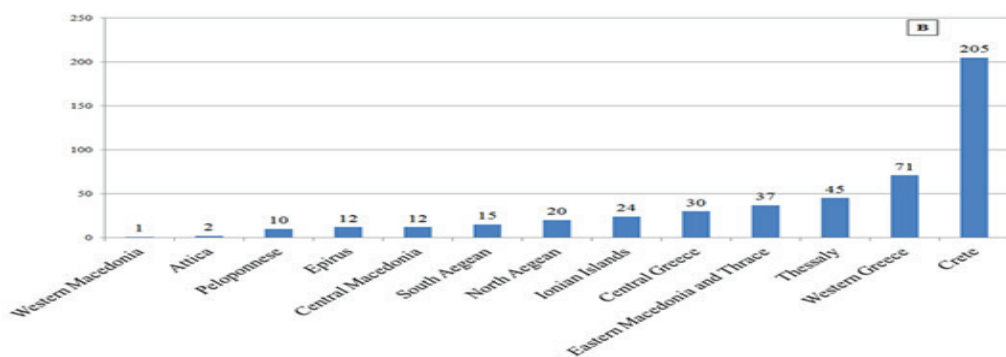
Истраживање потребних људских ресурса за ефикасно и учинковито спровођење програма контроле и искорјењивања бруцелозе оваца и коза у Грчкој



Слика. 4. Број потребних група за ефикасно спровођење програма по годинама

Број потребних група за ефикасно спровођење програма израчунат је на слиједећи начин: 716 за 2012. годину, 734 за 2013. годину, 618 за 2014. годину и 485 за 2015. годину. Као што се видјело из упитника, свака периферија има различите потребе за група-

ма. Највећи број група потребан је на периферијама Крита (ПЦ: 205 група) и на периферији западне Грчке (ПВГ: 71 група). Конкретније, регионална јединица Ретимно треба 121 групу, а регионална јединица Етолиа-Ацарнаниа потражује 44 групе.



Слика 5. Приказ броја потребних група за сваку периферију у 2015. години

ДИСКУСИЈА

Ово је први пут да научни рад на холистички начин процјењује информације које се односе на укупан број живих животиња вакцинисаних са РЕВ-1. Поред тога, ажурирани су подаци о серолошки тестираним овцама и козама у Грчкој за период 2012–2015. Главни циљ ове студије био је утврдити минималне захтјеве у људским ресурсима који се годишње сматрају потребним за ефикасно спровођење програма контроле овчје и козје бруцелозе, вредновањем података добијених од стране надлежних ветеринарских органа који су спроводили овај програм током горе наведеног периода. Оцјењујући главне резултате ове студије, очигледно је да програм за контролу и ерадикацију бруцелозе оваца и коза у Грчкој није било могуће успјешно примијенити за године 2012–2015. Напор централног надлежног органа да рационализује број газдинстава и животиња резултовао је бољом процјеном реалности, због смањења броја оваца и коза. Стога је дошло до смањења броја група. Заправо, неопходан број група које је требало да буду укључене у потребе програма током 2015. године је 485 и прилично премашује број ветеринара који су тренутно регистровани у званичној бази Министарства за рурални развој и храну, што је 460 (хттп 2016). Узимајући у обзир тренутне економске услове у земљи, запошљавање $485 \times 2 = 970$ јавних службеника искључиво за потребе програма бруцелозе не може се сматрати реалним сценаријем, иако

су политичари од стране ЦНО посебно информисани у претходним годинама о потребама кадрована регионалних ветеринарских служби. Међутим, анализом главних закључака ове студије, може се тврдити да барем дјелимично минимални захтеви особља за ефикасно спровођење програма бруцелозе код оваца и коза у Грчкој могу бити задовољени укључивањем приватних ветеринара.

Ипак, чак и у случају да приватни ветеринари (или фармски ветеринари) могу у потпуности да одговоре на потребе програма, треба даље испитати да ли стално ветеринарско особље у регионалним јединицама има капацитет да надгледа спровођење програма и изврши одговарајуће провјере узорака.

Временски период 2012–2015. године сматра се једним од “најтежих” периода у погледу пријевремених пензионисања искусних ветеринара и других стручњака у јавном сектору. Стога је смањен број запослених у сталном радном односу, а са друге стране уведене нове административне процедуре у вези са новим званичним документима (нпр. Унос података, потврда о вакцинацији, сертификат серолошког тестирања), довеле су до повећања потребних административних процедура за рјешавање потреба програма. Поред тога, дошло је до ограничења дозвољених кретања и накнада, као и значајног смањења плата сталног и квалификованог особља. Оваква ситуација нега-

тивно је утицала на имплементацију програма.

Параметар који би могао утицати на валидност извучених података приказаних у овој студији јесте чињеница да се анализа заснива на процјенама и апроксимацијама од стране службених ветеринара у регионалним јединицама.

Међутим, ова студија пружа јасне доказе о обиму проблема који се односи на неефикасну примјену грчког програма контроле бруцелозе код оваца и коза и важност усвајања корективних мјера у циљу рјешавања поменутих проблема.

ЗАКЉУЧЦИ

Фискална ситуација у Грчкој у периоду од 2012. до 2015. године негативно је утицала на имплементацију програма бруцелозе оваца и коза. За ефикасно и учинковито спровођење програма, регрутовање сталног и сезонског особља у ветеринарским службама је од изузетне важности. Поред тога, потребно је и повећање прага “дана на терену” за званичне регионалне ветеринаре како би се вратила ситуација на

претходни ниво од 180 “дана”, јер се програм бруцелозе у потпуности имплементира на терену. Надаље, јавни ветеринарски сектор на централном и регионалном нивоу би требало да на ефикаснији начин искористи већ регистроване ветеринаре како би попунили јаз у људским ресурсима. Наведене корективне мјере морају се обавити на основу капацитета стоке на различитим периферијама.

Захвале: Аутори су захвални проф. др Јовану Бојковском за помоћ у рукопису

ЛИТЕРАТУРА

1. Atluri VL, Xavier MN, de Jong MF, den Hartigh AB, Tsolis RM. (2011): Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu Rev Microbiol.* 65:523-41.
2. Edgardo Moreno. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis (2014). *Front Microbiol.*, Published online.
3. European Centre for Disease Prevention and Control (2015): *EFSA Journal* 13 (1):3991
4. M.J. Corbel. *Brucellosis in humans and animals* (2006). Publishers WHO/CDS/EPR, ISBN 92 4 154713 8.
5. Presidential Decree 332 (GG I/107 of 16.04.1977) «*On preventing and combating tuberculosis and bovine brucellosis and sheep & goats brucellosis*».

6. Ministerial Decision 4888/130873 (GG II/3545 of 31.12.2012) on the program for the control and eradication S&G brucellosis program.
7. Ministerial Decision 4888/130873 (GG II/3545 of 31.12.2012) on the program for the control and eradication S&G brucellosis program.
8. Instructions Manual for the Application of the Control and Eradication Brucellosis Program of Sheep & Goats. Department of Zoonoses of the Directorate of Animal Health of the Ministry of Rural Development and Food. Athens, (2013). 4th Edition. <http://minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/animal-production/sheep-and-goats/823-astheneiesaignoprobaton> [accessed 28 November 2016].
9. Pipini M (2014): The impact of the economic crisis and recession in the Greek economy (2008-2013), proposals for exiting the crisis. Bachelor Thesis. page 25, paragraph 1. [Retrieved from goo.gl/9bk8b4 at 23 August 2016].
10. Law 2685/1999 (GG I/35 of 18.02.1999) on the coverage of the expenses of moving employees within and outside the Territory and other provisions.
11. <https://docman.gr/download.html?document=7995> [accessed 18 August 2016].
12. <https://www.taxheaven.gr/news/news/view/id/25754> [accessed 12 August 2016].
13. Law 3833/2010 (GG I/40 of 15.03.2010) on the protection of the national economy – emergency measures to address the financial crisis.
14. The document under the reference number 4780/127774/17-12-2012 from the Department of Zoonoses of the Directorate of Animal Health of the Ministry of Rural Development and Food towards the Veterinary Departments of the Regional Units.
15. The document under the reference number 4902/157052/17-12-2013 from the Department of Zoonoses of the Directorate of Animal Health of the Ministry of Rural Development and Food towards the Veterinary Departments of the Regional Units.
16. The document under the reference number 6970/155730/09-12-2014 from the Department of Zoonoses of the Directorate of Animal Health of the Ministry of Rural Development and Food towards the Veterinary Departments of the Regional Units.
17. The document under the reference number 4742/139299/14-12-2015 from the Department of Zoonoses of the Directorate of Animal Health of the Ministry of Rural Development and Food towards the Veterinary Departments of the Regional Units.
18. <http://www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/animal-production/mhtrookth-ektrofh> [accessed 22 September 2016].

Рад примљен: 13.06.2018.

Рад прихваћен: 04.10.2018.

DOI 10.7251/VETJEN1802270K

UDK 619:616.981.42-07:636.32/.38(495)

Original scientific paper

INVESTIGATION OF THE HUMAN RESOURCES NEEDS FOR THE EFFECTIVE AND EFFICIENT IMPLEMENTATION OF THE SHEEP AND GOAT BRUCELLOSIS PROGRAM IN GREECE

Aristomenis KATSIOLIS^{1*}, Olga THANOU¹, Myrsini TZANI¹, Chrysoula DILE¹, Marilina KOROU¹, Athanasia STOURNARA², Evanthia PETRIDOU³, Nektarios D. GIADINIS^{4*}

¹ Department of Zoonoses, Directorate of Animal Health, Ministry of Rural Development and Food, Athens, GREECE

²Department of Veterinary Laboratory. National Reference Laboratory for Brucellosis, Larisa, GREECE

³Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, Aristotle University of Thessaloniki, GREECE

⁴Clinic of Farm Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, GREECE

* **Corresponding authors:** 1. Aristomenis Katsiolis, akatsiolis@minagric.gr 2. Nektarios D. Giadinis, ngiadinis@vet.auth.gr

Abstract: The sheep and goats brucellosis program is one of the most important animal health programs with significant animal health, public health, and international trade consequences. Several factors are involved in the implementation of this program, while its success depends on the availability of an effective, well-trained, and fully engaged staff. Considering the poor results of sheep and goats brucellosis program in Greece mainly related to the limited number of veterinarians working in the regional veterinary services, the present study aims to approach the number of the human resources and more precisely of veterinarians that are essential for the effective and efficient brucellosis control strategy in Greece. Therefore, the data derived by the performance of the program for the years 2012 to 2015 are analyzed. Finally, economic and political circumstances – external factors that affect the functionality of the program as well as all relevant bottlenecks are being discussed. The findings of the present study indicate that approximately 485 veterinarians with 485 assistants working for the needs of the brucellosis program would significantly assist on the complete implementation of the brucellosis control and eradication of the disease in Greek sheep and goat holdings.

Keywords: Brucellosis, Greece, brucellosis program, personnel

INTRODUCTION

The transmission of *Brucella* spp. to humans is of zoonotic importance and is related to the direct contact with infected tissues or secretions of affected animals or to the consumption of unpasteurized milk or products thereof (Atluri VL, 2011). Brucellosis is endemic in countries around the Mediterranean basin (Edgardo Moreno 2014), while Greece has the highest rates of human cases among European countries (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015). *Brucella melitensis* is associated with the vast majority of human cases (M.J. Corbel 2006).

In Greece the implementation of the Sheep and Goats (S&G) brucellosis program started in 1977 regulated by law (Presidential Decree 332 1977) and resulted in a significant decrease of clinical cases in animals and humans. Initially it was performed with the subcutaneous (sc) vaccination of young sheep and goats (3-6 months of age). During the period 1992 to 1998, the Central Competent Authority (CCA), which is the Animal Health Directorate of the Ministry of Rural Development & Food, decided to redesign the national brucellosis program in animals and gradually stopped the vaccination in some areas and initiated an eradication program based on the serological testing of the animals and the culling of infected sheep and goats. Initially, the islands (1992) were included in this new approach and gradually Peloponnese (1993) and then all animal holdings in

the entire country (1994) were included in the eradication program. This change resulted in a dramatic increase of brucellosis incidents in both humans and animals, mainly attributed to the incomplete and scarce application of the eradication program. This can be explained due to the following cause: the man-hours needed for approximately 15,000,000 blood samples were multiplied in relation to the vaccination of the replacement animals only, which was almost 3,000,000 (15-20% of the total population). The existing staff could not respond to the excessively increasing demands of the program. To address the problem, the massive vaccination of female, young and adult sheep and goats started again in the mainland and Evia, whereas on the islands, where the prevalence was lower, the eradication program continued (1999). The vaccination strategy returned in Lesvos and Leros islands in 2003 and in Thasos in 2008 due to human cases reported in these islands.

Until 2012, the sheep and goat vaccinations were not recorded per each individual animal-per ear tag-, but as a sum of animals in a vaccinated holding. The vaccinated animals were not recorded in any database and were recognized only individually from the tattoo on their right ear, if distinguished. With the Ministerial Decision 4888/130873/31.12.2012 (GG II/3545) (Edgardo Moreno 2014) the tattooing was repealed (due to involved

problems as it is painful for animals, dangerous for the person who applies it, time consuming etc.). Instead, the individual registration on a datasheet of the vaccinated animals was established according to their number of marking [an ear tag or a bolus, which is the individual animal identification number (ID)]. Subsequently, the IDs should be entered in the Central Data Base (CDB) by the authorized staff in RUs, but this was not strictly applied. Unfortunately, due to the fact that not all vaccinated animals are registered per ID in the country (before 2012), it is extremely difficult for the CCA which is competent for the evaluation of the effectiveness of the program at central level, to conclude the accurate results (number of alive vaccinated animals when compared to the total animal population), as CCA

relies on estimations for the number of vaccinated animals of the regional veterinarians which are responsible for the implementation of the program at local level and keep all the records.

Between 2012 and 2015, the S&G brucellosis program in Greece, divides the country in two zones: 1) A vaccination zone (VZ), where female sheep and goats are vaccinated once in their lives (over the age of 3months old) and male animals are routinely blood-sampled for further serological testing every 6-12 months (over the age of 6months old). 2) An eradication zone (EZ), where blood-sampling (every 6-12 months) and slaughter policy is implemented for all animals (over the age of 6months old) (Ministerial Decision, 2012) (Fig. 1).

Table 1. Vaccination zone (VZ). Data refer to the 31st December of each year

Year	Active farms (No)	Sheep & goats (No)	Vaccinated animals (No)	Unvaccinated animals (No)	Vaccination coverage at animal level (%)
2012.	103.569	11.871.587	7.683.545	4.188.042	64,72
2013.	90.719	11.642.501	8.696.434	2.946.067	74,69
2014.	87.937	11.562.550	8.525.347	3.037.203	73,73
2015.	54.817	9.106.569	7.181.215	1.925.354	78,85

In EZ, farms are classified in four categories according to their health status as to brucellosis; “M+” for positive holdings, “M1” for holdings of unknown status, “M2” for holdings with negative results, “M4s” for officially free holdings suspended and “M4” for

officially free holdings. More precisely, given that a farm is assigned to the “M1” health status (namely an unknown health status regarding brucellosis) two consecutive blood collections and testing are required in 6 to 12 months intervals with negative results regarding the

presence of *Brucella* spp. If the results of the first blood sampling are negative the farm can switch to an “M2” health status. Then, it is required a second blood collection with negative results and the holding can be characterized as “M4” (officially brucellosis free).

In the VZ, farms are classified as 1) “vaccinated”, 2) “unvaccinated” and 3) “farm with positive animals”.

The vaccine contains live *Brucella melitensis* bacteria; strain REV-1, which are pathogenic to humans (Vaccine's package leaflet, 2004). Hence, vaccination process should be performed in a place protected from wind and dust. All persons involved in the vaccination process (veterinarian, assistant and farm owner) are obliged to adopt the adequate biosecurity measures. In addition, they should not be positioned in a direction opposite to the wind. In the vaccination place, no one else should be present due to the increased risk of airborne infection or contact of the vaccine droplets with the mucosal tissues. Especially pregnant women should be outside the farm and avoid visiting it for the next few days. The vaccination of animals is required to be carried out by an official veterinarian. Moreover, since 2013 even private veterinarians, who have been approved by the Veterinary Department of the Directorate for Rural Economy and Veterinary of each Regional Unit, were permitted to participate in the implementation of the program (Instructions Manual, 2016).

Additional difficulties in the implementation of the program related to the socioeconomic situation in Greece that emerged in 2010. The major one was the reduction of expenditure in public sector, which caused a freeze in public servants' salaries, and reductions in their additional bonuses and overtime and travel allowances (Pipini M, 2014).

Moreover, the general *de minimis* ceiling of geotechnical employees' allowable movements per month and year, according to the Article 9 of Law 3833/2010¹², was limited to sixty (60) days from one hundred and twenty (120) that were set by the provisions of a previous Law, more specifically of Article 2 of Law 2685/1999 (Law 2685/1999). Exceeding the 60 days limit (up to 80 days) is permitted only for dealing with emerging events to support special service needs (https 2016a).

The above, combined with a) the restriction of compensated kilometric distances [Article 9 of Law 2685/1999, i.e. for a 20-40 km distance the compensation amounts to one third ($\frac{1}{3}$) of 10.000 GRDs¹], b) the two Insurance Laws (Law 3863 And Law 3865 of 2010) which favored the massive retirement of mainly women veterinarians (https 2016b), and c) the provisions of Article 11 of Law 3833 of 2010¹² «one recruitment per five retirements», affected negatively the implementation of the program.

The S&G brucellosis program aims to safeguard animal health and protect public health. So far the predicted targets have not been reached yet. The purpose

of the present study is the investigation of the minimum possible personnel (in the form of a two-person-group) for the

effective and efficient application of the program.

MATERIALS AND METHODS

For the present study a closed-ended type questionnaire was used, which was sent from the Department of Zoonoses (DZ) of the Directorate of Animal Health (DAH) of Ministry of Rural Development & Food (MRDF) to all Veterinary Departments (VDs) of Greece during the years 2012 until 2015. The questionnaire was sent at the end of each semester (on June 30th) and at the end of each year (on December 31st), so that official veterinarians who filled it became accustomed to its form and content. It consisted of two sections; the first one referred to the VZ and included 42 questions, and the second to the EZ and had 29 questions. The VZ section was divided into six subsections, namely, Holdings and Population; Vaccination with REV-1, Blood Sampling, Epizootiology and Epidemiology, Human Resources and Aims.

From the total of the 42 questions concerning the Regional Units (RUs) of the Vaccination Zone (VZ), the fields 41 and 42 of the subsection Aims of the questionnaire were used, i.e. «*A group can vaccinate in one day an average number of (41) ...female animals or collect (42)... blood samples*». As for the RUs of the Eradication Zone (EZ), from the total of the 29 questions, the field 27 of the questionnaire was used, i.e. «*A group can*

collect an average number of (27) ... blood samples in one day». Thereby it became possible to calculate the approximate capacity of a group (one veterinarian and one assistant) for each RU, based on the particular circumstances and the experience of veterinarians who applied the program for many years.

The next factor that should have been evaluated was the number of days that public veterinarians are entitled by law to work away from their office. This is widely known as the “*days away*” which each employee in the public sector is entitled to and for which he is compensated. In Greece since 2010, the maximum number of “*days away*” provided by legislation (Law 3833, 2010) is “60”. Multiplying the number of vaccinations or blood samplings by “60” the result reflects the total number of animals that is feasible to be vaccinated or blood sampled in the specific RU during a year.

Another important element that was assessed concerning the VZ resulted from the field 14 of the subsection Vaccination with REV-1 of the questionnaire: «*From the total animal population of our RU, (13) % of sheep and goats vaccinated and there are still (14)... unvaccinated animals*». In VZ, the fundamental parameter needed is the number of unvaccinated females in an RU. Unfortunately, from the total

¹ Greek drachmas. Monetary value in Greece until 2001.

of 60 RUs some RUs did not provide data. More specifically, in the year 2013 one RU and in the year 2015 two RUs did not provide data. For the years 2012 and 2014 all RUs responded to the questionnaire.

The number of employees who worked in the program derived from the fields of the subsection of Human Resources of the questionnaire. More specifically for the VZ the fields used were: «*In the Directorate of Rural Economy and Veterinary of our Periphery (Region) are currently working (31)... veterinarians (of permanent and contracts of indefinite duration),(32)... other employees (administrative staff, workers, etc.), (33)... veterinarians (seasonal) and (34)... other employees (seasonal).* For the EZ the fields that refer to Human Resources are

the same just with different numbering.

For reasons of convenience and as the calculation of the second and third condition is quite complex and of minor importance in relation to the first, this study was focused on the calculation of the necessary groups based only on the number of unvaccinated female animals. In almost all RUs requested to reply, the vaccine coverage as well as the number of remaining unvaccinated animals, was data obtained from the experience of the veterinarians, local service archives and the nearest possible statistical approach. Data that was sent from the official veterinarians of all Veterinary Departments were not checked for their accuracy, but they were accepted as received.

RESULTS

Thereafter, the results that arose from the answers received by the CCA on an annual basis are presented in full detail and further discussed. (The document 2012, The document 2013, The document 2014, The document 2015).

For the years 2012 to 2013 the number of active farms (which have live animals) and sheep and goats was determined by an approximate estimation performed by the official veterinarians concerning farms that were breeding animals in their RU, or was obtained directly from the Central Data Base (CDB). For the years 2014 and 2015 the determination of those two numbers was based on the

registration farmers made in the CDB for the previous year. The Department of Animal Identification and Registration Artificial Insemination and Veterinary Institutions of the Directorate of Animal Protection of the MRDF sent the registration data of the CDB to the DZ of the DAH of the MRDF. Thus, the number of active farms and the number of sheep and goats is considered to be closer to reality from the year 2014 onwards.

As it is shown in Table 1, in the VZ the number of active farms in 2012 was 103,569 and suffered a considerable decrease reaching 54.817 in the year 2015. This significant reduction is mainly due to the CDB's clearance (the

massive deletion of inactive holdings). The number of live sheep and goats also decreased from the year 2012 and after for the same reason. In the animal population, males were included and they are estimated at approximately 5-10% of the total population.

The number of vaccinated animals was obtained indirectly from the deduction of unvaccinated animals from the total animal population included in the vaccination scheme of the VZ. As for the number of unvaccinated animals it was extracted from the completion of the question 14 of the questionnaire.

The vaccination coverage was calculated based on the percentage of

vaccinated sheep & goats in the total sheep and goat population, as they were stated in the questionnaires. In calculating the vaccination coverage male animals (5-10%) were not taken into account.

For the year 2013 the reduction rate of active farms in the entire country was 12.83%, for 2014 it was 2.67% and for 2015 it was 38.03%. Thus, it resulted in a total reduction of holdings taken into account for the program of 47.43% in the years 2012-2015. The reduction rate of sheep and goat number was 3.23% in 2014 and for the year 2015 it was 18.59%.

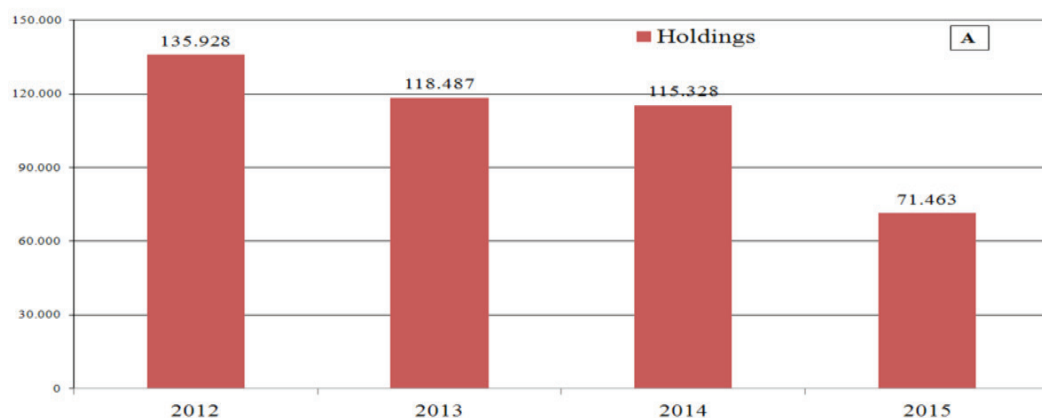


Fig 1. The number of sheep and goat holdings in the entire country is shown and the number of sheep and goats in the entire country per year is shown in Fig. 2.

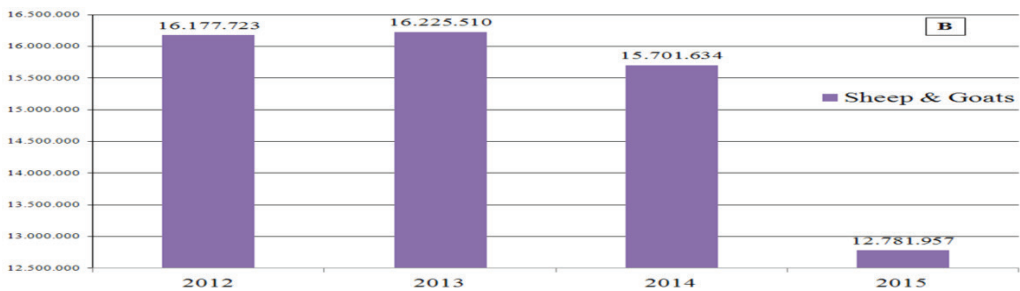


Fig 2. The number of sheep and goats in the entire country per year is shown

The correct registration of ovine and caprine population is a key parameter for the approximation of the necessary human resources to implement the program. Since M2 and M4 holdings of the EZ are “insignificant” compared to the total number, there was an indicative calculation of the at least one

blood collection of the total number of sheep and goats of the EZ. The basic and main parameter necessary is the actual number of animals older than 6 months in a RU since male and female animals older than 6 months are blood sampled (Table 2).

Table 2. Eradication Zone (EZ). Data refer to the 31st December of each year

Year		2012	2013	2014	2015
Holdings and animals in the programme	Holdings	28.155	27.827	28.543	16.646
	Sheep & Goats	4.306.136	4.583.015	4.138.404	3.675.388
Unknown status (M1)	Holdings	19.231	26.689	24.332	14.862
	Sheep & Goats	3.603.942	4.376.260	3.550.050	3.257.763
Positive holding (M+)	Holdings	44	37	30	33
	Sheep & Goats	16.887	16.523	12.779	12.004
Holding with negative results (M2)	Holdings	1.968	565	2.647	1.350
	Sheep & Goats	181.065	96.361	498.160	317.253
Officially free holding suspended (M4s)	Holdings	6.692	134	2	72
	Sheep & Goats	460.016	19.118	110	18.398

Officially free holding (M4)	Holdings	220	402	380	329
	Sheep & Goats	44.226	74.753	83.605	69.970

For the faster and safer implementation of vaccinations or blood samplings at least two persons are required (“group”) and the owner of the animals or someone who is in charge of their catch and restraint during the vaccination/sampling. The “group” consists of the official veterinarian who prepares the vaccine and instills it into the right eye of the animal or takes the blood sample and

his assistant who records the vaccinated/ blood-sampled animals in a catalogue and in general assists the veterinarian. The reduction in the number of registered holdings, in the number of sheep and goats after 2013, and in the animals’ population which is to be vaccinated or to be serologically tested, resulted in the gradual reduction of the total number of groups required (Table 3).

Table 3. Summary table with data on animal population, herds and human resources for the period 2012-2015, in whole country

Year	2012	2013	2014	2015
Registered holdings in the CDB	135.928	118.487	115.328	71.463
Number of sheep & goats	16.177.723	16.225.510	15.701.634	12.781.957
Number of animals’ population to be vaccinated or/and taken blood	8.089.886	7.837.837	7.305.702	5.743.742
Total of groups required	716	734	618	485
Permanent personnel	810	687	675	656
(veterinarians + other employees)	(480+330)	(413+274)	(404+271)	(394+262)
Seasonal personnel	29	123	103	9
(veterinarians + other employees)	(5+24)	(59+64)	(50+53)	(7+2)

The reduction of permanent staff (veterinarians and other technical/administrative employees) working on the implementation of the program for the years 2012-2015 is clearly illustrated. For the year 2013 it was (15.18%) **10.78%**, for the year 2014 **1.75%** and

for the year 2015 **2.97%**. Thus, a total reduction of permanent staff for the years 2012-2015 of (19.35%) **14.95%** resulted. As for the number of seasonal employees recruited in this period it apparently varies.

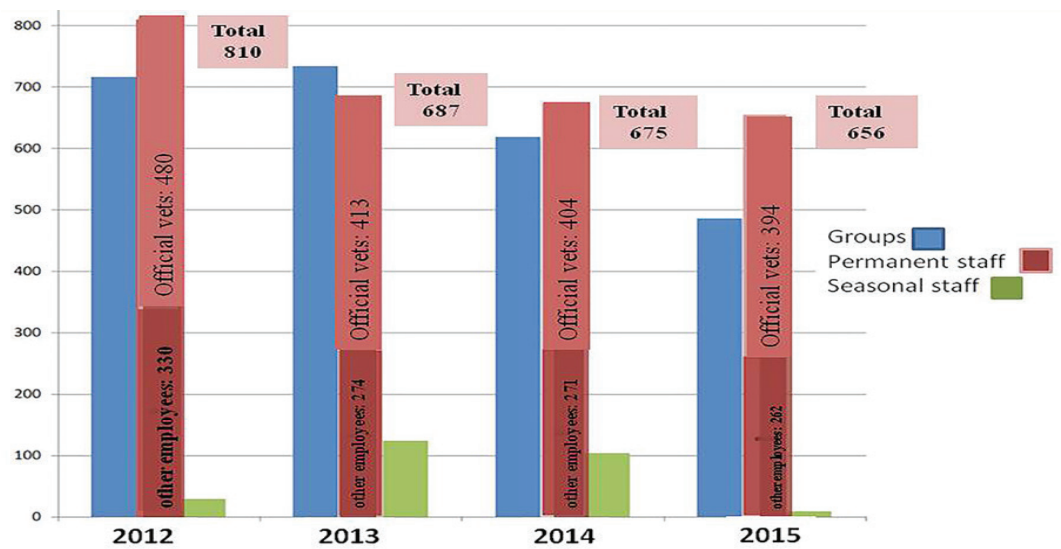


Fig 3. The analogy between the number of permanent staff, groups and seasonal employees during the years 2012-2015 is depicted.

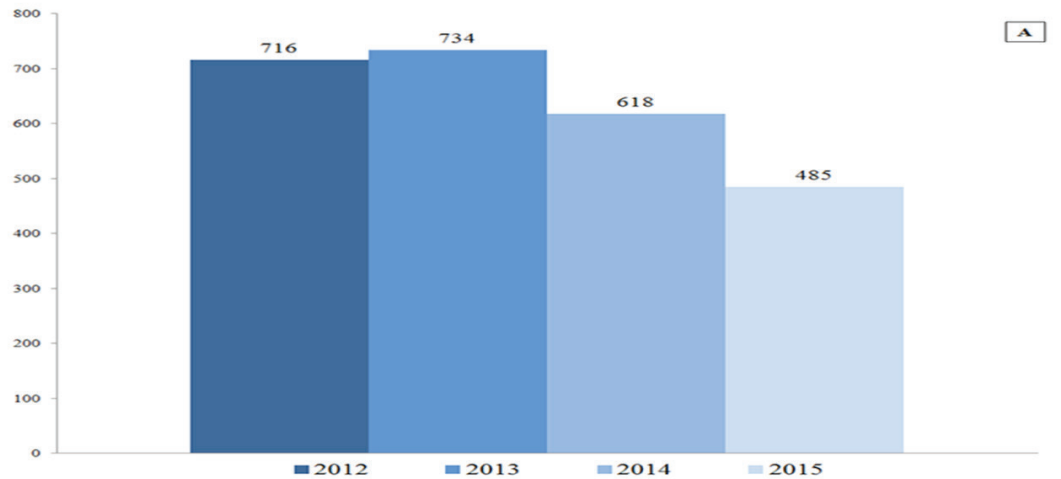


Fig 4. The number of necessary groups to effectively implement the program was calculated as following: 716 for the year 2012, 734 for the year 2013, 618 for the year 2014 and 485 for the year 2015.

As it resulted from the questionnaire, each Periphery has different needs in groups. The greatest number is demanded in the Peripheries of Crete (PC: 205 groups) and in the Periphery

of Western Greece (PWG: 71 groups). More specifically, in the PC the RU of Rethymno needs 121 groups and in the PWG the RU of Etolia-Acarmania needs 44 groups.

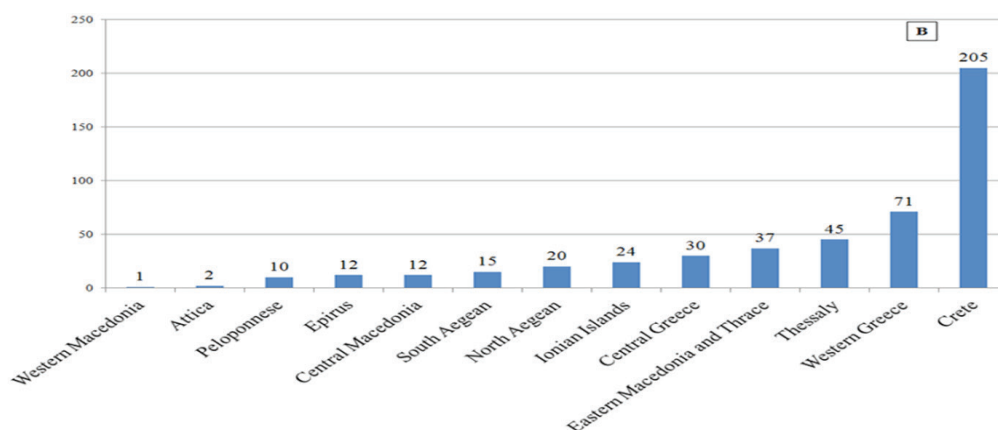


Fig 5. For the year 2015 the number of necessary groups in each Periphery is shown in

DISCUSSION

It is the first time that a scientific paper assesses in a holistic way information related to the total number of alive animals vaccinated with REV-1. In addition, updated data over serologically tested sheep & goats in Greece are provided for the years 2012-2015. The main goal of this study was to determine the minimum requirements in human resources that are considered as necessary on an annual basis for the effective implementation of the sheep and goat brucellosis program, by evaluating data obtained by the competent veterinary authorities that

implemented this program during the above period.

Evaluating the main outcomes of the present study it is obvious that the control and eradication program of sheep and goats' brucellosis in Greece was not possible to be applied successfully for the years 2012-2015.

The effort by the CCA to rationalize the number of holdings and animals resulted in the depicting of the reality in a better approximation, due to the accounting reduction of sheep & goats' number. Thus, a decrease in the number

of groups emerged. In fact, the necessary number of groups that should be involved for the program's needs during the year 2015 is 485 and approaches greatly the number of "holding's veterinarians" that are currently registered in the official database of the MRDF, which is 460 (<http> 2016). Taking into account the current economic conditions in the country, the recruitment and unique occupation of $485 \times 2 = 970$ public servants exclusively for the needs of brucellosis program cannot be considered as a realistic scenario, although politicians are being informed especially during the last years by the CCA, for the necessity of staffing of the regional veterinary services. However, evaluating the main conclusions of the present study, one could claim that at least partly, the minimum requirements in personnel for the effective implementation of brucellosis program in sheep and goats in Greece might be covered by the involvement of private veterinarians.

However, even in the case that private veterinarians (or farm's veterinarians) are able to fully address the needs of the program, it should be further investigated whether the permanent veterinary staff in the Regional Units has the capacity to supervise the program's implementation and perform the appropriate sample checks.

The time period of 2012-2015 is considered as one of the "hardest" periods

with regard to the early retirements of experienced veterinarians and other skilled professionals in the Public Sector. Thus, the number of permanent staff was reduced while on the other side, new administrative procedures regarding new official documents introduced (e.g. data entry, vaccination certificate, serological testing certificate), led to the increase of the necessary administrative procedures to address the services needs. In addition to that, there was a limitation of allowable movements and compensations as well as a significant reduction in the salaries of permanent and qualified staff. This situation affected negatively the implementation of the program.

A parameter that might have affected the validity of the extracted data presented in this study is that the analysis is based on estimations and approximations obtained by the implementation of the program by the official veterinarians in the regional units.

However, this study provides clear evidence regarding the extent of the problem related to the non-effective implementation of the Greek sheep and goats' brucellosis program and the importance of adoption of corrective actions in order to address the aforementioned bottlenecks.

CONCLUSIONS

Summarizing, the fiscal situation in Greece during the period 2012 to 2015 affected adversely the implementation of sheep and goat brucellosis program. For the effective and efficient implementation of the program, the recruitment of permanent and seasonal staff in the veterinary services is considered as of utmost importance. In addition, an increase in the “*days away*” threshold for the official regional veterinarians in order to restore the situation in the previous level of the 180 “*days away*” is also necessary as

brucellosis program is fully implemented in the field. Furthermore, the public veterinary sector at both central and regional level should deploy in a more effective way the already registered farm veterinarians so as to fill the gap in human resources. The above corrective actions have to be performed based on the livestock capacity among different peripheries.

Acknowledgements: The authors are thankful to prof. J. Bojkovski for his help in the manuscript.

REFERENCES

1. Atluri VL, Xavier MN, de Jong MF, den Hartigh AB, Tsolis RM. (2011): Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu Rev Microbiol.* 65:523-41.
2. Edgardo Moreno. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis (2014). *Front Microbiol.*, Published online.
3. European Centre for Disease Prevention and Control (2015): *EFSA Journal* 13 (1):3991
4. M.J. Corbel. *Brucellosis in humans and animals* (2006). Publishers WHO/CDS/EPR, ISBN 92 4 154713 8.
5. Presidential Decree 332 (GG I/107 of 16.04.1977) «*On preventing and combating tuberculosis and bovine brucellosis and sheep & goats brucellosis*».
6. Ministerial Decision 4888/130873 (GG II/3545 of 31.12.2012) on the program for the control and eradication S&G brucellosis program.
7. Ministerial Decision 4888/130873 (GG II/3545 of 31.12.2012) on the program for the control and eradication S&G brucellosis program.
8. Instructions Manual for the Application of the Control and Eradication Brucellosis Program of Sheep & Goats. Department of Zoonoses of the Directorate of Animal Health of the Ministry of Rural Development and Food.

- Athens, (2013). 4th Edition. <http://minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/animal-production/sheep-and-goats/823-astheneiesaignoprobaton> [accessed 28 November 2016].
9. Pipini M (2014): The impact of the economic crisis and recession in the Greek economy (2008-2013), proposals for exiting the crisis. Bachelor Thesis. page 25, paragraph 1. [Retrieved from goo.gl/9bk8b4 at 23 August 2016].
 10. Law 2685/1999 (GG I/35 of 18.02.1999) on the coverage of the expenses of moving employees within and outside the Territory and other provisions.
 11. <https://docman.gr/download.html?document=7995>[accessed 18 August 2016].
 12. <https://www.taxheaven.gr/news/news/view/id/25754>[accessed 12 August 2016].
 13. Law 3833/2010 (GG I/40 of 15.03.2010) on the protection of the national economy – emergency measures to address the financial crisis.
 14. The document under the reference number 4780/127774/17-12-2012 from the Department of Zoonoses of the Directorate of Animal Health of the Ministry of Rural Development and Food towards the Veterinary Departments of the Regional Units.
 15. The document under the reference number 4902/157052/17-12-2013 from the Department of Zoonoses of the Directorate of Animal Health of the Ministry of Rural Development and Food towards the Veterinary Departments of the Regional Units.
 16. The document under the reference number 6970/155730/09-12-2014 from the Department of Zoonoses of the Directorate of Animal Health of the Ministry of Rural Development and Food towards the Veterinary Departments of the Regional Units.
 17. The document under the reference number 4742/139299/14-12-2015 from the Department of Zoonoses of the Directorate of Animal Health of the Ministry of Rural Development and Food towards the Veterinary Departments of the Regional Units.
 18. <http://www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/animal-production/mhtrookth-ektrofh> [accessed 22 September 2016].

Paper received: 13.06.2018.

Paper accepted: 04.10.2018.

EFIKASNOST HACCP SISTEMA U KONTROLI MIKROBIOLOŠKIH OPASNOSTI U PROIZVODNJI DIMLJENE PASTRMKE (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)^{*}

Snježana MANDIĆ¹, Danica SAVANOVIĆ^{1*}, Ana VELEMIR¹, Vladimir
MARJANOVIĆ²

¹Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet, 78000 Banja Luka, Republika Srpska,
Bosna i Hercegovina

²Ribnjak Janj d.o.o. 78000 Banja Luka, Republika Srpska, Bosna i Hercegovina

* *Korespondentni autor*: Danica Savanović, E-mail: danica.savanovic@tf.unibl.org

Kratak sadržaj: U radu je opisana primjena HACCP sistema u procesu proizvodnje hladno dimljene pastrmke. Praćena je proizvodnja hladno dimljenog fileta pastrmke (*Oncorhynchus mykiss*) sa stanovišta bezbjednosti proizvoda spremnih za konzumiranje. Proces prerade je posmatran i obrađen u skladu sa principima HACCP sistema. U prikazanom modelu, identifikovane su tri kritične kontrolne tačke (CCP) za biološke opasnosti, za koje su definisane kritične granice, način monitoringa, korektivne mjere i način verifikacije. Tokom 12 mjeseci analizirana je mikrobiološka ispravnost 65 uzoraka svježe pastrmke i 195 uzoraka gotovog proizvoda, dimljene pastrmke. Rezultati mikrobioloških ispitivanja svježe i dimljene pastrmke, tokom ispitivanog perioda, su bili u skladu sa propisanim vrijednostima, što potvrđuje efikasnost primjene HACCP sistema u procesu proizvodnje dimljene pastrmke.

Ključne riječi: HACCP sistem, dimljena pastrmka, kritična kontrolna tačka (CCP)

UVOD

Riba pripremljena pečenjem ili i za potrošače i za proizvođače ribe. prženjem, konzervisana mariniranjem, Soljenjem, salamurenjem i dimljenjem soljenjem, salamurenjem ili sušenjem, konzervisana riba predstavlja visoko kao i dimljenjem, ima visoko cijenjena cijenjen gastronomski specijalitet. nutritivna i senzorna svojstva, što Dimljenje ribe obično se provodi na predstavlja dodatni opredjeljujući faktor dva načina: hladno dimljenje i vruće

* Презентован на 23. Годишњем савјетовању доктора ветеринарске медицине Републике Српске (БиХ). Теслић, 6-9- јуна 2018

dimljenje. Hladno dimljenje se najčešće izvodi na temperaturi od 30 °C do 40 °C, a vruće dimljenje na temperaturi od 80 °C do 90 °C (Alam, 2007). Dimljenje utiče na postizanje karakteristične arome proizvoda i boje spoljašnjosti proizvoda, doprinosi očuvanju proizvoda usljed baktericidnih i bakteriostatskih uticaja komponenti dima, kao i antioksidacionih osobina fenola koji su prisutni u dimu (Toldra, 2002; Bortolomeazzi i sar., 2007; Akintola i sar., 2013). Stoga dimljenje ima sve veći značaj u savremenoj preradi ribe, i predstavlja način tehnološke obrade kojim se postiže karakterističan miris, boja, aroma i tekstura gotovog proizvoda.

Hladno dimljena pastrmka je proizvod koji je, sa stanovišta bezbjednosti hrane, kategorisan kao spreman za konzumaciju (RTE-ready to eat). S obzirom na činjenicu da se proizvod ne podvrgava termičkoj obradi i da se tokom proizvodnje najčešće ne dodaju aditivi, zadržane su nepromijenjene osnovne, kvalitativne karakteristike proizvoda, te se on, kao takav, definiše kao proizvod izuzetnog kvaliteta.

Konzumacija proizvoda ribarstva, jednako kao i ostalih prehrambenih proizvoda, povezana je s određenim biološkim i hemijskim rizicima. Najčešći hemijski rizici pri konzumaciji ribe, rakova i školjakaša su histamin i teški metali (Alić i sar., 2004; Bergman i sar., 2015). Biološke opasnosti uključuju: parazite, mikroorganizme (bakterije, viruse) i toksine (Baltić i sar., 2009). Stepen kontaminacije ribe zavisi od

okoline i bakteriološke ispravnosti vode u kojoj je riba ulovljena (Kožačinski i sar., 2009).

Subjekti u poslovanju hranom na nivou primarne proizvodnje, dužni su uspostaviti i sprovesti redovne kontrole higijenskih i zdravstveno-tehničkih uslova proizvodnje u svakom objektu, provođenjem preventivnih postupaka samokontrole, razvijenih u skladu s dobrom proizvođačkom praksom. Sa ciljem da se izbjegnu sve potencijalne opasnosti hemijske, fizičke i biološke/mikrobiološke prirode, koje mogu ugroziti zdravlje potrošača u lancu proizvodnje hrane se primjenjuje integrisani sistem kontrole, HACCP sistem (Grujić i sar., 2003; Gramza-Michałowska i Korczak 2008; Kožačinski i sar., 2009; Savanović i sar., 2017).

U proizvodnji hrane se pokazalo da je HACCP sistem kontrole koji daje praktično dobre rezultate (Lu i sar., 2014; Hung i sar., 2015; Novaković i Savanović, 2017). Uvođenje HACCP sistema omogućava preduzećima razvoj sopstvenog sistema kontrole proizvodnje i rukovođenja higijenski ispravnom i kvalitetnom hranom, kao i određivanje dozvoljenih dopuštanja i preduzimanje korektivnih aktivnosti prije nastanka ozbiljnih problema (Stanley i sar., 2011; Hung i sar., 2015). Na ribnjacima koji imaju dobru proizvođačku praksu i sve preduslovne programe preporučuje se implementacija HACCP sistema, u cilju proizvodnje kvalitetne i zdravstveno bezbjedne ribe (Kožačinski i sar., 2009).

Metodom HACCP utvrđuju se specifične opasnosti kao i mjere njihove prevencije, odnosno kontrole, čime se osigurava bezbjednost proizvoda (*Jeličić i sar., 2009; Singh, 2015; Savanović i sar., 2017*). Pored identifikacije opasnosti i procjene rizika, ova metoda se koristi i za uspostavljanje specifičnih mjera kontrole naglašavajući pri tom značaj

prevencije i kontrole u odnosu na tradicionalne metode inspekcije.

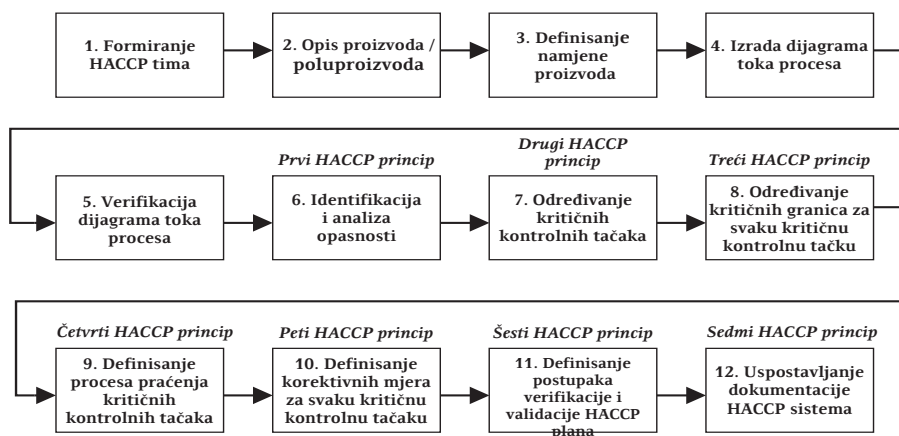
Cilj ovog rada je bio da se definišu kritične kontrolne tačke (CCP) i ispita efikasnost HACCP sistema u kontroli mikrobioloških opasnosti u proizvodnji dimljene pastrmke (*Oncorhynchus Mykiss*).

MATERIJAL I METODE RADA

Sistem upravljanja bezbjednošću hrane u procesu proizvodnje dimljene pastrmke, pripremljen je prema HACCP Upustvu *Codex Alimentarius (Aneks CAC/RCP 1-1969.Rev.4 (2003))* uz uvažavanje određenih preporuka (*Vodič o implementaciji HACCP principa kod određenih subjekata u poslovanju sa hranom, 2012*). Nakon primjene preduslovnih programa (*ISO, 2009*) preduzeće koje se bavi proizvodnjom di-

mljene pastrmke treba da razvije HACCP plan. HACCP sistem bezbjednosti hrane zasnovan je na sedam osnovnih principa, a izrada HACCP plana se provodi u dvanaest koraka (*Shema 1*). Osnovni postulati HACCP sistema primijenjeni su u svim fazama proizvodnje dimljene pastrmke, na način da se sistem analize rizika na kritičnim kontrolnim tačkama proizvodnje postepeno ugrađivao u proizvodni proces.

Shema 1. Tok primjene HACCP sistema u proizvodnji dimljene pastrmke



Mikrobiološka ispravnost svježe i dimljene pastrmke kontinuirano je praćena tokom perioda od 12 mjeseci. Analizirano je 65 uzoraka svježe pastrmke i 195 uzoraka gotovog proizvoda, dimljene pastrmke. U analiziranim uzorcima svježe pastrmke vršeno je ispitivanje prisustva sledećih mikroorganizama: *Salmonella* (BAS EN ISO 6579/Cor2:2010); *Listeria monocytogenes* (BAS EN ISO 11290-1/A1:2005); Sulfitoredukujuće anaerobne bakterije (BAS ISO 15213:2008);

Koagulaza pozitivne stafilocoke (BAS EN ISO 6888-1/A1:2005); *Enterobacteriaceae* (BAS ISO 21528-2:2013). U uzorcima dimljene pastrmke vršeno je ispitivanje prisustva sledećih mikroorganizama: *Salmonella* (BAS EN ISO 6579/Cor2:2010); *Listeria monocytogenes* (BAS EN ISO 11290-1/A1:2005); Sulfitoredukujuće anaerobne bakterije (BAS ISO 15213:2008); Koagulaza pozitivne stafilocoke (BAS EN ISO 6888-1/A1:2005); Aerobne mezofilne bakterije (BAS EN ISO 4833:2006).

REZULTATI I DISKUSIJA

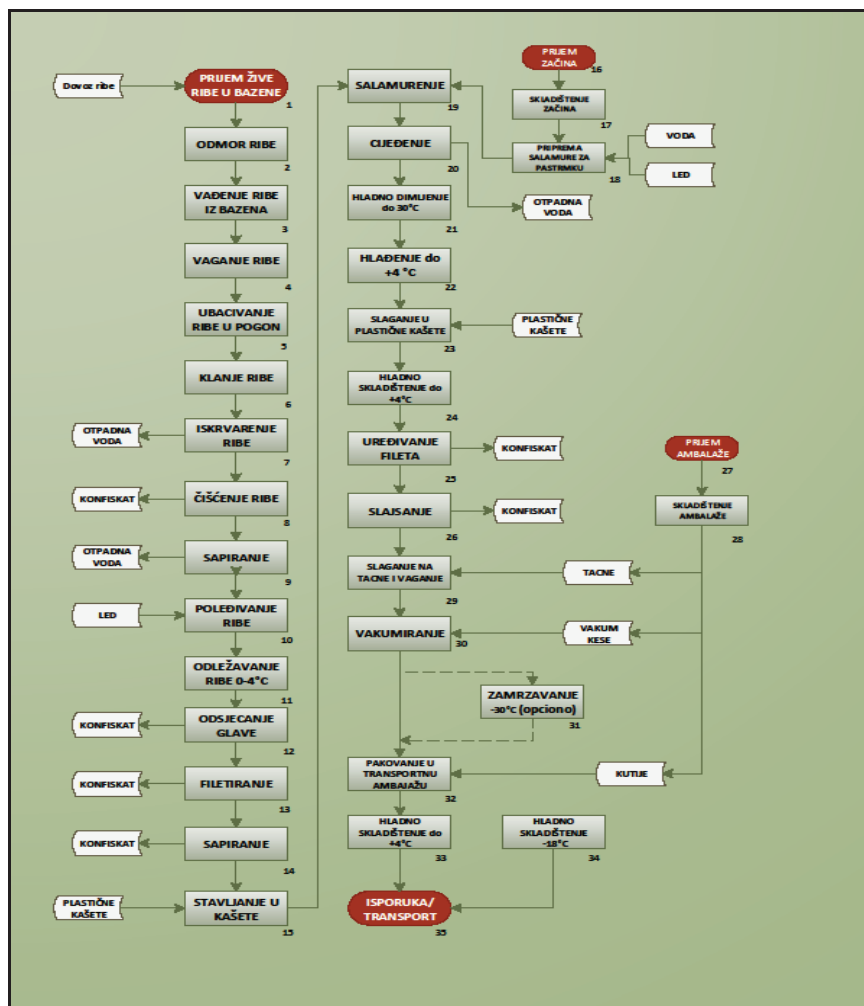
Nakon formiranja HACCP tima slijedi izrada opisa proizvoda. HACCP tim je pripremio Opis proizvoda (Tabela 1) i Dijagram toka za proizvodnju dimljene pastrmke (Shema 2), prema načelima

HACCP sistema. Opis proizvoda sadrži informacije koje se odnose na bezbjednost proizvoda (CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003).

Tabela 1. Opis proizvoda hladno dimljenog fileta pastrmke

NAZIV PROIZVODA	DIMLJENA PASTRMKA
NAZIV GRUPE PROIZVODA	Hladno dimljena riba, vakuum pakovana
NAMJENA I NAČIN UPOTREBE	Za sve kategorije potrošača (osim alergičnih na ribu); Proizvod je spreman za upotrebu.
SASTAV	Filet kalifornijske pastrmke (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), so, začini.
SENZORNA SVOJSTVA	Koža je neoštećena i metalnog sjaja. Meso ne pokazuje znakove sušenja (dehidraciju), ima karakterističnu boju, miris i ukus dimljene ribe, suvo je i čvrste konzistencije. Fileti ne sadrže ostatke nejestivih dijelova (kostiju).
TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE	Pastrmka se vadi iz prihvatnih bazena, mjeri masa, ubacuje u pogon za preradu. U pogonu se riba kolje, eviscerira i pere, a zatim se fileтира, salamuri i hladno dimi. Nakon dimljenja fileti se narezuju, vakuumiraju i skladište u komori do otpreme.

PAKOVANJE	<i>Primarno pakovanje:</i> vakuum kese, kutije. <i>Transportno pakovanje:</i> kartonska kutija.
USLOVI SKLADIŠTENJA	Komore sa temperaturnim režimom od 0-4 °C ili -18 °C.
USLOVI TRANSPORTA	Prevozno sredstvo koje posjeduje rashladni sistem za postizanje temperature transporta od 0-4 °C ili -18 °C.
ROK UPOTREBE	30 dana od dana proizvodnje za proizvod ili 12 mjeseci za zamrznut proizvod.
UPUTSTVO ZA UPOTREBU	Nije potrebna termička obrada. Proizvod držati u frižideru i upotrijebiti do 3 dana nakon otvaranja pakovanja
HEMIJSKI I MIKROBIOLOŠKI PARAMETRI	#Dozvoljen sadržaj štetnih materija: - Pb max 0.3 mg/kg - Cd max 0.05 mg/kg - Hg max 0.5 mg/kg - As max 2,0 mg/kg - Suma dioksina: max 3.5 pg/g vlažne mase - Suma dioksina i PCB: max 6,50 pg/g vlažne mase - Suma PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180: max 75ng/g vlažne mase - Benzo(a)piren max 2.0 µg/kg, - Suma benzo(a)pirena, benzo(a)antracena, benzo(b)fluorantana i krizena 12,0µg/kg - Policiklični aromatski ugljiovodici (PAH) 2,0µg/kg <i>#Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani (Službeni glasnik BiH, br. 68/14)</i> Mikrobiološki kriterijumi: - *<i>Salmonella</i> spp 0 u 25g - **<i>L. monocytogenes</i> 0 u 25 g - *Sulforedukujuće klostridije M=10 cfu/g - *Koagulaza pozitivne stafiločke M=10 cfu/g - *Aerobne mezofilne bakterije m=100 cfu/g do M=1000cfu/g * <i>Smjernice o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Agencija za bezbjednost hrane BiH, 2013)</i> ** <i>Pravilnik o mikrobiološkim kriterijumima za hranu (Službeni glasnik BiH, br. 11/13)</i>



Shema 2. Dijagram toka za hladno dimljeni filet pastrmke

Pravilna primjena HACCP sistema zahtijeva da se naučno dokumentovani postupci i preventivne mjere koje postoje, efikasno primjene na utvrđene kritične kontrolne tačke (CCP). Određivanje kritičnih kontrolnih tačaka u svrhu implementacije HACCP sistema je moguće za hemijske, fizičke i biološke opasnosti. Prema Vodiču o

implementaciji HACCP principa kod određenih subjekata u poslovanju sa hranom (2012) sve faze toka proizvodnje, praktično od prijema sirovine do plasiranja finalnog proizvoda na tržište, uključujući pripremu, obradu, pakovanje u ambalažu, skladištenje i distribuciju trebaju biti izanalizirani prema datom redoslijedu. Da bi se definisale opasnosti

potrebno je navesti sve one opasnosti povezane s proizvodnim procesom, koje su posljedica direktne ili indirektna kontaminacije, a po svojoj su prirodi biološke, hemijske i fizičke prirode.

Tokom izrade HACCP studije za proizvodnju dimljene pastrmke analizirano je ukupno 47 opasnosti, od čega 30 bioloških, 10 hemijskih

i 7 fizičkih opasnosti. Primjenom preduslovnih programa (ISO, 2009) moguće je eliminisati 20 bioloških, 10 hemijskih i 7 fizičkih opasnosti, tj. ukupno 37 opasnosti. Na kontrolnim tačkama (CP) moguće je eliminisati 8 bioloških opasnosti, dok se 2 biološke opasnosti eliminišu na kritičnim kontrolnim tačkama (CCP) (Tabela 2).

Tabela 2. Pregled opasnosti analiziranih tokom izrade HACCP studije

Vrsta opasnosti	Broj analiziranih opasnosti	Broj opasnosti eliminisanih primjenom preduslovnih programa	Broj opasnosti koje se eliminišu na CP	Broj opasnosti koje se eliminišu na CCP
Biološke opasnosti	30	20	8	2
Hemijske opasnosti	10	10	0	0
Fizičke opasnosti	7	7	0	0
Ukupno	47	37	8	2

U toku sprovođenja faze Analiza opasnosti HACCP tim je identifikovao 8 kontrolnih tačaka (CP) i 2 kritične kontrolne tačke (CCP). Identifikovane kontrolne tačke (CP) su:

- Priprema salamure;
- Salamurenje;
- Hladno dimljenje;
- Skladištenje poluproizvoda na +4 °C;
- Skladištenje gotovog proizvoda na +4 °C;
- Zamrzavanje;

- Skladištenje zamrznutog proizvoda na -18 °C;

- Isporuka i transport.

Identifikovane kritične kontrolne tačke (CCP) su:

- Skladištenje eviscerirane i poleđene ribe (Odležavanje ribe na +4 °C);
- Hlađenje dimljenog fileta.

Redovnim i kontinuiranim praćenjem svih kontrolnih tačaka u proizvodnji identifikovane opasnosti i rizici se uklanjaju prije nastanka zdravstveno neispravnog proizvoda što je ključ za

uspješno provođenje HACCP sistema. Kritične kontrolne tačke su uvrštene u HACCP plan i definisane su kritične granice, način monitoringa, korektivne mjere i način verifikacije. HACCP

planovi su obimni dokumenti, zbog čega se u ovom radu daje izvod najvažnijih elemenata za identifikovane CCP (Tabele 3 i 4).

Tabela 3. Izvod iz HACCP plana, koji se odnosi na CCP1

CCP/ Korak procesa	Opasnost	Kritična granica	Monitoring	Korektivne mjere	Verifikacija
CCP 1 Skladištenje eviscerirane i poledene ribe	Biološka: Patogeni mikroorganizmi	Temperatura u rashladnim uređajima mora biti 0-4 °C.	Šta: Kontrola temperature u rashladnim uređajima Kako: Očitavanjem sa displeja termometra Kad: 2x dnevno (na početku i na kraju radnog dana) Ko: Član HACCP tima zadužen za kontrolu temperature rashladnih uređaja Zapis: Smjenski izvještaj o temperaturama u prostorijama	-U slučaju odstupanja, član HACCP tima zadužen za kontrolu temperature, podešava temperaturu u komori (ako je moguće). Ukoliko se ne može postići tražena temperatura organizuje se prebacivanje proizvoda u drugu komoru ili hladnjaču dok se ne otkloni uzrok odstupanja. -Voda HACCP tima identifikuje uzrok odstupanja i uspostavlja mjere za sprečavanje ponavljanja odstupanja. -Ako je uzrok odstupanja kvar opreme, kontaktira se služba održavanja. Plan preventivnog održavanja će se pregledati i, ako je potrebno, izmijeniti. -Voda HACCP tima donosi ocjenu o upotrebljivosti proizvoda na osnovu promjene temperature proizvoda i vremena provedenog na povišenoj temperaturi, i određuje kako će se sa njim dalje postupiti. -Sprovedena korektivna mjera evidentira se u predviđeni obrazac.	-Temperature rashladnih komora se automatski očitavaju i bilježe na računaru. -Voda HACCP tima provjerava temperaturene zapise. -Odsutnost utvrđene opasnosti potvrđuje se laboratorijskim analizama, prema planu uzorkovanja.

Tabela 4. Izvod iz HACCP plana, koji se odnosi na CCP2

CP/CCP Korak procesa	Opasnost	Kritična granica	Monitoring	Korektivne mjere	Verifikacija
CCP 2 Hlađenje dimljenog fileta	Biološka: patogeni mikroorganizmi	<i>Temperatura u rashladnim uređajima mora biti 0-4 °C</i>	Šta: Kontrola temperature u rashladnim uređajima Kako: Očitavanjem sa displeja termometra Kad: 2x dnevno (na početku i na kraju radnog dana) Ko: Član HACCP tima zadužen za kontrolu temperature rashladnih uređaja Zapis: Smjenski izvještaj o temperaturama u prostorijama	-U slučaju odstupanja, član HACCP tima zadužen za kontrolu temperature podešava temperaturu u komori (ako je moguće). Ukoliko se ne može postići tražena temperatura organizuje se prebacivanje proizvoda u drugu komoru ili hladnjaču vozila dok se ne otkloni uzrok odstupanja. -Vođa HACCP tima identifikuje uzrok odstupanja i uspostavlja mjere za sprečavanje ponavljanja odstupanja. -Ako je uzrok odstupanja kvar opreme, kontaktira se služba održavanja. Plan preventivnog održavanja će se pregledati i, ako je potrebno, izmeniti. -Vođa HACCP tima donosi ocjenu o upotrebljivosti proizvoda na osnovu promjene temperature proizvoda i vremena provedenog na povišenoj temperaturi, i određuje kako će se sa njim dalje postupati. -Sprovedena korektivna mjera evidentira se u predviđeni obrazac.	-Temperature rashladnih komora se automatski očitavaju i bilježe na računaru. -Vođa HACCP tima projerava temperaturne zapise. -Odsutnost utvrđene opasnosti potvrđuje se laboratorijskim analizama, prema planu uzorkovanja.

Mikrobiološka kontaminacija prehrambenih proizvoda glavna je prepreka osiguranju bezbjednosti hrane (Dutta i sar., 2017). Neke od prednosti HACCP sistema nad tradicionalnim sistemima kontrole hrane su da se kontrolni parametri lako nadgledaju, rad se kontroliše na licu mjesta, čime se postojeće i predviđene opasnosti mogu identifikovati i otkloniti, pa se tako osigurava zdravstvena ispravnost već u

fazi izrade proizvoda, a korektivne mjere provode se proaktivno tj. prije nastanaka težih problema (Jeličić i sar., 2009). U cilju analize efikasnosti provođenja HACCP sistema u procesu proizvodnje dimljene pastrmke vršene se određene mikrobiološke analize polazne sirovine i gotovog proizvoda, tokom 12 mjeseci proizvodnje. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 5 i Tabeli 6.

Tabela 5. Rezultati mikrobioloških analiza svježe pastrmke

Uzorak	Mikroorganizmi	Broj analiziranih uzoraka	JM	Propisana vrijednost	Ustanovljena vrijednost
Svježa pastrmka	<i>Salmonella</i>	20	u 25g	Ne smije da sadrži	Nije izolovano
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	u 25g	Ne smije da sadrži	Nije izolovano
	Sulfitoredukujuće anaerobne bakterije	15	cfu/g	m=100 M=1000	<100
	Koagulaza poz. stafiloške	5	cfu/g	m=10 M=100	<10
	<i>Enterobacteriaceae</i>	20	cfu/g	m=100 M=1000	<100

m - granična vrijednost - rezultati se smatraju zadovoljavajućim ako su sve dobijene vrijednosti manje ili jednake vrijednosti "m"

M- najveća dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju nezadovoljavajućim; JM- jedinica mjere

Tabela 6. Rezultati mikrobioloških analiza dimljene pastrmke

Uzorak	Mikroorganizmi	Broj analiziranih uzoraka	JM	Propisana vrijednost	Ustanovljena vrijednost
Dimljena pastrmka	<i>Salmonella</i>	60	u 25g	Ne smije da sadrži	Nije izolovano
	<i>Listeria monocytogenes</i>	60	u 25g	Ne smije da sadrži	Nije izolovano
	Sulfitoredukujuće anaerobne bakterije	50	cfu/g	M=10	<10
	Koagulaza poz. stafilokoke	15	cfu/g	M=10	<10
	Aerobne mezofilne bakterije	10	cfu/g	m=100 M=1000	<100

m - granična vrijednost - rezultati se smatraju zadovoljavajućim ako su sve dobijene vrijednosti manje ili jednake vrijednosti "m"

M - najveća dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju nezadovoljavajućim;
JM- jedinica mjere

Rezultati mikrobiološke analize uzoraka svježe i dimljene pastrmke ukazuju na odsutnost *Salmonella spp.* i *Listeria monocytogenes* u svim ispitivanim uzorcima, tokom ispitivanog perioda. Broj sulfitoreredukujućih anaerobnih bakterije, koagulaza pozitivnih stafilokoka, *Enterobacteriaceae* kao i broj aerobnih mezofilnih bakterija je bio u skladu sa vrijednostima propisanim Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijumima za hranu (*Službeni glasnik BiH, br. 11/13*) i Smjernicama o mikrobiološkim kriterijima za hranu (*Agencija za bezbjednost hrane BiH, 2013*). Mikrobiološka kontaminacija dimljene ribe može nastati zbog nekoliko faktora kao što su greške tokom procesa

dimljenja ili neadekvatno provedena faza dimljenja, loši higijenski uslovi, upotreba neadekvatne ambalaže za pakovanje kao i upotreba neadekvatnih postrojenja za preradu i sl. (*Adegunwa i sar., 2013*). Kako bi se obezbijedio mikrobiološki ispravan i bezbjedan proizvod koji zadovoljava uslove kvaliteta potrebno je proces dimljenja izvoditi u strogo kontrolisanim uslovima i obezbijediti adekvatnu higijenu u proizvodnim pogonima. Brojni autori u svojim istraživanjima (*Kök, 2009; Kafetzopoulos, 2013; Novaković i Savanović, 2017*) nedvosmisleno potvrđuju da je primjena HACCP sistema za bezbjednost hrane naučno i praktično opravdana i osim toga pravno obavezujuća za većinu

poslovnih subjekata u poslovanju s hranom. Na osnovu rezultata mikrobioloških ispitivanja prikazanih u ovom radu vidljivo je da u posmatranom

vremenskom periodu nije bilo odstupanja od propisanih vrijednosti i da je taj aspekt HACCP plana uspješno provjeren.

ZAKLJUČAK

U ovom radu je predstavljen HACCP koncept u cilju osiguranja bezbjednosti u svim fazama proizvodnje dimljene pastrmke i dobijanja mikrobiološki ispravnog proizvoda.

Sprovođenjem faze Analize opasnosti identifikovao je 8 kontrolnih tačaka (CP) i 2 kritične kontrolne tačke (CCP). Identifikovane kontrolne tačke (CP) su: priprema salamure, salamurenje, hladno dimljenje, skladištenje poluproizvoda na +4 °C, skladištenje gotovog proizvoda na +4 °C, zamrzavanje, skladištenje zamrznutog proizvoda na -18 °C, isporuka i transport. Identifikovane kri-

tične kontrolne tačke (CCP) su: skladištenje eviscerirane i poledene ribe (odležavanje ribe na +4 °C) i hlađenje dimljenog fileta.

Rezultati ovog rada potvrđuju da HACCP plan predstavlja dio sistema upravljanja bezbjednošću hrane u proizvodnji dimljene pastrmke. Rezultati mikrobiološke analize osnovne sirovine i gotovih proizvoda nisu pokazali odstupanja od definisanih kriterijuma, što potvrđuje efikasnost primjene HACCP sistema u procesu proizvodnje dimljene pastrmke.

LITERATURA

1. Adegunwa, M.O, Adebawale, A.A, Olisa, Z.G and Bakare, H.A. (2013): Chemical and microbiological qualities of smoked herring (*sardinella eba*, valenciennes 1847) in Odeda, Ogun state, Nigeria. *International Journal of Microbiology Research and Reviews* 1(5): 085-087.
2. Akintola S. L., Brown A., Bakare A., Osowo O. D., Bello B. O. (2013): Effects of Hot Smoking and Sun Drying Processes on Nutritional Composition of Giant Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*, Fabricius, 1798). *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 63(4): 227-237.
3. Alam N.A.K.M. (2007): Participatory Training of Trainers: A New Approach Applied in the fish processing. *Bangladesh Fisheries Research Forum*, Bangladesh.
4. Alić B., Milanović A., Čaklovica F., Saračević L. (2004): Sadržaj bakra, cinka, kadmija, olova i žive u mišićnom tkivu pastrva (*Salmo Trutta M. Fario L.*) i škobalja (*Chondrostoma Nasus L.*) izlovljenih iz Une, Vrbasa i Drine. *Meso* 6(3): 40-46.

5. Baltić M. Ž., Kilibarda N., Teodorović V., Dimitrijević M. Karabasil N., Dokmanović M. (2009): Potencijalne biološke opasnosti od značaja za HACCP planove u procesu obrade sveže ribe. *Vet. glasnik* 63(3-4): 201- 213.
6. BAS EN ISO 6888-1/A1:2005 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za brojanje koagulasa pozitivnih stafilocoka *Staphylococcus aureus* i druge vrste) - Dio1: Tehnika korišćenja Baird-Parker agar medija - Amandman 1: Uključivanje preciznosti podataka. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
7. BAS EN ISO 4833:2006 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -Horizontalni metod za brojanje mikroorganizama - Tehnika brojanja kolonija na 30 °C. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
8. BAS ISO 15213:2008 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za brojanje sulfitoreducujućih bakterija koje rastu pri anaerobnim uslovima. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
9. BAS EN ISO 11290-1/A1:2005 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za detekciju i brojanje *Listeria monocytogenes* - Dio 1: Metoda detekcije - Amandman 1: Modifikacija izolacije medija i test hemolize i uključenje preciznosti podataka. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
10. BAS ISO 21528-2:2013 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za detekciju i određivanje broja *Enterobacteriaceae* — Dio 2: Metoda brojanja kolonija. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
11. BAS EN ISO 6579/Cor2:2010 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za detekciju *Salmonella* spp. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
12. Bergman, T., Cvrtila Fleck Ž., Njari B., Kozačinski L. (2015): Rizični čimbenici koji nastaju konzumacijom sirove ribe i školjkaša. *Meso* 1: 65-71.
13. Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R., Pizzariello A. (2007): Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry* 100: 1481–1489.
14. CAC (WHO/FAO). (2003): The Codex General principles of food hygiene, Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP Systems and Guidelines for its application, *Annex to CAC/RCP 1-1969 (Rev. 4 - 2003)*.www.codexalimentarius.net
15. Dutta M., Majumdar P. R., Rakeb-Ul-Islam Md., Saha D. (2017): Bacterial and Fungal Population Assessment in Smoked Fish during Storage Period. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene* , 3(1): 1-7.
16. Gramza-Michałowska A., Korczak J. (2008): Vegetable products as HACCP system subject In modern gastronomy. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 7(3): 47-53.

17. Grujić R., Sanchis V.-A., Radovanović R. (2003): HACCP – teorija i praksa. University of Leida, Spain/University, Banja Luka.
18. Hung Y.-T., Liu C.-T., Peng I.-C., Hsu C., Yu, R.-C. Cheng K.-C. (2015): The implementation of a Hazard Analysis and Critical Control Point management system in a peanut butter ice cream plant. *Journal of food and drug analysis* 23, 509-515.
19. ISO (International Organisation for Standardisation). (2009): Prerequisite programmes on food safety – Part 1: Food manufacturing (ISO/TS 22002-1:2009).
20. Jeličić I., Božanić R., Krčmar N. (2009): Primjena HACCP sustava u proizvodnji UHT steriliziranog mlijeka. *Mljekarstvo* 59 (2):155-175.
21. Kafetzopoulos, D.P., Psomas, E.L., Kafetzopoulos, P.D. (2013): Measuring the effectiveness of the HACCP Food Safety Management System. *Food Control* 33(2): 505 – 513.
22. Kök, M.S. (2009): Application of Food Safety Management Systems (ISO 22000/ HACCP) in the Turkish Poultry Industry: A Comparison Based on Enterprise Size. *Journal of Food Protection* 72(10): 2221–2225.
23. Kovačević D. (2001): Kemija i tehnologija mesa i ribe. Sveučilište J.J. Strossmayera, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek
24. Kozačinski, L., Njari B., Cvrtila Fleck Ž., Smajlović M., Alagić D. (2009): Analiza rizika u proizvodnji slatkovodne ribe. *Meso* 11(6): 366-370.
25. Lu J., Pua X.-H., Liu C.-T., Chang C.-L., Cheng K.-C. (2014): The implementation of HACCP management system in a chocolate ice cream plant. *Journal of food and drug analysis* 22: 391-398.
26. Novaković B., Savanović D. (2017): The Application of HACCP concept in controlling microbiological hazards in the cheese production. *Quality of life*, 8(1-2):16-22.
27. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani. (2014): Službeni glasnik BiH, br. 68.
28. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijumima za hranu. (2013): Službeni glasnik BiH, br. 11.
29. Savanović D., Novaković B., Močević D. (2017): HACCP plan kao dio sistema upravljanja bezbjednošću hrane u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mlijeka. *Journal of engineering and processing management* 9 (1): 15–23.
30. Singh M. K. (2015): A Study on implementing Food Safety Management System in Bottling Plant. *Procedia - Social and Behavioral Sciences* 189: 433-441.
31. Smjernice o mikrobiološkim kriterijima za hranu. (2013): Agencija za bezbjednost hrane Bosne i Hercegovine, Mostar, BiH

32. Stanley R., Knight C., Bodnar F. (2011): Experiences and challenges in the development of an organic HACCP system. NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences 58:117-121.
33. Toldra F. (2002): Dry-cured meat products, Food and Nutrition Press, Trumbull, CT, USA.
34. Vodič o implementaciji HACCP principa kod određenih subjekata u poslovanju sa hranom. (2012): Agencija za bezbjednost hrane Bosne i Hercegovine, Mostar, BiH.

Rad primljen: 23.04.2018.

Rad prihvaćen: 31.10.2018.

DOI 10.7251/VETJ1802297M

UDK 633.88:658.562.6]:597.552.512

Original scientific paper

EFFECTIVENESS OF HACCP SYSTEM IN CONTROL OF MICROBIOLOGICAL HAZARDS IN THE PRODUCTION OF SMOKED TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)^{1*}

Snježana MANDIĆ¹, Danica SAVANOVIĆ^{1*}, Ana VELEMIR¹,
Vladimir MARJANOVIĆ²

¹ University of Banja Luka, Faculty of Technology, 78 000 Banja Luka, Repulic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

² Fishpond Janj d.o.o. 78 000 Banja Luka, Repulic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

* Corresponding author: Danica Savanović, E-mail: danica.savanovic@tf.unibl.org

Abstract: The paper describes the application of the HACCP system in the production process of cold smoked trout. The production of cold smoked trout fillets (*Oncorhynchus mykiss*) was analyzed from the standpoint of the safety of ready-to-eat products. The processing was observed and adapted in accordance with HACCP principles. In the presented model, three critical control points (CCP) for biological hazards were identified for which critical limits, monitoring, corrective measures and verification methods were defined. During the 12 months, the microbiological safety of 65 fresh trout samples and 195 samples of finished product, smoked trout was analyzed. The results of microbiological analyzes of fresh and smoked trout, during the examined period, were in accordance with the prescribed values, which confirms the efficiency of the application of the HACCP system in the production process of the smoked trout.

Key words: HACCP system, smoked trout, critical control point (CCP)

^{1*} Presented at the 23rd Annual Consulling of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (B&H).
Teslic, June 6-9, 2018

INTRODUCTION

The fish prepared by roasting or frying, preserved by marinating, salting, brining or drying, as well as smoking, has highly appreciated nutritive and sensory properties, which is an additional, determining factor for both consumers and fish producers. Fish preserved by salting, brining and smoking is a highly regarded gastronomic specialty. Smoking fish is usually carried out in two ways: cold smoking and hot smoking. Cold smoking is most often performed at a temperature of 30 ° C to 40 ° C, and hot smoking at 80 ° C to 90 ° C (Alam, 2007). Smoking affects the flavor and color of products and contributes to the preservation of the product due to the bactericidal and bacteriostatic effects of the smoke components as well as the antioxidant properties of phenols present in the smoke (Toldra, 2002, Bortolomeazzi et al. 2013). Therefore smoking is increasingly important in modern fish processing, and is a technological way of producing a distinctive flavor, color, aroma and texture of the final product. When it comes to food safety standards, cold-smoked fish is categorized as ready for consumption (RTE-as ready-to-eat.) Due to the fact that the product is not subjected to heat treatment and that no additives are usually added during production process, the basic, qualitative characteristics of the product are retained and, as such, it is defined as a product of exceptional quality.

Consumption of fishery products, as well as other food products, is associated

with certain biological and chemical risks. The most common chemical risks in the consumption of fish, crustaceans and shellfish are histamine and heavy metals (Alic et al., 2004; Bergman et al., 2015). Biological hazards include: parasites, microorganisms (bacteria, viruses) and toxins (Baltić et al., 2009). The degree of contamination of the fish depends on the environment and the bacteriological correctness of the water in which the fish is caught (Kožačinski et al., 2009).

Food business operators at the level of primary production are obliged to establish and implement regular controls of hygienic, health and technical conditions of production in each facility, by conducting self-control preventive procedures developed in accordance with good manufacturing practice. An integrated control system, HACCP system is used in the food production chain in order to avoid any potential chemical, physical and biological / microbiological hazards that can endanger the health of consumers. (Grujić i sar., 2003, Gramza-Michałowska and Korczak 2008, Kožačinski i sar., 2009; Savanović et al., 2017).

In food production HACCP proved to be a control system that gives good results (Lu & sar., 2014; Hung and sar, 2015; Novaković i Savanović, 2017). The introduction of the HACCP system enables enterprises to develop their own system of controlling the production and management of hygienically proper

and quality food, as well as to determine allowed permits and undertake corrective actions before the emergence of serious problems (Stanley et al., 2011; Hung and sar., 2015).

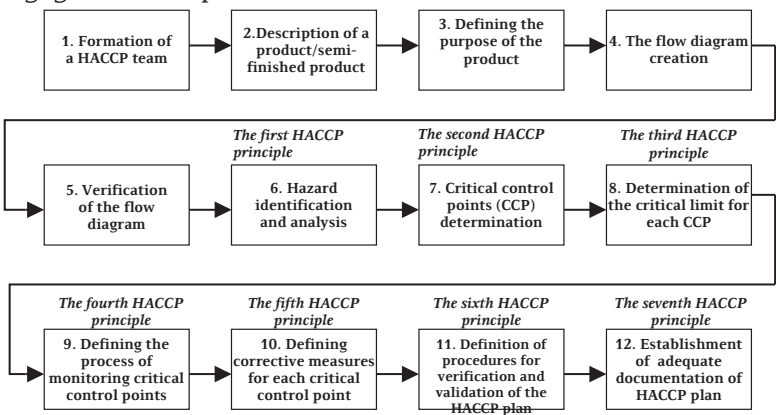
In fishponds with good manufacturing practice and all prerequisite programs, HACCP system implementation is recommended in order to produce quality and healthy fish (Kožačinski i sar., 2009). The HACCP system, which is science

based and systematic, identifies specific hazards and measures for their control which ensures the safety of food. (Jeličić et al., 2009; Singh, 2015; Savanović et al., 2017). The aim of this paper was to define critical control points (CCPs) and examine the effectiveness of the HACCP system in controlling microbiological hazards in the production of smoked trout (*Oncorhynchus Mykiss*).

MATERIAL AND METHODS OF WORK

The food safety management system in the process of smoked trout production was prepared according to the HACCP Codex Alimentarius Instruction (Annex CAC / RCP 1-1969. Rev.4 (2003)), while respecting certain recommendations (the Guidance document on the implementation of the HACCP principles in certain food businesses , 2012). After the application of prerequisite programs (ISO, 2009), a company engaged in the production of

smoked trout should develop a HACCP plan. The HACCP food safety system is based on seven basic principles, and the HACCP plan is implemented in twelve steps (Scheme 1). The basic postulates of the HACCP system were applied in all phases of the smoked trout production, in such a way that the risk analysis system at critical control points of production was gradually incorporated into the production process.



Scheme 1. The course of application of the HACCP system in the production of smoked trout

The microbiological quality of fresh and smoked trout is continuously monitored over a period of 12 months. 65 samples of fresh trout and 195 samples of smoked trout were analyzed. In the analyzed samples of fresh trout the presence of the following microorganisms was examined: *Salmonella* (BAS EN ISO 6579 / Cor2: 2010); *Listeria monocytogenes* (BAS EN ISO 11290-1 / A1: 2005); Sulfate-reducing bacteria (BAS ISO 15213: 2008); Coagulase positive staphylococci (BAS EN ISO

6888-1 / A1: 2005); *Enterobacteriaceae* (BAS ISO 21528-2: 2013). In the samples of smoked trout, the presence of the following microorganisms was examined: *Salmonella* (BAS EN ISO 6579 / Cor2: 2010); *Listeria monocytogenes* (BAS EN ISO 11290-1 / A1: 2005); Sulfate-reducing bacteria (BAS ISO 15213: 2008); Coagulase positive staphylococci (BAS EN ISO 6888-1 / A1: 2005); Aerobic mesophilic bacteria (BAS EN ISO 4833: 2006).

RESULTS AND DISCUSSION

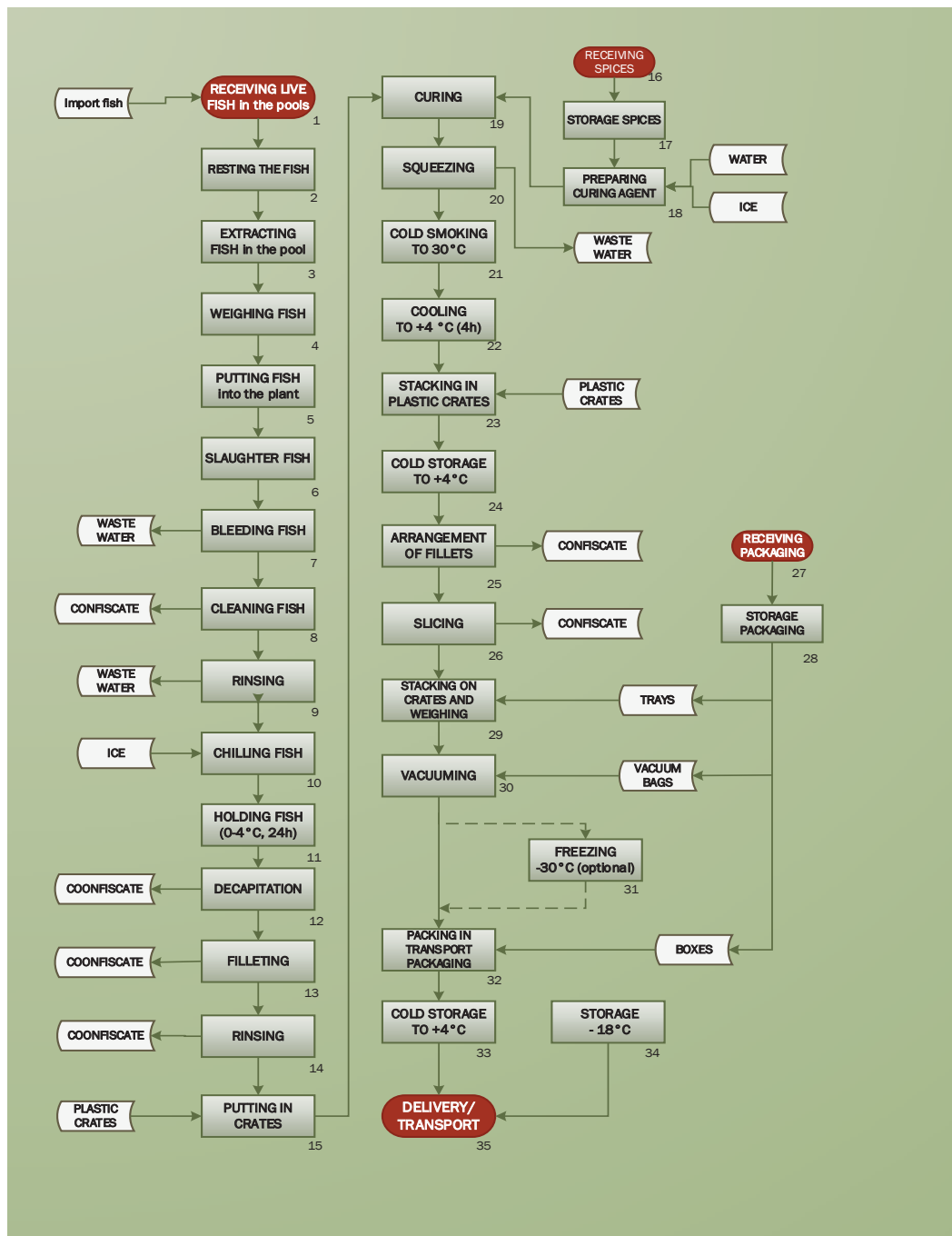
After the formation of the HACCP team, a product description is created. The HACCP team prepared the Product Description (Table 1) and the Flowchart for smoked trout production (Scheme

2), according to the principles of the HACCP system. The product description contains information regarding product safety (CAC / RCP 1-1969, Rev. 4-2003)

Table 1. Description of cold-smoked trout fillets

PRODUCT NAME	SMOKED TROUT
PRODUCT GROUP NAME	Vacuum-packed cold-smoked fish
INTENDED USE	For all consumer categories (except those with fish allergies); Product is ready to eat
INGREDIENTS	Rainbow trout fillet (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), salt, spices.
SENSORY PARAMETERS OF THE PRODUCT	Skin undamaged and of metallic glow. The meat does not show signs of drying (dehydration), has a characteristic color, smell and taste of smoked fish, it is dry and firm in consistency. Fillets do not contain residues of inedible parts (bones).
TECHNOLOGICAL PROCESS OF PRODUCTION	Trout is taken from out of the pool, the weight is measured, and then it is put into the processing plant. There the fish is slaughtered, eviscerated and washed and then filleted, immersed into brine and cold smoked. After smoking, the fillets are sliced, vacuumed and stored in the chamber until dispatch

PACKAGING	Primary packaging: vacuum bags, boxes. Transport packaging: cardboard box.
STORAGE CONDITIONS	Chambers with a temperature range of 0-4 °C or -18 °C.
TRANSPORT CONDITIONS	A vehicle equipped with a cooling system to achieve a transport temperature of 0-4 °C or -18 °C.
SHELF LIFE	30 days from the date of production for the product or 12 months for the frozen product.
LABELLING INSTRUCTIONS	No thermal treatment is required. Keep the product in the refrigerator and use it for up to 3 days after opening the package
CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PARAMETERS	# Allowed harmful substance content: - Pb max 0.3 mg/kg - Cd max 0.05 mg/kg - Hg max 0.5 mg/kg - As max 2,0 mg/kg - Sum of dioxin: max. 3.5 pg / g wet weight - Sum of dioxin and PCB: max 6,50 pg/g wet weight - Sum of PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180: max 75ng/g wet weight - benzo[a]pyrene max 2.0 µg/kg, - benzo[a]pyrene, benzo(a)antracen, benzo[b]fluoranthene and chrysene 12,0µg/kg - Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) 2,0µg/kg # the Ordinance on Maximum Permitted Quantities for Certain Contaminants in Food (Official Gazette BiH No.68/14) Microbiological criteria: - *<i>Salmonella</i> spp 0 u 25g - **<i>L. monocytogenes</i> 0 u 25 g - * sulphate-reducing Clostridium M=10 cfu/g - * coagulase positive staphylococci M=10 cfu/g - * aerobic mesophilic bacteria m=100 cfu/g do M=1000cfu/g * <i>Guidance on Microbiological Criteria for Food (BiH Food Safety Agency, 2013)</i> ** <i>Rulebook on microbiological criteria for foodstuffs („Official Gazette BiH“, No. 11/13)</i>



Scheme 2. Flowchart for cold smoked trout fillet

Proper application of the HACCP system requires scientifically documented procedures and preventive measures that exist, effectively applied to the established critical control points (CCPs). Determination of critical control points for the implementation of the HACCP system is possible for chemical, physical and biological hazards. According to the Guidance document on the implementation of the HACCP principles in certain food businesses from the receipt of the raw material to the final product on the market, including preparation, processing, packaging, storage and distribution should be analyzed in the given order . In order to

define hazards, it is necessary to list all those biological, chemical and physical hazards associated with the production process, which are the result of direct or indirect contamination. During the HACCP study for the production of smoked trout, a total of 47 hazards were analyzed, of which 30 were biological, 10 chemical and 7 physical hazards. By applying prerequisite programs (ISO, 2009) it is possible to eliminate 20 biological, 10 chemical and 7 physical hazards, ie a total of 37 hazards. At control points (CP) it is possible to eliminate 8 biological hazards, while 2 biological hazards are eliminated at critical control points (CCP) (Table 2).

Table 2. Overview of the hazards analyzed during the development of the HACCP study

Types of hazards	Number of analyzed hazards	Number of hazards eliminated by the application of pre-requisite programs	Number of hazards eliminated at CP	Number of hazards eliminated at CCP
Biological hazards	30	20	8	2
Chemical hazards	10	10	0	0
Physical hazards	7	7	0	0
Total	47	37	8	2

During the implementation of the hazard analysis phase, the HACCP team identified 8 control points (CP) and 2 critical control points (CCPs). The identified control points (CPs) are:

- preparation of brine;

- brining;
- cold smoke;
- storage of semi-finished product at +4 ° C;
- storage of finished product at +4 ° C;

- freezing;
- storage of frozen product at -18°C ;
- delivery and transport

Identified critical control points (CCPs) are:

- Storage of eviscerated and fresh chilled fish (keeping fish at $+4^{\circ}\text{C}$);
- Smoked fillet cooling.

With regular and continuous monitoring of all control points in

production, identified hazards and risks are eliminated before the emergence of a defective product, which is the key to successful implementation of the HACCP system. Critical control points are included in the HACCP plan and critical limits, monitoring methods, corrective measures and verification methods are defined. HACCP plans are extensive documents, which is why in this paper an excerpt of the most important elements for the identified CCPs (Tables 3 and 4) is given.

Table 3. Excerpt from the HACCP plan, related to CCP1

CP/CCP Process step	Hazard	Critical limit	Monitoring	Corrective measures	Verification
CCP 2 Storage of eviscerated and frozen fish	Biological: pathogenic microorganism	Temperature in refrigeration units must be $0-4^{\circ}\text{C}$	What: Temperature control in refrigeration units How: By reading from the thermometer display When: twice a day (at the beginning and at the end of the working day) Who: A member of the HACCP team responsible for controlling the temperature of refrigeration units Record: A report on room temperature	- In the event of a deviation, the HACCP team responsible for temperature control adjusts the temperature in the chamber (if possible). If the desired temperature can not be achieved, the product is transferred to another chamber or refrigerated car until the cause of the deviation is eliminated. - The leader of the HACCP team identifies the cause of the deviation and establishes measures to prevent repetition of deviations. - If the cause of the deviation is the failure of the equipment, the maintenance service is contacted. The preventive maintenance plan will be reviewed and, if necessary, changed - The head of the HACCP team makes an assessment of the product's usefulness based on changes in product temperature and time spent at elevated temperature, and makes a decision about further treatment - The implemented corrective measure is recorded in the prepared form.	- The temperature of the cooling chambers is automatically read and recorded on the computer. - The HACCP team's head is checking the temperature records. - The absence of the identified hazard is confirmed by laboratory analysis, according to the sampling plan.

Table 4. Excerpt from the HACCP plan, relating to CCP2

CP/CCP Process step	Hazard	Critical limit	Monitoring	Corrective measures	Verification
CCP 2 Cooling of a smoked fillet	Biological: pathogenic microorganism	<i>Temperature in refrigeration units must be 0-4 oC</i>	What: Temperature control in refrigeration units How: By reading from the thermometer display When: twice a day (at the beginning and at the end of the working day) Who: A member of the HACCP team responsible for controlling the temperature of refrigeration units Record: A report on room temperature	- In the event of a deviation, the HACCP team responsible for temperature control adjusts the temperature in the chamber (if possible). If the desired temperature can not be achieved, the product is transferred to another chamber or refrigerated car until the cause of the deviation is eliminated. - The leader of the HACCP team identifies the cause of the deviation and establishes measures to prevent repetition of deviations. -If the cause of the deviation is the failure of the equipment, the maintenance service is contacted. The preventive maintenance plan will be reviewed and, if necessary, changed - The head of the HACCP team makes an assessment of the product's usefulness based on changes in product temperature and time spent at elevated temperature, and makes a decision about further treatment -The implemented corrective measure is recorded in the prepared form.	-The temperature of the cooling chambers is automatically read and recorded on the computer. - The HACCP team's head is checking the temperature records. - The absence of the identified hazard is confirmed by laboratory analysis, according to the sampling plan.

Microbiological contamination of food products is a major obstacle to food security (Dutta et al., 2017). Some of the advantages of the HACCP system over traditional food control systems are that the control parameters are easily monitored, the work is controlled on the spot, which can identify and eliminate the existing and predicted hazards, thus ensuring health in the product stage, and corrective measures are

implemented proactively ie before the emergence of more difficult problems (Jeličić et al., 2009). In order to analyze the efficiency of HACCP implementation in the process of production of smoked trout, certain microbiological analyzes of starting material and finished product were performed during 12 months of production. The obtained results are shown in Table 5 and Table 6.

Table 5. Results of microbiological analysis of fresh trout

Sample	Microorganisms	Number of analyzed samples	UM	Prescribed value	Established value
Fresh trout	<i>Salmonella</i>	20	u 25g	Not allowed	Not isolated
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	u 25g	Not allowed	Not isolated
	<i>Sulfate-reducing anaerobic bacteria</i>	15	cfu/g	m=100 M=1000	<100
	Coagulase positive staphylococci	5	cfu/g	m=10 M=100	<10
	<i>Enterobacteriaceae</i>	20	cfu/g	m=100 M=1000	<100

m - limit value - the results are considered satisfactory if all the values obtained are less than or equal to "m"

M- the maximum allowable value beyond which the results are considered unsatisfactory; JM- unit of measure

Table 6. Results of microbiological analysis of smoked trout

Sample	Microorganisms	Number of analyzed samples	UM	Prescribed value	Established value
Smoked trout	<i>Salmonella</i>	60	u 25g	Not allowed	Not isolated
	<i>Listeria monocytogenes</i>	60	u 25g	Not allowed	Not isolated
	<i>Sulfate-reducing anaerobic bacteria</i>	50	cfu/g	M=10	<10
	Coagulase positive staphylococci	15	cfu/g	M=10	<10
	Aerobic mesophilic bacteria	10	cfu/g	m=100 M=1000	<100

m - limit value - the results are considered satisfactory if all the values obtained are less than or equal to "m"

M- the maximum allowable value beyond which the results are considered unsatisfactory; UM- unit of measure

The results of microbiological analysis of fresh and smoked trout samples indicate the absence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in all examined samples during the examined period. The number of sulfate-reducing bacteria, coagulase positive staphylococci, enterobacteriaceae and the number of aerobic mesophilic bacteria was in accordance with the values prescribed by the Rulebook on Microbiological Criteria for Food (Official Gazette of BiH, No. 11/13) and the Guidance on Microbiological Criteria for Food (BiH Food Safety Agency, 2013. Microbiological contamination of smoked fish can be caused by several factors such as faults during the smoking process or inadequately conducted smoking phase, poor hygiene conditions, the use of inadequate packaging, and the use of inadequate processing

plants, etc. (Adegunwa et al., 2013). In order to provide a microbiologically correct and safe product that meets the quality requirements, the smoking process must be carried out under strictly controlled conditions and in production facilities with a high level of hygiene. Numerous authors in their research (Kök, 2009; Kafetzopoulos, 2013; Novakovic and Savanovic, 2017) unambiguously confirm that the application of the HACCP Food Safety System is scientifically and practically justified and legally binding for most business entities in food business. Based on the results of the microbiological examinations presented in this paper it is evident that there was no deviation from the prescribed values during the observed period and that this aspect of the HACCP plan was successfully tested.

CONCLUSION

This paper presents the HACCP concept in order to ensure safety at all stages of the production of smoked trout and to obtain a microbiologically correct product. By conducting the Hazard Analysis phase, 8 control points (CPs) and 2 critical control points (CCPs) were identified. Identified control points (CP) are: - preparation of brine, brining, cold smoking, storage of semi-finished

product at +4 ° C, storage of finished product at +4 ° C, freezing, storage the frozen product at -18 ° C, delivery and transport. The identified critical control points (CCPs) are: storage of eviscerated and fresh chilled fish (keeping at + 4 ° C) and cooling of smoked fillet. The results of this paper confirm that the HACCP plan is part of a food safety management system in the production

of smoked trout. The results of the microbiological analysis of basic raw materials and finished products have not shown any deviations from the defined

criteria, which confirms the efficiency of the application of the HACCP system in smoked trout production.

LITERATURE

1. Adegunwa, M.O, Adebowale, A.A, Olisa, Z.G and Bakare, H.A. (2013): Chemical and microbiological qualities of smoked herring (*sardinella eba*, valenciennes 1847) in Odeda, Ogun state, Nigeria. International Journal of Microbiology Research and Reviews 1(5): 085-087.
2. Akintola S. L., Brown A., Bakare A., Osowo O. D., Bello B. O. (2013): Effects of Hot Smoking and Sun Drying Processes on Nutritional Composition of Giant Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*, Fabricius, 1798). Pol. J. Food Nutr. Sci. 63(4): 227-237.
3. Alam N.A.K.M. (2007): Participatory Training of Trainers: A New Approach Applied in the fish processing. Bangladesh Fisheries Research Forum, Bangladesh.
4. Alić B., Milanović A., Čaklović F., Saračević L. (2004): Sadržaj bakra, cinka, kadmija, olova i žive u mišićnom tkivu pastrva (*Salmo Trutta M. Fario L.*) i škobalja (*Chondrostoma Nasus L.*) izlovljenih iz Une, Vrbasa i Drine. Meso 6(3): 40-46.
5. Baltić M. Ž., Kilibarda N., Teodorović V., Dimitrijević M. Karabasil N., Dokmanović M. (2009): Potencijalne biološke opasnosti od značaja za HACCP planove u procesu obrade sveže ribe. Vet. glasnik 63(3-4): 201- 213.
6. BAS EN ISO 6888-1/A1:2005 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za brojanje koagulasa pozitivnih stafilokoka *Staphylococcus aureus* i druge vrste) - Dio1: Tehnika korišćenja Baird-Parker agar medija - Amandman 1: Uključivanje preciznosti podataka. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
7. BAS EN ISO 4833:2006 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -Horizontalni metod za brojanje mikroorganizama - Tehnika brojanja kolonija na 30 °C. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
8. BAS ISO 15213:2008 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za brojanje sulfitoreredukujućih bakterija koje rastu pri anaerobnim uslovima. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
9. BAS EN ISO 11290-1/A1:2005 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za detekciju i brojanje *Listeria monocytogenes* - Dio 1: Metoda detekcije - Amandman 1: Modifikacija izolacije medija i test hemolize i uključenje preciznosti podataka. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.

10. BAS ISO 21528-2:2013 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za detekciju i određivanje broja Enterobacteriaceae — Dio 2: Metoda brojanja kolonija. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
11. BAS EN ISO 6579/Cor2:2010 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za detekciju *Salmonella* spp. Institut za standardizaciju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina.
12. Bergman, T., Cvrtila Fleck Ž., Njari B., Kozačinski L. (2015): Rizični čimbenici koji nastaju konzumacijom sirove ribe i školjkaša. *Meso* 1: 65-71.
13. Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R., Pizzariello A. (2007): Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. *Food Chemistry* 100: 1481–1489.
14. CAC (WHO/FAO). (2003): The Codex General principles of food hygiene, Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP Systems and Guidelines for its application, *Annex to CAC/RCP 1-1969 (Rev. 4 - 2003)*.www.codexalimentarius.net
15. Dutta M., Majumdar P. R., Rakeb-UI-Islam Md., Saha D. (2017): Bacterial and Fungal Population Assessment in Smoked Fish during Storage Period. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene* , 3(1): 1-7.
16. Gramza-Michałowska A., Korczak J. (2008): Vegetable products as HACCP system subject In modern gastronomy. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 7(3): 47-53.
17. Grujić R., Sanchis V.-A., Radovanović R. (2003): HACCP – teorija i praksa. University of Leida, Spain/University, Banja Luka.
18. Hung Y.-T., Liu C.-T., Peng I.-C., Hsu C., Yu, R.-C. Cheng K.-C. (2015): The implementation of a Hazard Analysis and Critical Control Point management system in a peanut butter ice cream plant. *Journal of food and drug analysis* 23, 509-515.
19. ISO (International Organisation for Standardisation). (2009): Prerequisite programmes on food safety – Part 1: Food manufacturing (ISO/TS 22002-1:2009).
20. Jeličić I., Božanić R., Krčmar N. (2009): Primjena HACCP sustava u proizvodnji UHT steriliziranog mlijeka. *Mljekarstvo* 59 (2):155-175.
21. Kafetzopoulos, D.P., Psomas, E.L., Kafetzopoulos, P.D. (2013): Measuring the effectiveness of the HACCP Food Safety Management System. *Food Control* 33(2): 505 – 513.
22. Kök, M.S. (2009): Application of Food Safety Management Systems (ISO 22000/ HACCP) in the Turkish Poultry Industry: A Comparison Based on Enterprise Size. *Journal of Food Protection* 72(10): 2221–2225.
23. Kovačević D. (2001): Kemija i tehnologija mesa i ribe. Sveučilište J.J. Strossmayera, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek

24. Kozačinski, L., Njari B., Cvrtila Fleck Ž., Smajlović M., Alagić D. (2009): Analiza rizika u proizvodnji slatkovodne ribe. *Meso* 11(6): 366-370.
25. Lu J., Pua X.-H., Liu C.-T., Chang C.-L., Cheng K.-C. (2014): The implementation of HACCP management system in a chocolate ice cream plant. *Journal of food and drug analysis* 22: 391-398.
26. Novaković B., Savanović D. (2017): The Application of HACCP concept in controlling microbiological hazards in the cheese production. *Quality of life*, 8(1-2):16-22.
27. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani. (2014): Službeni glasnik BiH, br. 68.
28. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijumima za hranu. (2013): Službeni glasnik BiH, br. 11.
29. Savanović D., Novaković B., Močević D. (2017): HACCP plan kao dio sistema upravljanja bezbjednošću hrane u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mlijeka. *Journal of engineering and processing management* 9 (1): 15–23.
30. Singh M. K. (2015): A Study on implementing Food Safety Management System in Bottling Plant. *Procedia - Social and Behavioral Sciences* 189: 433-441.
31. Smjernice o mikrobiološkim kriterijima za hranu. (2013): Agencija za bezbjednost hrane Bosne i Hercegovine, Mostar, BiH
32. Stanley R., Knight C., Bodnar F. (2011): Experiences and challenges in the development of an organic HACCP system. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* 58:117-121.
33. Toldra F. (2002): *Dry-cured meat products*, Food and Nutrition Press, Trumbull, CT, USA.
34. Vodič o implementaciji HACCP principa kod određenih subjekata u poslovanju sa hranom. (2012): Agencija za bezbjednost hrane Bosne i Hercegovine, Mostar, BiH.

Paper received: 23.04.2018.

Paper accepted: 31.10.2018.

DOI 10.7251/VETJ1802326P

UDK 639.3.043.2:597.551.2

Originalni naučni rad

HISTOLOŠKE KARAKTERISTIKE OVARIJA KALIFORNIJSKE PASTRMKE *ONCORHYNCHUS* *MYKISS* (WALBAUM, 1792) UZGAJANE U RAZLIČITIM MIKROAMBIJENTALNIM UVJETIMA^{1*}

Selma PILIĆ¹, Nadžida MLAČO^{2*}, Amela KATICA², Velija KATICA², Indira MUJEZINOVIĆ², Jasmin KATICA²

¹Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Bosna i Hercegovina

²Veterinarski fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Bosna i Hercegovina

* Korespondentni autor: nadzida.mlaco@yahoo.com

Kratak sadržaj: Akvakultura kao poljoprivredna djelatnost u našoj zemlji je u stanju proizvoditi velike količine ribe različitih vrsta i kategorija. Klimatske i geografske karakteristike naše zemlje, njen reljef i razvoj poljoprivredne proizvodnje kao i poštovanje principa „održivog razvoja”, mjesta i značaja ribarstva u višenamjenskom korišćenju voda, moraju da određuju pravac razvoja proizvodnje pastrmki u budućnosti. Najvažnija riblja vrsta koja se uzgaja u pastrmskim ribnjacima kod nas je kalifornijska pastrmka, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Osim što je gajenje ove vrste ribe privlačno za veliki broj proizvođača, s obzirom na mogućnost postizanja visokih prinosa, nju odlikuje i značajna tolerantnost na variranja mikroambijentalnih uvjeta okoliša. S obzirom za značaj proizvodnje ribe u Bosni i Hercegovini, koja je jedna od rijetkih grana prehrambenog sektora koja je uspjela ispuniti međunarodne standarde i postavljene kriterije te osigurati izlazak na tržište zemalja Europske unije, neophodno je ustanoviti optimalne uslove koji obezbjeđuju visoku produktivnost salmonidnog gospodarstva. Proučavanje reproduktivnog ciklusa može dati vrlo precizne i značajne rezultate o stanju organizma za vrijeme ovog vrlo složenog fiziološkog procesa, kao i populacije u datom ekosistemu.

Ključne riječi: kalifornijska pastrmka (*Oncorhynchus mykiss*), gonade, mikroklimatski uvjeti

^{1*} Презентован на 23. Годишњем савјетовању доктора ветеринарске медицине Републике Српске (БиХ). Теслић, 6-9- јуна 2018.

UVOD

Poznata je činjenica da ribarstvo u našem regionu ima dugu i uspješnu tradiciju koja se već gotovo vijek potvrđuje kroz čitav niz naučnih i stručnih radova eminentnih stručnjaka sa ovih prostora koji zauzimaju značajno mjesto u ovoj oblasti u svijetu, uspješno realiziranih projekata lokalnog i svjetskog karaktera, vrhunskih slatkovodnih i morskih ribogojilišta i pogona za preradu ribe i ribljih proizvoda. Neizostavno treba napomenuti veliki broj endemskih ribljih vrsta i što je možda najvažnije, možemo slobodno reći, neiscrpnih prirodnih resursa visokokvalitetne riječne, jezerske, pa i morske vode. Pravilan izbor matičnog materijala u intenzivnom uzgoju kalifornijske pastrmke osigurava visoke proizvodne parametre potomstva (Korjenić, 2010). Za intenzivnu proizvodnju kalifornijske pastrmke (*Oncorhynchus mykiss*) potrebno je zadovoljiti i niz faktora koji trebaju omogućiti najpovoljnije uslove za život i brzi rast riblje populacije, odnosno doprinijeti što bržem ostvarivanju planirane proizvodnje i plasiranju finalnog proizvoda za tržište. Proizvođači moraju obezbijediti prije svega što kvalitetniji genetički potencijal riba, kvalitetne vrste hrane prema uzrasnim kategorija-

ma, zdravstveni veterinarski nadzor i fizičko-hemijske parametre kvaliteta vode od kojih su najbitniji: dovoljna količina vode kojom se ribogojilište snadbijeva, temperatura vode, koncentracija rastvorenog kiseonika u vodi i pH vrijednost vode (Aganović, 1979; Treer i sar, 2001; Ćuk i sar, 2006; Katavić, 2009). Neznatne promjene uslova držanja i ishrane remete iskorištavanje biološkog potencijala riba, a preko određenih granica ugrožavaju fiziološke funkcije, odnosno vode do poremećaja zdravstvenog stanja organizma (Jeremić i sar, 2004). Među najvažnije vanjske faktore u kontroli reprodukcije ubrajamo: temperaturu i kvalitet vode, sadržaj otopljenog kiseonika, svjetlosni režim, fotoperiod, prisutnost specifičnog supstrata za razmnožavanje, strujanje vode, plima, godišnji ciklusi, ishrana, pa do moguće intervencije čovjeka kroz aplikaciju hormona kojim se podstiče mrijest (Sofradžija, 2009; Suljević, 2012).

Našim istraživanjima pokušali smo spoznati koliki utjecaj imaju različiti mikroambijetalni uvjeti na, intenzitet oogeneze i histološku sliku jajnika kalifornijske pastrmke.

MATERIJAL I METODE RADA

Istraživanje histoloških karakteristika gonada kalifornijske pastrmke iz tri bosanskohercegovačka ribogojilišta koji pripadaju različitim slivovima obuhvatala su rad na terenu i laboratorijske analize.

Materijal za naša istraživanja uzorkovali smo iz tri bosanskohercegovačka ribogojilišta: Royal-fish smještenom na Jablaničkom jezeru (Donja Jablanica), hidroakumulaciji rijeke Neretve,

Magazin MAPRIM smještenom na toku Ramičkog potoka (Pazarić-Resnik) koji se ulijeva u rijeku Bosnu te Eko-projekt smještenom na toku rijeke Krupice (Jeleć-Miljevinina) koja se zajedno sa Govzom ulijeva u Bistricu, a zatim u Drinu. U toku istraživanja uzeta je u obzir temperatura vode u (°C), nadmorska visina, pH vrijednost i zasićenost kiseonikom. Za histološku studiju gonada uzorkovano je 24 spolno zrelih jedinki u dobi od dvije do pet godina.

Gonade su posebno odvajane u etiketirane plastične boce i fiksirane pomoću 10% formaldehida te dopremljene do laboratorija gdje je vršena njihova dalja analiza i priprema histoloških preparata.

Postupak prije kalupljenja podrazumjeva je prethodnu dehidraciju uzoraka provlačeći ih kroz niz alkohola rastuće koncentracije. Uzorci su prvo stavljani u 70% alkohol u trajanju od dva dana, zatim prebačeni u 96% alkohol jedan dan i na koncu u 100% alkohol takođe jedan dan. Poslije ovog postupka uzorci su prebačeni u mješavinu 100% alkohola i toluola na dva sata, a nakon toga samo u toluol još četiri sata. Tako pripremljeni uzorci ostavljeni su u parafin pet sati, a zatim ponovno u dvanaest sati. Time je postupak kalupljenja u parafinske blokove bio završen. Postupak obrade uzoraka od fiksacije do kaluplje-

na u parafin rađen je na rotacionom tkivnom procesoru marke MICROM model STP-120. Nakon završenog procesa kalupljenja uzorci su rezani digitalnim mikrotomom marke LEICA RM 2145 u više serijskih rezova debljine 0,5 do 1,5 mikrometara. Ukupno je izrađeno 400 preparata od 80 uzoraka (40 lijevih i 40 desnih spolnih žlijezda). Rezove smo postavljali na predmetna stakla i deparafinirali provlačeći ih kroz niz alkohola opadajuće koncentracije. Nakon toga, rezovi su bojeni hematoksilin-eozinom, pokriveni pokrovnim stakalcem, te učvršćeni Canada balsamom.

Mikroskopski preparati su izrađivani i analizirani u laboratoriji za Histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta u Sarajevu od januara 2013. do jula 2014. godine.

Deskripciju histoloških preparata vršili smo svjetlosnim mikroskopom opremljenim sa kamerom marke MOTIC TYPE 102M pod uvećanjem 100, 200 i 400x. Provedene analize histoloških struktura su izvršene primjenom posebnog programa Motic Images Plus 2.0 ML.

Mikroskopskim istraživanjem obuhvatili smo analizu spolnih žlijezda ženki u periodu mrijesta prateći razvojne faze i stepen sazrijevanja na različitim ribogojilištima.

REZULTATI

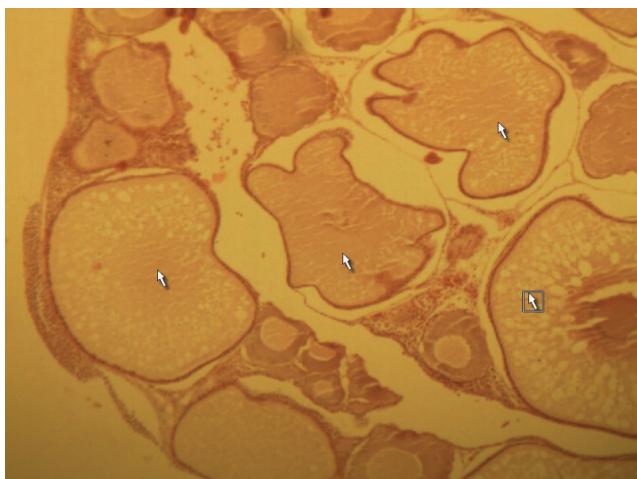
Na ribogojilištu Eko-projekt smještenom na nadmorskoj visini od 760 m, temperatura vode u momentu uzorkovanja je iznosila 7 °C. Konstatovana je pH vrijednost vode od 7,8, a rastvorljivost kiseonika u vodi iznosila je 10,5 mg/l.

U Magazin MAPRIM ribogojilištu, koje se nalazi na nadmorskoj visini od 653 m, očitane su vrijednosti temperature vode od 11 °C, pH od 8,3, te rastvorljivost kiseonika od 10 mg/l.

Izmjerena temperatura vode na ribogojilištu Royal-fish, smještenom na nadmorskoj visini od 202 m, iznosila je 8 °C. Utvrđena je pH vrijednost vode od 8,15,

a rastvorljivost kiseonika iznosila je 8,27 mg/l.

Na istraživanim histološkim preparatima ovarija jedinki iz Royal fish ribogojilišta, možemo konstatovati da je uočljivo i prisustvo folikula nakon ovulacije, međutim, u znatno manjem obimu nego kod ovarija jedinki iz drugih ribogojilišta. Postovulatorne folikule karakteriše prisustvo granulosa, teka luteinskih stanica, degradiranog folikula i krvnih kapilara sa slobodnim eritrocitima, ovalnog izgleda i jasno uočljivih bazofilnih jedara (Slika 1).

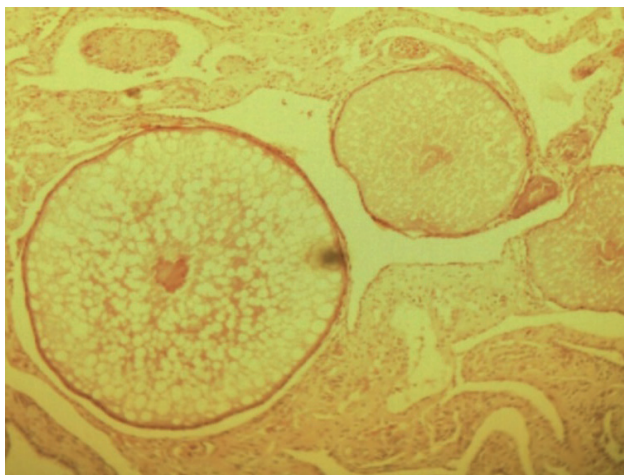


Slika1. Vitellogena faza: bijele strelice označavaju sekundarne i tercijarne razvojne oblike oocita (HE X 200)

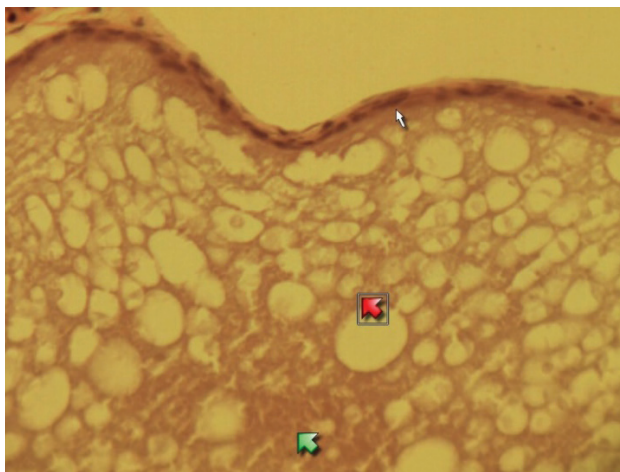
Posebnu pažnju naših istraživanja privukli su histološki preparati ovarija jedinki uzgajanih na ribogojilištu Eko-projekt (lokalitet Jeleć-Miljevina). Naime, histološka istraživanja uzoraka

prikupljenih iz ovog ribogojilišta pokazivala su različitost histološkog nalaza, što se očitovalo, općenito, u generalnoj slici ovarija (Slika 2). Parenhim ovarija je obilovao oocitima

u fazi prematuracije, maturacije i mnoštvom postovulatornih folikula. Nakon detaljne histološke analize, uočili smo dosta vitelogenih oocita iznimno velikih dimenzija, ispunjenih žumančanim granulama i masnim vakuolama (Slika3). Na površini ovih folikula bila je jasno očuvana zona radijata.



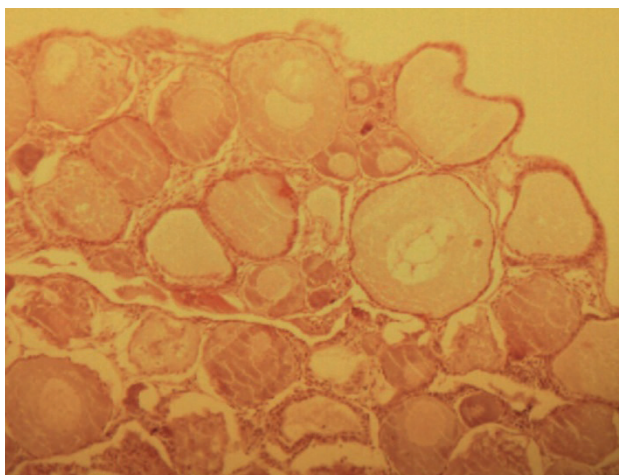
Slika 2 . Generalna slika ovarija u vrijeme mrijesta: mnoštvo velikih vitelogenih oocita (HE X 200)



Slika3. Sekundarna žumančana oocita: bijela strelica označava zonu radijatu; zelena strelica označava žumančane granule; crvena strelica označava vakuole (HE X 400)

Ambijentalni uvjeti su vjerovatno pogodovali ovakvoj slici intenziteta oogeneze. Možemo konstatovati da je oogeneza jedinki sa ovog ribnjaka u poređenju sa druga dva ribogojilišta, u istom periodu godine, u mjesecu novembru, bila na samom vrhuncu s obzirom na znatno prisustvo maturiranih oocita. Ribe iz ribogojilišta Eko-projekt (lokalitet Jelec-Miljevina) su uzgajane u betonskim bazenima sa protočnom izvorskom vodom.

Iako su histološke analize jajnika kalifornijske pastrmke izlovljene na različitim lokalitetima, pokazivale izvjesne razlike u građi i prisustvu razvojnih oblika oocita, možemo reći da su jajnici jedinki uzorkovanih iz ribogojilišta Magazin MAPRIM (lokalitet Ramički potok-Pazarić) pokazivali različitosti u histološkoj slici ovariaja. Desne, ali i lijeve gonade obilovale su još uvijek nezrelim razvojnim oblicima oocita (Slika 4).



Slika 4. Generalna slika ovarija u vrijeme mrijesta jedinki uzorkovanih sa ribogojilišta Magazin MAPRIM (HE X 200)

Ribe u ribogojilištu Magazin MAPRIM su uzgajane u betonskim bazenima.

DISKUSIJA

U literaturi se mogu naći podaci da na reproduktivni ciklus kalifornijske pastrmke snažno utiču fotoperiod i drugi ekološki faktori te njihovom manipulacijom može se diktirati vrijeme mrijesta (Randall, 2001).

Variranja ekoloških faktora značajno

utiču na rast i vremenski interval razvoja gonada kod riba (Ekanem i sar, 2013). Morfološki opis i detaljnu deskripciju jajnika kalifornijske pastrmke izložili su u svojoj studiji (Grier i sar 2007). Fotoperiod i temperatura imaju različit učinak na različite vrste riba.

Djelovanjem različitih temperatura vode na kalifornijsku pastrmku rezultira različitim vremenom mriješta i veličinom jaja (Pornsoping i sar, 2007), čime možemo objasniti i rezultate naše histološke deskripcije ovarija. Iako su rezultati provedenih mjerenja pokazali različite fizičko-hemijske parametre vode na sva tri bosanskohercegovačka ribogojilišta, literaturni izvori potvrđuju da su oni bili u fiziološkim granicama koje zahtijeva kalifornijska pastrmka u intenzivnom uzgoju (Ćuk i sar, 2006; Vranić i sar, 2011; Marković & Mitrović-Tutundžić, 2003; Marković i sar, 2006)

što je u skladu sa našom histološkom deskripcijom ovarija. U tehnologiji uzgoja kalifornijske pastrmke neophodno je da se obezbijede elementarni uslovi: čista voda sa ispunjenim zahtjevima za sadržajem kiseonika (9-11 mg/l), odgovarajuća temperatura (8-12 °C), pH vrijednost (6,5–8,5) i dovoljan protok vode te sistemska ishrana različitim vrstama industrijske i prirodne hrane (Ćuk i sar, 2006; Marković i sar, 2006; Vranić i sar, 2011) što, okvirno, zadovoljavaju ribnjaci koji su bili predmet naših istraživanja.

ZAKLJUČCI

Histološkom analizom ovarija kalifornijske pastrmke uzorkovane na različitim ribogojilištima koje karakterišu različiti ambijentalni-mikroambijetalni uvjeti, utvrdili smo da je oogeneza najvećeg intenziteta bila kod uzoraka iz

ribogojilišta Eko-projekt, lokalitet Jelec - Miljevina (bazenski sistem uzgoja sa protočnom vodom, nadmorska visina 760 m, temperaturom vode 7 °C, pH od 7,8, rastvorljivosti kiseonika 10,5 mg/l).

LITERATURA

1. Aganović M. (1979): Salmonidne vrste riba i njihov uzgoj. Igkro „Svjetlost“ OOUR, Sarajevo
2. Ćuk D., Marković Z., Grubić G. (2006): Uticaj različitog sadržaja masti u dve smeše koncentrata na prirast kalifornijske pastrmke (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) u kaveznom sistemu gajenja. *Biotechnology in animal husbandry*, 22: 351-358.
3. Ekanem A.P., Eyo V.O., James P., Udoh U., Nsisong E. (2013): Effects of Unical Feed on Fecundity and Gonad Development of *Clarias gariepinus*; A Comparative Study with Coppens Commercial Feed in Erthen Pond. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 2(10):8-14.
4. Grier H.J., Uribe M.C., Parenti L.R. (2007): Germinal Epithelium, Folliculogenesis, and Postovulatory Follicles in Ovaries of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Morphology*, 268:293-310.

5. Jeremić S., Radosavljević V., Ćirković M., Jakić-Dimić D. (2004): Aktuelna bakterijska oboljenja slatkovodnih riba. Zbornik kratkih sadržaja „VI Simpozijum o ribarstvu Srbije i Crne Gore sa međunarodnim učešćem”, 46.
6. Katavić I. (2009): Okolišni aspekti akvakulture s posebnim osvrtom na organski otpad i prihvatni kapacitet uzgajališta. Uzgoj slatkovodne ribe, stanje i perspektive zbornik radova, Hrvatska gospodarska komora, Sektor za poljoprivredu, prehrambenu industriju i šumarstvo. Udruženje ribarstva i prerade ribe, Zagreb.
7. Korjenić E. (2010): Salmonikultura. Autorizovana skripta sa radnom sveskom. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu.
8. Marković Z., Mitrović-Tutundžić V. (2003): Gajenje riba, Zadužbina Andrejević, Beograd.
9. Marković Z., Poleksić V., Dulić Z. (2006): Optimalna koncentracija kiseonika u vodi pastrmskih ribnjaka-preduslov dobre proizvodnje. *Biotehnologija u stočarstvu*, 22: 103-112.
10. Sofradžija A.(2009): Slatkovodne ribe Bosne i Hercegovine. Bemust Sarajevo.
11. Suljević D. (2012): Biohemijski status vrsta *Salmo trutta fario* (Linnaeus, 1758) i *Salmo farioide* (Karaman, 1938) tokom i nakon mriješta u Centru za ribarstvo Neretva-Konjic. Doktorska disertacija.
12. Pornsoping P., Unsrisong G., Vearsalip T., Wessels S., Horsteng-Schwark G. (2007): Reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum) kept under water temperatures and photoperiods of 131 and 511N latitude. *Aquaculture Reserach*, 38(12):1265-1273.
13. Randall C. (2001): Photoperiod effects on reproduction and growth in rainbow trout. *Trout News*, 32: 12-16.
14. Treer T., Safner R., Aničić I. (2001): Modeli malih obiteljskih ribnjaka. Hrvatski zadružni savez. Zagreb.
15. Vranić D., Đinović-Stojanović J., Spirić A. (2011): Kalifornijska pastrmka (*Oncorhynchus mykiss*) iz akvakulture-kvalitet mesa i značaj u ishrani. *Tehnologija mesa*, 52(1): 122-133.

Rad primljen: 10.09.2018.

Rad prihvaćen: 15.10.2018.

DOI 10.7251/VETJEN1802326P

UDK 639.3.043.2:597.551.2

Original scientific paper

HISTOLOGICAL CHARACTERISTIC FEATURES OF THE RAINBOW TROUT *ONCORHYNCHUS MYKISS* OVARIES (WALBAUM, 1792) GROWN IN VARIOUS MICROAMBIENT CONDITIONS^{1*}

Selma PILIĆ¹, Nadžida MLAČO^{2*}, Amela KATICA², Velija KATICA², Indira MUJEZINOVIC², Jasmin KATICA²

¹Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

²Veterinary Faculty, University of Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

* Corresponding author: nadzida.mlaco@yahoo.com

Abstract: Aquaculture as an agricultural activity in our country is capable of producing large amounts of different types and categories of fish. Climate and geographic characteristics of our country, the terrain and development of agricultural production as well as compliance with the principle of “sustainable development”, the position and importance of fishery in a multipurpose water utilization, must determine the direction of development of the future trout production. The most important type of fish grown in the trout fisheries in BiH is the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). In addition to the fact that growing this type of fish is attractive to many producers, considering the high yield potential, it is also characterized by a significant level of tolerance to varying microambient conditions of the environment. Given the importance of fish production in Bosnia and Herzegovina, which is one of the rare branches of food sector that has fulfilled the international standards and criteria and secured access to the markets of the EU countries, it is necessary to establish optimal conditions to ensure high productivity of salmonid fisheries. Studying the reproductive cycles can provide very precise and significant results of the overall condition of the entire organism during this very complex physiological process and of the overall population in the respective ecosystem.

Key words: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gonads, microclimate conditions

^{1*} Presented at the 23rd Annual Consulting of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (B&H).
Teslic, June 6-9, 2018

INTRODUCTION

It is known that fishery in our region has a long and successful tradition for almost a century which has been confirmed by a number of scientific and expert papers of eminent experts from this area who occupy a significant place in this field in the world and also by successfully implemented projects of local and global character, freshwater and marine fish farming and processing plants for fish and fish products. Also a large number of endemic fish species and inexhaustible natural resources of high quality river, lake and sea water have to be mentioned. Proper selection of native material in the intensive Rainbow trout farming ensures high production parameters of offspring (Korjenić, 2010). When it comes to intensive production of California trout (*Oncorhynchus mykiss*) it is necessary to satisfy a number of factors that should provide the most favorable conditions for living and rapid growth of the fish population, or contribute to the faster realization of the planned production and marketing of the final product for the market. Above all producers must ensure the quality of the genetic potential of fish, quality foods by age categories, health veterinary supervision and

physico-chemical parameters of water quality, of which the following are the most important ones: sufficient amount of water supplying the fish farm, water temperature, concentration of dissolved oxygen in water and pH value of water (Aganović, 1979; Treer i sar, 2001; Ćuk i sar, 2006; Katavić, 2009). The insignificant changes in the conditions of keeping and nutrition disturb the exploitation of the biological potential of the fish, and over certain limits it endangers the physiological functions which can lead to a disorder of the health condition of the organism (Jeremić et al., 2004). Among the most important external factors in the control of reproduction are: temperature and water quality, dissolved oxygen content, light regime, photoperiod, presence of specific propagation substrate, water flow, tide, annual cycles, nutrition, and possible human intervention through hormone application to stimulate spawning (Sofradžija, 2009; Suljević, 2012). Our research attempted to find out the impact of different micro-ambient conditions on the intensity of oogenesis and the histological image of the Rainbow trout ovary.

MATERIAL AND METHODS OF WORK

The research of the histological characteristics of the Rainbow trout gonads from the three Bosnian fish hatcheries belonging to different basins included field work and laboratory analysis. The material for our research was sampled

from three fish farms in Bosnia and Herzegovina: 1. Royal-fish located on Jablanica Lake (Lower Jablanica) the artificial reservoir on Neretva River 2. Magazine MAPRIM located on stream of Ramić brook (Pazarić-Resnik), which flows

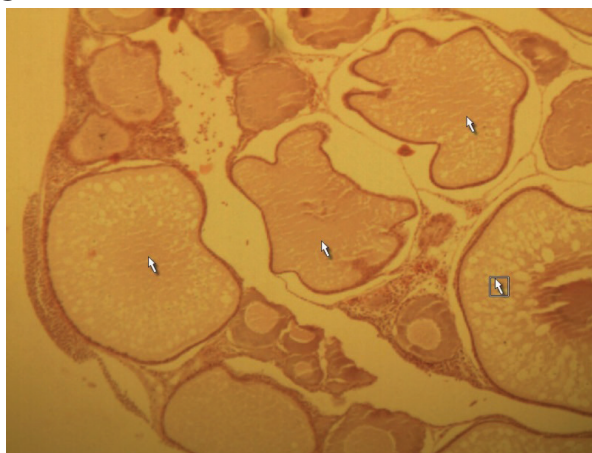
into the Bosna River and 3.Eco Project located on the river Krupica (Jeleć-Miljevina), which, along with Govz, flows into Bistrica and then Drina. During the research, water temperature (° C), altitude, pH value and oxygen saturation were taken into account. For histological study of the ovaries, 24 sexually mature individuals from two to five years were sampled. The gonads were separated into labeled plastic bottles and fixed with 10% formaldehyde and delivered to a laboratory where their further analyses and preparation of histological samples were conducted. The pre-molding process implied dehydration of the samples by passing them through alcohols with increasing concentrations. Samples were first placed in 70% alcohol for two days, then transferred to 96% alcohol for one day and finally to 100% alcohol also for one day. After this procedure, the samples were transferred to a mixture of 100% alcohol and toluene for two hours and then only in toluene for another four hours. Samples prepared in that way were left in paraffin for five hours and then again at twelve hours. With this the process of embedding into paraffin blocks was completed. The method of processing samples from fixation to embedding into paraffin was made on the

rotary tissue processor of the MICROM model STP-120. After finishing the molding process, the samples were cut with a digital microtome of LEICA RM 2145 in several serial sections of 0.5 to 1.5 micrometers. A total of 400 preparations of 80 samples (40 left and 40 right female sex glands) were made. Sections were and placed on slide glasses and deparaffinized by passing them slowly through a series of decreasing concentrations of alcohols. After that sections were painted with hematoxylin and eosin combination, covered with a coverslip, and mounted with Canada balsam. Microscopic preparations were made and analyzed in the Laboratory for Histology and Embryology of Veterinary Faculty in Sarajevo from January 2013 to July 2014. The descriptions of the histological preparations were performed under a light microscope equipped with a MOTIC TYPE 102M marking camera under 100, 200 and 400x magnification. Analyses of the histological structure were carried out using a special Motic Images Plus 2.0 ML software. Microscopic research included the analysis of female gonads during the spawn period by following developmental stages and the degree of ripening at various fish farms.

RESULTS

On Eco-project fish farm located at an altitude of 760 m, the water temperature during the sampling was 7 ° C. The water pH value was 7.8, and the oxygen solubility in water was 10.5 mg / l. On Magazin MAPRIM farm, located at an altitude of 653 m, water temperature was 11 ° C, a pH of 8.3, and a solubility of oxygen 10 mg / l. The measured water temperature on Royal-fish farm, located at an altitude of 202 m, was 8 ° C. The pH of the water was 8.15, and the solubility of the oxygen was 8.27 mg / l.

In the examined histological samples of the ovaries from the Royal fish farm follicles after ovulation were noticeable in a considerably smaller extent than in the ovaries of fish from other fish farms. Postovulatory follicles are characterized by the presence of granulosa, lutein cells, degraded follicles and blood capillaries with free erythrocytes, oval appearance and clearly visible basophilic sails (Figure 1).



Picture 1. Vitellogenesis: white arrows indicate secondary and tertiary developmental stages of oocyte (HE X 200)

Histological preparations of ovaries of individuals raised at the Eco-project (Jeleć-Miljevina location) farm have attracted special attention in the research. Histological studies of samples collected from this farm showed a difference in the histological finding, which was generally observed in the general picture of the ovary (Figure 2).

The parenchyma was abundant with oocytes in the phase of prematuration, maturation and a multitude of postovulatory follicles. After detailed histological analysis, we observed a lot of vitellogenic oocytes of extremely large dimensions, filled with egg yolk granules and fatty vacuoles (Fig. 3). On the surface of these follicles there was a clearly preserved zona radiata.

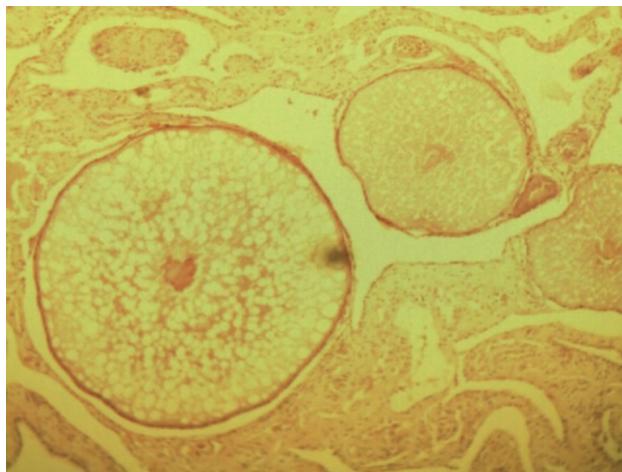


Figure 2. The general picture of the ovary during the spawning period : a multitude of large vitellogenic oocytes (HE X 200)

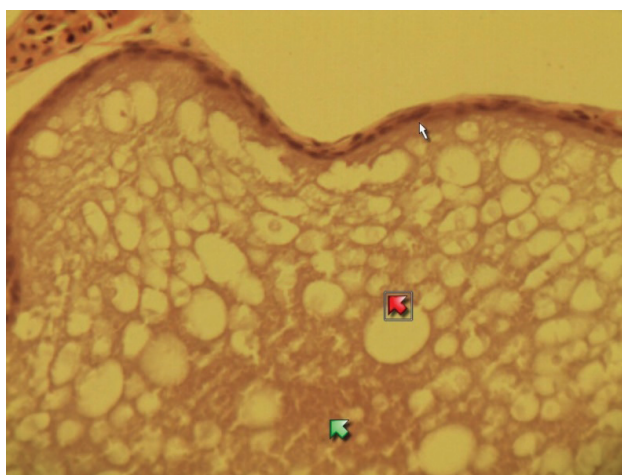


Figure 3. Secondary yolk oocyte: White arrow indicates zona radiata ; green arrow indicates yolk granules; red arrow indicates vacuoles (HE X 400)

Ambient conditions were probably suitable for such intensity of oogenesis. We can conclude that the oogenesis of the fish from this farm in comparison with the other two fish farms, in the same period of the year in November, was at its peak due to the significant

presence of mature oocytes. Fish from the fish farm Eco-project (Jeleć-Miljevina locality) were grown in spring water concrete pools.

Although histological analyzes the Californian trout ovaries were taken

at different locations, showed certain differences in material and the presence of developmental forms of the oocyte, we can say that the ovaries of individuals sampled from the MAGAZIN MAPRIM

farm (Ramici potok-Pazarić location) showed differences in the histological image of the ovary. Right and left gonads were abundant with immature oocytes (Figure 4).

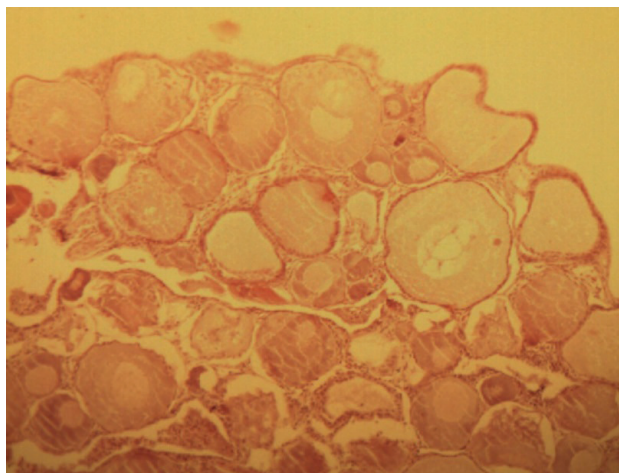


Figure 4. General picture of ovaries during the spawning period of individuals sampled on Magazine MAPRIM farm (HE X 200)

Fish in MAPRIM fish farm are grown in concrete ponds.

DISCUSSION

In the literature, we can found that the photoperiod and other ecological factors strongly influence the reproduction cycle of the Californian trout, and that their manipulation can dictate the spawn period. (Randall, 2001). Variation of ecological factors significantly affects the growth and time interval of gonadal development in fish (Ekanem et al, 2013). Morphological descriptions and detailed descriptions of California trout ovary were presented in their study (Grier et al 2007). Photoperiod and temperature have different effects on different types

of fish. The effect of different water temperatures on the californian trout results in a different time of spawn and eggsize (Pornsoping and sar, 2007), which explains the results of our histological description of the ovaries. Although the results of the measurements showed different physico-chemical parameters of the water on all three BiH farms, literature sources confirm that they were in the physiological limits required by the Californian trout in intensive farming (Cuk i sar, 2006; Vranić i sar, 2011; Marković & Mitrovic-Tutundzic,

2003; Markovic et al., 2006) which is in accordance with our histological description of ovaries. In Californian trout breeding technology it is necessary to provide elementary conditions: pure water with fulfilled oxygen requirements (9-11 mg / l), appropriate temperature

(8-12 ° C), pH value (6.5-8.5) sufficient water flow and systematic nutrition with different types of industrial and natural food (Cuk i sar, 2006, Marković and sar, 2006, Vranić and sar, 2011); fish farms that were the subject of our research basically meet these conditions.

CONCLUSION

The histological analysis of the californian trout ovary samples at various fish farms with different ambient conditions revealed that the highest intensity of oogenesis was in the samples

from the fish farm Eko-projekt, Jeleć-Miljevina locality (pond system with continuously flowing water, altitude 760 m, water temperature 7 ° C, pH 7.8, solubility of oxygen 10.5 mg / l).

LITERATURE

1. Aganović, M. (1979): Salmonidne vrste riba i njihov uzgoj. Igkro „Svjetlost“ OOUR, Sarajevo
2. Ćuk, D., Marković, Z., Grubić, G. (2006): Uticaj različitog sadržaja masti u dve smeše koncentrata na prirast kalifornijske pastrmke (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) u kaveznom sistemu gajenja. *Biotechnology in animal husbandry*, 22: 351-358.
3. Ekanem, A.P., Eyo, V.O., James, P., Udoh, U., Nsisong, E., (2013): Effects of Unical Feed on Fecundity and Gonad Development of *Clarias gariepinus*; A Comparative Study with Coppens Commercial Feed in Erthen Pond. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 2(10):8-14.
4. Grier, H.J., Uribe, M.C., Parenti, L.R. (2007): Germinal Epithelium, Folliculogenesis, and Postovulatory Follicles in Ovaries of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Morphology*, 268:293-310.
5. Jeremić, S., Radosavljević, V., Ćirković, M., Jakić-Dimić, D. (2004): Aktuelna bakterijska oboljenja slatkovodnih riba. Zbornik kratkih sadržaja „VI Simpozijum o ribarstvu Srbije i Crne Gore sa međunarodnim učešćem“, 46.
6. Katavić, I. (2009): Okolišni aspekti akvakulture s posebnim osvrtom na organski otpad i prihvatni kapacitet uzgajališta. Uzgoj slatkovodne ribe, stanje i perspektive zbornik radova, Hrvatska gospodarska komora, Sektor za poljoprivredu, prehrambenu industriju i šumarstvo. Udruženje ribarstva i prerade ribe, Zagreb.

7. Korjenić, E. (2010): Salmonikultura. Autorizovana skripta sa radnom sveskom. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu.
8. Marković, Z., Mitrović-Tutundžić, V. (2003): Gajenje riba, Zadužbina Andrejević, Beograd.
9. Marković, Z., Poleksić, V., Dulić, Z. (2006): Optimalna koncentracija kiseonika u vodi pastrmskih ribnjaka-preduslov dobre proizvodnje. *Biotehnologija u stočarstvu*, 22: 103-112.
10. Sofradžija, A.(2009): Slatkovodne ribe Bosne i Hercegovine. Bemust Sarajevo.
11. Suljević, D.(2012): Biohemijski status vrsta *Salmo trutta fario* (Linnaeus, 1758) i *Salmo farioide* (Karaman, 1938) tokom i nakon mrijesta u Centru za ribarstvo Neretva-Konjic. Doktorska disertacija.
12. Pornsoping, P., Unsrisong, G., Vearsalip, T., Wessels, S., Horsteng- Schwark, G.(2007): Reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum) kept under water temperatures and photoperiods of 131 and 511N latitude. *Aquaculture Reserach*, 38(12):1265-1273.
13. Randall, C. (2001): Photoperiod effects on reproduction and growth in rainbow trout. *Trout News*, 32: 12-16.
14. Treer, T., Safner, R., Aničić, I. (2001): Modeli malih obiteljskih ribnjaka. Hrvatski zadružni savez. Zagreb.
15. Vranić, D., Đinović-Stojanović, J., Spirić A. (2011): Kalifornijska pastrmka (*Oncorhynchus mykiss*) iz akvakulture-kvalitet mesa i značaj u ishrani. *Tehnologija mesa*, 52(1): 122-133.

Paper received: 10.09.2018.

Paper accepted: 15.10.2018.

DOI 10.7251/VETJ1802342C

UDK 619:616.982.2:579.841.1.063.8

Pregledni naučni rad

TUBERKULOZNE I NETUBERKULOZNE MIKOBakterIJE U INFEKCIJI LJUDI I ŽIVOTINJA^{1*}

Željko Cvetnić^{1*}, Maja Zdelar Tuk¹, Sanja Duvnjak¹, Irena Reil¹, Marina
Mikulić¹, Željko Pavlinec¹, Marija Cvetnić², Silvio Špičić¹

¹ Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

² Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

*e-mail kontakt osobe: cvetnic@veinst.hr

Kratak sadržaj: Unutar roda *Mycobacterium* (M.) identificirano je više od 170 različitih vrsta mikobakterija. U odnosu prema čovjeku podijeljene su u tri skupine. *M. tuberculosis* kompleks u koji spada deset vrsta koje uzrokuju tuberkulozu u sisavaca. Vrsta *M. tuberculosis*, unutar *M. tuberculosis* kompleksa i dalje ostaje glavni uzročnik tuberkuloze u ljudi u svijetu. Osim već do sada dugo poznatih vrsta (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*), u novije vrijeme otkriveni su i novi pripadnici te skupine. *M. pinnipedii* u tuljana, *M. munghi* u mungosa, *M. orygis* u arapske oriks antilope i *M. suricattae* u merkata. Isti uzročnici dokazani su u ljudi koji žive u njihovoj blizini. *M. leprae* je uzročnik lepre u ljudi. Bolest je dokazana u oklopnika (aramadila) (*Dasypus novemcinctus*), koji predstavljaju prirodni rezervoar *M. leprae*. Najveći broj mikobakterija (više od 160 vrsta) pripada netuberkuloznim mikobakterijama. Nalaze se u okolišu, vrlo su otporne i prilagođene rastu i razvoju, a njima su često izloženi ljudi i životinje. Neke su važne potencijalno patogene vrste i ponekad uzrokuju teške patološke procese u ljudi i životinja.

Ključne riječi: mikobakterije, okoliš, ljudi, životinje

^{1*} Презентован на 23. Годишњем савјетовању доктора ветеринарске медицине Републике Српске (БиХ).
Теслић, 6-9- јуна 2018.

UVOD

Mikobakterije pripadaju porodici *Mycobacteriaceae*, koja ima samo jedan rod *Mycobacterium*. Broj se vrsta unutar roda *Mycobacterium* zadnjih godina mijenja, a identificirano je više od 170 različitih vrsta. Svake se godine otkrije od tri do deset novih vrsta mikobakterija (Tortoli, 2014). U razdoblju od 2003. do 2012. godine otkriveno više od 60 različitih vrsta mikobakterija (Biet i Boschioli, 2014; Žolnir-Dovč i Pate, 2015).

U odnosu prema čovjeku rod *Mycobacterium* može se podijeliti u tri glavne skupine: 1. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa, u tu skupinu spadaju vrste koje uzrokuju tuberkulozu u sisavaca (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. mungui*, *M. orygis*, a u 2013. godini opisana je vrsta *M. suricattae*); 2. *Mycobacterium leprae* - toj skupini pripada vrsta *M.*

leprae koja uzrokuje lepru u ljudi; 3. Netuberkulozne mikobakterije (NTM) - uključuje sve druge vrste (> od 160 vrsta), koji za razliku od prethodnih skupina nisu obligatni patogeni. Većina tih mikobakterija su saprofiti, simbionti i komenzali, a nalaze se u našem okolišu. Neki od njih mogu biti potencijalno (oportunistički) patogeni u životinja i ljudi, a čovjek i životinje mogu se zaraziti izravnim dodirrom ili aerosolom (Van Ingen, 2013).

Poznato je da patogene mikobakterije imaju svoje preferentne domaćine, ali povremeno mogu izazvati infekciju i u drugih vrsta. Bolesti prouzročene mikobakterijama u domaćih životinja su obično kronične i progresivne. Članovi kompleksa *M. tuberculosis* prouzroče u različitim vrsta sisavaca vrlo slične patološke promjene (Tablica 1.). (Quinn i sur., 2011).

Tablica 1. Prikaz mikobakterija koje su patogene za životinje i ljude (Quinn i sur., 2011).

Mycobacterium Species	Glavni domaćin	Vrste koje se povremeno inficiraju	Bolest
<i>M. tuberculosis</i> kompleks			
<i>M. tuberculosis</i>	Čovjek, primati (zatočeni)	Psi, goveda, psitacine, kanarinci	Tuberkuloza (čitavi svijet)
<i>M. bovis</i>	Goveda	Jeleni, jazavci, oposum, mačke, čovjek, drugi sisavci	Tuberkuloza
<i>M. africanum</i>	Čovjek	Ponekad i druge vrste sisavaca	Tuberkuloza (uglavnom zapadna Afrika)
<i>M. canettii</i>	Čovjek		Tuberkuloza (uglavnom istočna Afrika)
<i>M. microti</i>	Voluharice	Ponekad i druge vrste sisavaca	Tuberkuloza
<i>M. caprae</i>	Koze	Goveda	Tuberkuloza
<i>M. pinnipedii</i>	Tuljan, morski lavovi	Povremeno druge vrste sisavaca uključujući i ljude	Tuberkuloza
<i>M. avium</i> kompleks	Mnoge vrste ptica osim psitacina	Svinje, goveda	Tuberkuloza
<i>M. marinum</i>	Ribe	Ljudi, vođeni sisavci, vodozemci	Tuberkuloza
<i>M. ulcerans</i>	Čovjek	Koale, oposum	Buruli ulcer
<i>M. leprae</i>	Čovjek	armadilo, čimpanze	Guba
<i>M. lepraemurium</i>	Štakori, miševi	Mačke	Štakorska guba, mačja guba
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Goveda, ovce, koze, jeleni	Drugi preživači	Paratuberkuloza

Nespecificirane brzo rastuće mikobakterije	Goveda		Pripisuje se kožnoj tuberkulozi (prouzroči senzibilizaciju goveda prilikom tuberkulinizacije)
<i>M. senegalense</i> <i>M. farcinogenes</i>	Goveda		Kronična upala limfnih čvorova

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS KOMPLEKS

Vrste iz kompleksa *M. tuberculosis* i dalje ostaju glavni uzročnici tuberkuloze u svijetu, osobito u zemljama u razvoju, usprkos znatnom napretku u dijagnozi i liječenju (Sinha i sur., 2016). *M. tuberculosis* je uzročnik tuberkuloze u ljudi, a povremeno može uzrokovati tuberkulozu i u životinja. Javlja se u čitavom svijetu. Može se podijeliti na dva glavna tipa: klasični tip kojeg je izolirao Koch i južno-indijski ili azijski tip. Južno-indijski ili azijski tip izoliran je na području Madrasa u južnoj Indiji, a od klasičnog se tipa razlikuje po slaboj virulenciji za zamorčad, virulentan je za ljude i prouzroči sličnu bolest kao klasični tip. Oko 60% bacila tuberkuloze izoliranih na području Madrasa ovog su tipa, a otkriven je u azijskim zajednicama i u drugim dijelovima svijeta. Učestalost infekcije s *M. tuberculosis* u životinja opada u razmjeru s rjeđom pojavom tuberkuloze u ljudi. Za *M. tuberculosis* su primljivi: magarci, konji, goveda, mesojedi, svinje, slonovi, vodeni sisavci, jeleni, antilope te psitacine (Grange i Redmond, 1978; Smith, 2003). *M. bovis* je primarno patogen za goveda, a na tu su

vrstu mikobakterija primljive još: koze, deve, konji, svinje, psi i mačke. *M. bovis* uzrokuje mali broj slučajeva tuberkuloze u ljudi. Uzročnik u mnogim zemljama ima gospodarski značaj, u divljim i domaćim životinjama širom svijeta, posebice u nerazvijenim zemljama gdje je malo podataka o incidenciji infekcije ljudi vrstom *M. bovis* (LoBue i sur., 2010).

M. africanum uobičajeni uzročnik tuberkuloze u zapadnoj Africi, prvi je put u Senegalu 1968. godine prepoznata kao podvrsta kompleksa *M. tuberculosis*. Dijeli se u dvije varijante: afričku varijantu I, koja je izdvojena iz čovjeka u istočnoj Africi i afričku varijantu II, koja je izdvojena u zapadnoj Africi, a slična je *M. bovis*. Slična je *M. bovis* po tome što je mikroaerofilna i primljiva za TCH, ali je slična i *M. tuberculosis* po primljivosti za pirazinamid. Izolati iz Afrike (Dakar, Mauritanija) sličniji su *M. bovis*, dok su oni iz istočne Afrike (Ruanda i Burudni) sličniji *M. tuberculosis*. Biokemijske pretrage *M. africanum* daju jako varijabilne rezultate, pa se u identifikaciji koristi molekularna genotipizacija. Predložena je revidirana

klasifikacija koja uključuje *M. africanum* zapadnoafrički tip 1 i tip 2 kao različite podvrste unutar *M. tuberculosis* kompleksa (De Jong i sur., 2009).

M. microti je izoliran iz tuberkuloznih procesa u voluharica. Malo se razlikuje od vrste *M. tuberculosis* i neki istraživači smatraju da je podvrsta *M. tuberculosis*. Tuberkuloza je u divljih glodavaca prvi put otkrivena 1927. godine kao dio istraživanja cikličnih promjena gustoće naseljenosti voluharica. Poljske voluharice, šumski miševi i različite druge vrste miševa posebno su osjetljivi na infekciju s *M. microti*. Međutim i drugi mali sisavci poput zamorčića, kunića, miševa i štakora su otporni na infekciju *M. microti*, čak i pri visokim dozama infekcije. Opisani su sporadični slučajevi u većim sisavcima (govedo, ljama, mačka) i u ljudi (Emmanuel i sur., 2007).

M. canetti je prvi opisao francuski mikrobiolog Georges Canetti 1969. godine. Godine 1997. je detaljnije opisan na osnovi izolata izdvojenog iz dvije godine starog dječaka iz Somalije s limfadenitisom. Kasnije je opisan abdominalni tuberkulozni limfadenitis u Švicarca s HIV infekcijom, a koji je živio u Keniji. Miltgen i sur., (2002) identificirali su neuobičajenu vrstu mikobakterija u dva pacijenta s plućnom tuberkulozom. Iz uzoraka je identificirana vrsta *M. canetti*. Tuberkuloza prouzročena vrstom *M. canetti* pojavljuje se kao važna bolest na jugu Afrike. Kako putovanje na ovo područje postaje češće, a tehnike identifikacije mikobakterija

se poboljšavaju, očekuje se da će broj dijagnosticiranih slučajeva uzrokovanih ovom vrstom biti veći. Mogući prirodni rezervoari i način prijenosa još u potpunosti nisu poznati (Van Soolingen i sur., 1997; Pfyffer i sur., 1998).

M. caprae je novi pripadnik *M. tuberculosis* kompleksa izdvojen 1999. godine iz limfnih čvorova i pluća koza. Po svojim fenotipskim i genotipskim osobinama razlikuje se od ostalih članova ovog kompleksa. Nekoliko godina kasnije (2002. i 2003.) potvrđeno je da se radi o novoj vrsti koja je nazvana *Mycobacterium caprae*. *M. caprae* se navodi kao čest uzročnik tuberkuloze goveda u mnogim zemljama Europe, vrsta je dokazana u jelena i divljih svinja. Godine 2006. dokazana je u goveda, svinja i ljudi u Hrvatskoj (Aranaz i sur., 2003; Cvetnić i sur., 2007).

M. pinnipedii je vrsta izdvojeni iz tuljana u Australiji, Argentini, Urugvaju, Velikoj Britaniji i Novom Zelandu. Vršena je usporedba kako bi se utvrdila njihova međusobna povezanost i njihova taksonomska pozicija unutar kompleksa. Izolati izdvojeni u šest različitih vrsta tuljana uspoređeni su s reprezentativnim i standardnim sojevima kompleksa *M. tuberculosis*. Na temelju preferencije domaćina, fenotipskih i genetskih testova izolati su se razlikovali od ostalih vrsta unutar kompleksa *M. tuberculosis*. Tuljani su prirodni domaćin za ovu vrstu mikobakterija, uzrokuje granulomatozne promjene u perifernim limfnim čvorovima, plućima, pleuri, slezeni i peritoneumu. Pronađeni su slučajevi

bolesti s generaliziranim promjenama. Smatra se da se uzročnik najčešći prenosi aerosolom (Cousins i sur., 2003).

Opisano je nekoliko epizootija tuberkuloze u prugastih mungosa (*Mungos mungo*) u Chobe Districtu u Bocvani uzrokovano vrstom *M. mungi*. Prugasti mungosi su društvene životinje koje žive u blizini ljudi hraneći se njihovim otpadom. Tuberkuloza u mungosa je prvi puta dokazana godine 2000., a proširila se u gradove i Nacionalni park. Identificirani je uzročnik po svojim karakteristikama sličan uzročnicima iz kompleksa *M. tuberculosis* (Alexander i sur., 2002). Od 2000. do 2010. bilo je sedam epidemija s većim brojem mungosa, a bolest je dokazana u širokim područjima, uključujući zaštićena područja i urbane centre. Tuberkuloza je u tom području dokazana samo u mungosa i ljudi. Procjena i raširenost tuberkuloze u ljudi nije izvršena. Izdvajanje novog uzročnika predstavlja novu prijetnju i za zdravlje ljudi (Alexander i sur., 2010).

M. orygis je uzročnik tuberkuloze izoliran iz životinja i ljudi iz Afrike i Južne Azije. Prvi je puta izoliran iz arapske oriksa antilope (*Oryx leucoryx*). Molekularnim pretragama su pretražena 22 izolata (11 podrijetlom iz životinja i 11 iz ljudi iz južne Azije). Dokazano je da uzrokuje tuberkulozu u životinja i ljudi iz Afrike i južne Azije. Mikobakterije izolirane iz uzoraka porijeklom iz gazela, jelena,

antilopa i vodenih bivola. Bakterijski izolati iz antilopa su filogenetski različiti od drugih članova *M. tuberculosis* kompleksa, pa je predloženo da budu podvrsta s imenom *M. orygis* (Van Ingen i sur., 2012).

M. suricattae je mikroorganizam koji uzrokuje tuberkulozu u merkata (*Suricata suricatta*). Genetska analiza pokazala je da je to novi član kompleksa *Mycobacterium tuberculosis* i vrlo srodan s *M. mungi*. Istraživanje merkata u pustinji Kalahari pokazuje da je bolest uzrokovana jedinstvenim sojem koji pripada kompleksu *M. tuberculosis*. Nova vrsta je imenovana *M. suricattae* (Parsons i sur., 2013). Godine 2002., je prvi puta tuberkuloza dokazana u slobodno živućih merkata (*Suricata suricatta*) iz pustinje Kalahari u Južnoj Africi, u njih je vrlo detaljno opisana epidemiologija i patologija bolesti (Drewe i sur., 2009; Drewe, 2010). Iz merkata su ranije izolirali mikobakterije koje su obično identificirane kao *M. tuberculosis* (Alexander i sur., 2002), *M. bovis* (Drewe i sur., 2009) ili kao član koji pripada *M. tuberculosis* kompleksu (Drewe, 2011). Autori navode zabrinutost zbog pojave tuberkuloze u njih, te smatraju da je to rezultat antropogene izloženosti tih životinja. Takva zaražena populacija može predstavljati rizik za infekciju drugih divljih i domaćih životinja i ljudi (Drewe i sur., 2009).

MYCOBACTERIUM LEPRAE

M. leprae zauzima posebno mjesto pri podjeli mikobakterija jer do danas nije uspjelo njeno izdvajanje na umjetnim podlogama (Pattyn, 1994). Unatoč mnogim nastojanjima, *M. leprae* nije izdvojen *in vitro*. To ne znači da se u određenim uvjetima u okolišu ne može razmnožavati. Jedno od svojstava je

da je *M. leprae* patogen za čovjeka. U američkim državama Louisiani i Teksasu lepra je dokazana u prirodno inficiranih armadila (*Dasypus novemcinctus*). Bolest je dokazana i u jedne vrste majmuna (*Cercocebus atys*) i u čimpanze (Walker i Lochwood, 2007).

NETUBERKULOZNE MIKOBAKTERIJE

Netuberkulozne mikobakterije (NTM) su oportunistički patogeni ljudi i životinja. Nalaze se u okolišu, kojima su izloženi ljudi i životinje, uključujući sustave za distribuciju pitke vode i kućnu vodu i vodovod, u tlu, prašini. Aktivnosti ljudi imale su izravne utjecaje na ekologiju netuberkuloznih mikobakterija, a time i na njihovu epidemiologiju. Polovicom XX. stoljeća, mikobakterije koje ne uzrokuju tuberkulozu podijeljene su s obzirom na brzinu rasta, morfologiju kolonija i stvaranje pigmenta na svjetlu u četiri skupine: spororastuće (nekromogene, fotokromogene, skotokromogene) i brzorastuće mikobakterije. Za njih su se upotrebljavali različiti nazivi poput "atipične mikobakterije", mikobakterije iz okoliša oportunističke mikobakterije ili "druge mikobakterije osim *M. tuberculosis*". Buhler i Pollack (1953) otkrili su plućnu bolest u ljudi koju je uzrokovao *M. kansasii*, a koja je nevjerovatno sličila tuberkulozi. Od tada je pažnja o patogenom potencijalu netuberkuloznih mikobakterija pojačana.

Pojava humane imunodeficijencije (HIV) i nalaz velikog broja različitih vrsta NTM u njih još više pobuđuje interes za ove mikroorganizme. Razvoj novih laboratorijskih tehnika osobito u molekularnoj biologiji značajno su utjecali na otkrivanje, identifikaciju i dokaz novih vrsta NTM, što je kulminiralo u kasnijim godinama XX. stoljeća. Prema kliničkoj važnosti podijeljene su na uvjetno patogene, oportunističke mikobakterije i čiste saprofite (Davidson, 1989; Janković-Makek, 2014). NTM su oligotrofni mikroorganizmi sposobni rasti pri niskim koncentracijama organske tvari, širokog raspona temperatura i niskim koncentracijama kisika. Otporne su na dezinfekciju, teške metale i antibiotike, a u usporedbi s ostalim vrstama mikobakterija vrlo su otporne. NTM su normalni stanovnici prirodnih voda i vode za piće. Otporne su na različita antimikrobna sredstva koja se koriste prilikom dezinfekcije pitke vode te se mogu širiti u sustave distribucija voda (Falkinham, 2010).

NETUBERKULOZNE MIKOBAKTERIJE I OKOLIŠ

Skoro tri desetljeća poznato je da se netuberkulozne mikobakterije ne šire s čovjeka na čovjeka i široko je prihvaćeno da je njihov izvor okoliš. Najveći broj mikobakterija koje pripadaju rodu *Mycobacterium* su upravo netuberkulozne mikobakterije. One su važni, neizostavni oportunistički patogeni mikroorganizmi i ponekad uzrokuju teške patološke procese u ljudi životinja, peradi, ptica i riba. Netuberkulozne mikobakterije su saprofiti, simbionti ili komenzali i izdvojene su iz okoliša, najčešće iz vode i tla, domaćih i divljih životinja, mlijeka i mliječnih proizvoda, kao i iz manje poznatih medijima poput biofilma, beskralježnjaka i protozoa. Pri tome su dva najvažnija čimbenika stanična stjenka mikobakterija i njihova velika sposobnost prilagodbe (Biet i sur., 2005; Falkinham, 2009; Faria i sur., 2013). U zapadnim zemljama je dokazano da kako broj infekcija vrstom *M. tuberculosis* opada, tako učestalost infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama raste (Hoefsloot i sur., 2013). U posljednjih nekoliko godina, dokazano je da ameba predstavlja velik i važan rezervoar netuberkuloznih mikobakterija. U vodenom sustavu bolnice dokazan je rast i razmnožavanje *M. avium*, u amebi *Acanthamoeba lenticulata* (Ovrutsky i sur., 2013). Važna karakteristika mikobakterijske stanice je prisutnost hidrofobne, vanjske membrane bogate lipidima. Hidrofobnost je jedna od najvažnijih značajki mikobakterija što im omogućuje širenje aerosolom,

površinsko prijanjanje, stvaranje biofilma i otpornost na dezinfekciju i antibiotike. NTM su oligotrofi, imaju sposobnost rasta pri niskim razinama ugljika, što ih čini vrlo učinkovitim u sredinama s niskim hranjivim tvarima i dezinficiranoj sredini, poput vode. Stvaranje biofilma i oligotrofija doveli su do preživljavanja, opstanka i rasta u sustavima i distribucijama pitke vode (Falkinham, 2009).

Postoje vrlo zanimljive razlike u zemljopisnoj rasprostranjenosti pojedinih vrsta netuberkuloznih mikobakterija, koje se za sada ne mogu u potpunosti objasniti. Vrste iz *M. avium* kompleksa prevladavaju u većini zapadnih zemalja i zemalja Europske Unije, sljede ih *M. gordonae* i *M. xenopi*, ostali članovi *M. avium* kompleksa (*M. intracellulare*) i *M. fortuitum* su sljedeće najčešće izdvojene netuberkulozne mikobakterije (Van der Werf i sur., 2014). U SAD su često izdvojene vrste *M. avium* kompleksa, zatim slijede *M. kansasii* i *M. abscessus*. Studija provedena na Bliskom istoku je bitno različita, glavne izdvojene vrste netuberkuloznih mikobakterija su *M. abscessus*, *M. fortuitum* i *M. intracellulare*, a slijede ih *M. kansasii*, *M. gordonae* i *M. avium* (Faria i sur., 2015). U Indiji je najčešće izdvojen *M. fortuitum*. U drugim azijskim zemljama između zapada (Singapura) i istoka (Japan), vrste iz kompleksa *M. avium* uzrokuju većinu infekcija (Simons i sur., 2011).

MIKOBakterioze u ljudi

Netuberkulozne mikobakterije u ljudi mogu izazvati mikobakteriozu. Uglavnom se inficiraju i bolest se javlja u osoba oslabljene imunosti, starijih osoba, osoba s već postojećim bolestima pluća i povremeno u i osoba s normalnom funkcijom imunostnog sustava. Prema do sada poznatim podacima oko 25 vrsta NTM često je povezano s mikobakteriozama u ljudi, druge vrste (njih još > od 160) rijetko su povezani s bolestima, a većina njih su mikroorganizmi iz okoliša, do sada nije opisano da uzrokuju bolest u ljudi (Van Ingen i sur., 2013).

Mikobakterioze u ljudi mogu se grubo podijeliti u četiri klinička oblika (Griffith i sur., 2007). Plućne mikobakterioze su najčešći klinički oblik mikobakterioza, a simptomi su slični plućnoj tuberkulozi i teško se mogu razlikovati bez laboratorijske dijagnostike. Uglavnom se pojavljuju u bolesnika s plućnom bolešću (npr. cistična fibroza, kronični bronhitis ili kronična opstruktivna plućna bolest - KOPB). Plućne mikobakterioze se

najčešće očituju kao sporo progresivne i vrlo teško izlječive bolesti. Najčešće ih uzrokuju vrste *M. avium* i *M. abscessus*. Izvanplućni oblici bolesti su rijetki, a najčešće se javljaju kao limfadenitis u dječjoj dobi, osobito ona koja nisu besežirana, odnosno cijepljena cjepivom *M. bovis* BCG. Najčešći uzročnici su *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* i *M. abscessus*. Diseminirani oblik mikobakterioza najčešće se javlja u osoba s oslabljenim imunološkim sustavom poput bolesnika sa stečenim sindromom imunodeficijencije (AIDS). Ovaj oblik bolesti najčešće uzrokuju mikobakterije iz kompleksa *M. avium*, *M. simiae*. Postoje i difuzna bolest kože i mekih tkiva koje se očituju tvorbom potkožnih čvorića, apscesa, čireva, a uzrokuju ih *M. abscessus*, *M. chelonae*. Često granulomatozne upale na rukama i nogama može uzrokovati i infekcija vrstom *M. marinum* ili brzo rastuće mikobakterije poput *M. fortuitum* (Griffith i sur., 2007; Van Ingen i sur., 2011; Žmak i sur., 2013).

NETUBERKULOZNE MIKOBakterije uzročnici bolesti u ŽIVOTINJA

Mnoge netuberkulozne mikobakterije su oportunistički patogeni u životinja te u njih mogu uzrokovati limfadenitis, infekcije pluća, kože, mekih tkiva, tetiva, zglobova i kostiju (Falkinham, 1999). Poznato je da mikobakterije uzrokuju pobol i pomor riba. Mikobakterioza

je jedna od najčešćih kroničnih bakterijskih bolesti riba. Mikobakterioza se može javiti u morskih i slatkovodnih vrsta riba koje žive slobodno u prirodi ili su uzgojene za prehranu ljudi te kao ukrasne akvarijske ribice. Među najčešćim mikobakterijskim

uzročnicima za pojedine vrste riba jesu *M. marinum*, *M. fortuitum* i *M. chelonae*. Nevedene mikobakterije mogu u ljudi, a osobito onih slabog imunitetnog stanja prouzročiti dugotrajnu bolest koja se teško liječi (Gauthier i Rhodes, 2009). *M. marinum* je poznata i važna mikobakterija koja uzrokuje infekciju kože i mekog tkiva, a izvor su inficirane ribe i kontaminirana voda. Ova vrsta mikobakterija smatra se najčešćom netuberkuloznom mikobakterijom koja uzrokuje izvan plućne infekcije u ljudi (Aubry i sur., 2017).

Više mikobakterijskih vrsta može izazvati tuberkulozu u ptica, što je važno u proizvodnji peradi i uzgoju ptica kao kućnih ljubimaca. Daleko najčešći uzrok ptičje tuberkuloze je bakterija *M. avium*, slijedi *M. genavense*, mnogo rjeđe i druge vrstemikobakterija, npr. *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* i *M. fortuitum* (Dhama i sur., 2011). Osjetljivost na mikobakterije koje uzrokuju tuberkulozu u ptica varira od vrste do vrste. Najosjetljivija je domaća perad, vrapci, fazani i jarebice, a najotporniji je domaći

golub. Zaražene ptice i kontaminirana voda i tlo najvažniji su izvor zaraze, te vrste mikobakterija mogu preživjeti mjesecima u okolišu. Bolest je češća u pretrpanim prostorima sa slabom higijenom (Tell i sur., 2001). Slične razlike u osjetljivosti na NTM također su uočene među ostalim životinjskim vrstama. Tako su na infekciju vrstom *M. avium* posebno osjetljive svinje u kojih infekcija može napraviti mnogo štete gospodarstvu (Cvetnić i sur., 2006). Divlje ptice, svinje i neki sisavci danas su glavni rezervoar ptičje tuberkuloze u prirodi. U posljednjih nekoliko godina u peradarskoj industriji u razvijenom svijetu ta je bolest u opadanju, što je rezultat mnogih promjena u načinu proizvodnje i pozitivnih mjera u prošlosti. Mnoge manje poznate vrste NTM-a do sada su izdvojene u domaćih i divljih životinja, ali njihova uloga u tim domaćinima, posebno u nedostatku kliničkih znakova i patomorfoloških promjena, još nije razjašnjena (Dhama i sur., 2011).

LITERATURA

1. Alexander K. A., Pleydell E., Williams M. C., Lane E. P., Nyange J. F., Michel A. L. (2002): *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife. Emerg Infect Dis 8: 598-560.
2. Alexander K. A., Laver P. N., Michel A. L., Williams M. C., van Helden P. D., Warren R. M., van Pittins N. C. G. (2010): Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emer Infect Dis 16: 1296-1299.
3. Aranaz A., Cousins D., Mateos A., Dominguez L. (2003): Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53: 1785-1789.

4. Aubry A., Mougary F., Reibel F., Cambau E. (2017): *Mycobacterium marinum*. Microbiol Spectr Doi:10.1128/microbiolspec.TNM17-0038-2016.
5. Biet F., Boschioli M. L., Thorel M. F., Guilloteau L. A. (2005): Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet Res 36: 411-436.
6. Biet F., Boschioli M. L. (2014): Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. Res Vet Sci 97: S69-S77.
7. Buhler V. B., Pollak A. (1953): Human infection with atypical acid-fast organisms; report of two cases with patologic findings. Am J Clin Pathol 23: 363-374.
8. Cousins D. V., Bastida R., Cataldi A. , Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D. M., Butler W. R., Dawson D., Rodriguez D., Loureiro J., Romano M. I., Alito A., Zumarraga M., Bernardelli A. (2003): Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. Int J Syst Evolut Microbiol 53: 1305-1314.
9. Cvetnić Ž., Špičić S., Benić M., Katalinić-Janković V., Pate M., Krt B., Ocepek M. (2006): Mycobacterial infection of pigs in Croatia. Acta Vet Hung 55: 1-9.
10. Cvetnić Ž., Katalinic-Jankovic V., Sostaric B., Spicic S., Obrovac M., Marjanovic S., Benic M., Kirin B., Vickovic I. (2007): *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. Int J Tuberc Lung Dis 11: 652-658.
11. Davidson P. T. (1989): The diagnosis and management of disease caused by *M. avium complex*, *M. kansasii*, and other mycobacteria. Clin Chest Med 10: 431-433.
12. De Jong B. C., Adetifa I., Walther B., Hill P. C., Antonio M., Ota M., Adegbola R. A. (2009): Differences between TB cases infected with *M. africanum* West-African type 2, relative to Euro-American *M. tuberculosis* - an update. FEMS Immunol Med Microbiol 58: 102-105.
13. Dhama K., Mahendran M., Tiwari R., Dayal Singh S., Kumar D., Singh S., Sawant P. M. (2011): Tuberculosis in Birds: Insights into the *Mycobacterium avium* Infections. Vet Med Int 20: 23-69.
14. Drewe J. A., Foote A. K., Sutcliffe R. L., Pearce G. P. (2009): Pathology of *Mycobacterium bovis* infection in wild meerkats (*Suricata suricatta*). J Comp Pathol 140: 12-24.
15. Drewe J. A. (2010): Who infects whom? Social networks and tuberculosis transmission in wild meerkats. Proc Biol Sci 277: 633-642.
16. Drewe J. A., Eames K. T. D., Madden J. R., Pearce G. P. (2011): Integrating

contact network structure into tuberculosis epidemiology in meerkats in South Africa. implications for control. *Prev Vet Med* 101: 113-120.

17. Emmanuel F. X., Seagar A. L., Doig C., Rayner A., Claxton P., Laurenson I. (2007): Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. *Emerg Infect Dis* 13: 1924-1927.
18. Falkinham J. O. (1999): III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 9: 177-215.
19. Falkinham J. O. (2009): Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* 107: 356-367.
20. Falkinham J. O. (2010): Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. *Fut Microbiol* 5: 951-960.
21. Faria S., Joao I., Jordao L. (2015): General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection. *J Pathog Article ID* 809014, dx. Doi.org/10.1155/2015/809014.
22. Gauthier D. T., Rhodes M. W. (2009): Mycobacteriosis in fishes: a review. *Vet J* 180: 33-47.
23. Grange J. M., Redmond W. B. (1978): Host phage relationship in the genus *Mycobacterium* and their clinical significance. *Tubercle* 59: 203-225.
24. Griffith D. E., Aksamit T., Brown-Elliott B. A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F., Holland S. M., Horsburgh R., Huitt G., Iademarco M. F., Iseman M., Olivier K., Ruoss S., von Reyn C. F., Wallace R. J., Winthrop K. (2007): An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 175: 367-416.
25. Hoefsloot J., Van Ingen J., Andrejak C. i sur. (2013): "The geographic diversity of nontuberculosis mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTB-NET collaborative study". *Eur Res J* 42: 1604-1613.
26. Janković Makek M. (2014): Epidemiologija i klinička važnost plućnih infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet.
27. LoBue P. A., Enarsson D. A., Thoen C. O. (2010): Tuberculosis in humans and animals: an overview. In *J Tuberc Lung Dis* 14: 1075-1078.
28. Miltgen J., Morillon M., Koeck J. L., Varnevat A., Briant J. F., Nguyen G., Vervat D., Bonnet D., Vincent V. (2002): Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium* subsp. *canetti*. *Emer Infect Dis* 8: 1350-1352.

29. Ovrutsky A. R., Chan E. D., Kartalija M., Bai X., Jackson M., Gibbs S., Falkinham J. O., Iseman M. D., Reynolds P. R., McDonnell G., Thomas V. (2013): Occurrence of free-living amoebae and nontuberculous mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. Appl Environ Microbiol 79: 3185-3192.
30. Parsons S. D. C., Drewe J. A., Gey van Pittius N. C., Warren R. M., van Helden P. D. (2013): Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. Emer Infect Dis 19: 2004-2007.
31. Pattyn S. R. (1994): Leprosy (Hansen's disease). In: Beran, G. W., Steele J. H (Eds.) Handbook of Zoonoses, Section A: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial and Mycotic, CRC Press, Boca Raton, Florida. 191 - 199.
32. Pfyffer G. E., Auckenthaler R., van Embden J. D. A., van Soolingen D. (1998): *Mycobacterium canetti*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. Emerg Infect Dis 4: 631-634.
33. Quinn P. J., Markey B. K., Leonard F. C., Fitzpatrick E.S., S. Fanning, Hartigan P. J. (2011): Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing, Oxford. Mycobacterium species, 250-262.
34. Simons S., Van Ingen J., Hsueh P. R., Van Hung N., Dekhuijzen P. N., Boeree M. J., van Soolingen D. (2011): Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. Emerg Infect Dis 17: 343-349.
35. Sinha P., Gupta A., Prakash P., Amupurba S., Tripathi R., Srivastara G. N. (2016): Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32 kD alpha antigen encoding gene fragments. BMC Infect Dis 16: 123-132.
36. Smith I. (2003): *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 16: 463-496.
37. Tell L. A., Woods L., Cromie R. L. (2001): Mycobacteriosis in birds. Rev Sci Tech 20: 180-203.
38. Tortoli E. (2014): Microbiology features and clinical relevance of new species of the genus Mycobacterium. Clin Microbiol Rev 27: 727-752.
39. Van Ingen J., van Soolingen D. (2011): Cervico-facial lymphadenitis caused by nontuberculous mycobacteria; host, environmental or bacterial factors? Int J Pediatr Otorhinolaryngol 75: 722-723.
40. Van Ingen J., Rahim Z., Mulder A., Boeree M. J., Simeone R., Brosch R., van Soolingen D. (2012): Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. Emerg Infect Dis 18: 653-655.

41. Van Ingen J. (2013): Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med* 34: 103-109.
42. Van Soolingen D., Hoogenboezem T., De Haas P. E. W., Hermans P. W. M., Koedam M. A., Teppema K. S., P. J. Brennan, Besra G. S., Portaels F., Top J., Schouls L. M., Van Embden J. D. (1997): A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1236-1245.
43. Van der Werf M. J., Ködmön C., Katalinić-Janković V., Kummik T., Soini H., Richter E., Papaventsis D., Tortoli E., Perrin M., van Soolingen D., Žolnir-Dovč M., Ostergaard Thomsen V. (2014): Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. *BMC Infect Dis* 14, 62. Doi. 10.1186/1471-2334-14-62.
44. Walker S. L., Lockwood D. N. J. (2007): Leprosy. *Clin Dermatol* 25: 165-172.
45. Žolnir-Dovč M., Pate M. (2015): Netuberkulozne mikobakterije kao zoonoze - koliko znamo o njima?. Znanstveno- stručni simpozij: "Klasične bakterijske i parazitarne zoonoze- što nas očekuje?". HAZU (Zagreb, 22.10. 2015.). Zbornik radova, str. 12-18.
46. Žmak Lj., Janković M., Obrovac M., Katalinić-Janković V. (2013): Netuberkulozne mikobakterije. *Infektološki glasnik* 33: 95-101.

Rad primljen: 23.04.2018.

Rad prihvaćen: 24.10.2018.

DOI 10.7251/VETJEN1802342C

UDK 619:616.982.2:579.841.1.063.8

Review scientific paper

TUBERCULOUS AND NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN HUMAN AND ANIMAL INFECTION^{2*}

Željko Cvetnić^{1*}, Maja Zdelar Tuk¹, Sanja Duvnjak¹, Irena Reil¹, Marina Mikulić¹,
Željko Pavlinec¹, Marija Cvetnić², Silvio Špičić¹

¹ Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

² Veterinary Faculty University of Zagreb, Croatia

*e-mail -corresponding author: cvetnic@veinst.hr

Abstract: Within the genus *Mycobacterium* (M.) more than 170 different types of mycobacteria have been identified. In relation to humans, they are divided into three groups. *M. tuberculosis* complex, which includes ten species that cause tuberculosis in mammals. The type of *M. tuberculosis* within *M. tuberculosis* complex remains the major cause of tuberculosis in humans in the world. Except for a long time known species (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*), new members of the group have recently been discovered. *M. pinnipedii* in seals, *M. munghi* in mongoose, *M. orygis* in arabian oryx and *M. suricattae* in the meerkat. The same causes have been proven in people living nearby. *M. leprae* is the cause of the leprosy in humans. The disease has been proven in nine banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) and represents the natural reservoir of *M. leprae*. The largest number of mycobacteria (more than 160 species) belongs to nontuberculous mycobacteria. They are found in the environment, they are very resistant and adapted to growth and development, and to humans and animals are often exposed to them. Some are important potentially pathogenic species and they sometimes cause severe pathological processes in humans and animals.

Key words: mycobacteria, environment, humans, animals

^{2*} Presented at the 23rd Annual Consulting of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (B&H).
Teslic, June 6-9, 2018

INTRODUCTION

Mycobacterium is the single genus within the family of Mycobacteriaceae. The number of species within the genus Mycobacterium has been changing over the last few years, and more than 170 different species have been identified. Each year, three to ten new types of mycobacterium are discovered (Tortoli, 2014). In the period from 2003 to 2012, more than 60 different types of mycobacteria were detected (Biet and Boschirolì, 2014; Žolnir-Dovč and Pate, 2015). In relation to humans, the genus Mycobacterium can be divided into three main groups: 1. Mycobacterium tuberculosis complex, this group includes species that cause tuberculosis in mammals (M. tuberculosis, M. africanum, M. canettii, M. bovis, M. caprae, M. microti, M. pinnipedii, M. mungi, M. orygis, and in 2013 the species M. suricattae was described); 2. Mycobacterium leprae - this group belongs to the M. leprae

species that causes leprosy in humans; 3. Nontuberculous mycobacteria (NTM) - includes all other species (> of 160 species), which, unlike the previous groups, doesn't include obligate pathogens. Most of these mycobacteria are saprophytes, symbionts and commensals, and are found in our environment. Some of them may be potentially (opportunistic) pathogens in animals and humans, and man and animals may be infected by direct contact or aerosol (Van Ingen, 2013). It is known that pathogenic mycobacterium have their preferred hosts, but occasionally they can cause infection in other species. Diseases caused by mycobacterium in domestic animals are usually chronic and progressive. Members of the M. tuberculosis complex cause very different pathological changes in different types of mammals (Table 1). (Quinn et al., 2011).

Table 1. Review of mycobacterium pathogenic to animals and humans (Quinn et al., 2011).

Mycobacterium Species	Main host	Occasionally infected species	Disease
<i>M. tuberculosis</i> complex			
<i>M. tuberculosis</i>	Man, primates (captivated)	Dogs, cattle, psittacines, canaries	Tuberculosis (the whole world)

<i>M. bovis</i>	Cattle	deer, badgers, opossums, cats, man, other mammals	Tuberculosis
<i>M. africanum</i>	Man	Sometimes other types of mammals	Tuberculosis (mainly Western Africa)
<i>M. canettii</i>	Man		Tuberculosis (mainly Eastern Africa)
<i>M. microti</i>	Voles	Sometimes other types of mammals	Tuberculosis
<i>M. caprae</i>	Goat	Cattle	Tuberculosis
<i>M. pinnipedii</i>	Seal, sea lions	Sometimes other types of mammals including humans	Tuberculosis
<i>M. avium kompleks</i>	Many bird species except psittacines	Pigs, cattle	Tuberculosis
<i>M. marinum</i>	Fish	Humans, aquatic mammals, amphibians	Tuberculosis
<i>M. ulcerans</i>	Man	Koala, opossum	Buruli ulcer
<i>M. leprae</i>	Man	Armadillos, chimpanzees	Leprosy
<i>M. lepraemurium</i>	Rats, mice	Cats	Rat leprosy, Feline leprosy
<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	Cattle, sheep, goats, deer	Other ruminants	Paratuberculosis
<i>Unspecified rapidly growing mycobacteria</i>	Cattle		It is classified as skin tuberculosis (causes bovine sensitization during tuberculinization)
<i>M. senegalense</i> <i>M. farcinogenes</i>	Cattle		Chronic lymphadenitis

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX

Species from the *M. tuberculosis* complex remain the main causes of tuberculosis in the world, especially in developing countries, despite considerable progress in diagnosis and treatment (Sinha et al., 2016). *M. tuberculosis* is the cause of tuberculosis in humans, and occasionally it can cause tuberculosis in animals. It appears in the whole world. It can be divided into two major types: the classical type originally isolated by Koch and the South Indian or Asian type. The South Indian or Asian type is isolated in Madras in southern India, and it differs from a classical in regard to low virulence for guinea pigs, it is virulent for humans and causes similar illness as the classical type. About 60% of the tuberculosis isolated in Madras region was of this type, and it was discovered in Asian communities and in other parts of the world. The incidence of infection with *M. tuberculosis* in animals decreases in proportion to the rarer occurrence of tuberculosis in humans. The following animals are susceptible to *M. Tuberculosis*: donkeys, horses, cattle, carnivores, pigs, elephants, aquatic mammals, deer, antelopes and psittacines (Grange and Redmond, 1978; Smith, 2003) *M. bovis* is primarily pathogenic to cattle but goats, camels, horses, pigs, dogs and cats are also susceptible to this bacterium. *M. bovis* causes a small number of cases of tuberculosis in humans. The causative agent in many countries has economic significance in wild and domestic

animals around the world, especially in underdeveloped countries where there is little data on the incidence of *M. Bovis* infection in humans (LoBue et al., 2010).

M. africanum, a common cause of tuberculosis in western Africa, was first recognized in Senegal in 1968 as a subspecies of the *M. tuberculosis* complex. It is divided into two variants: the African I variant, which is isolated from the man in East Africa and the African II variant isolated in West Africa and similar to *M. bovis*. It is similar to *M. bovis* because it's microaerophilic and susceptible to TCH, but it is also similar to *M. tuberculosis* due to its susceptibility to pyrazinamide. Isolates from Africa (Dakar, Mauritania) are more similar to *M. bovis*, while those from eastern Africa (Rwanda and Burudni) are similar to *M. tuberculosis*. Biochemical tests of *M. africanum* give very variable results, so molecular genotyping is used in the identification. A revised classification was proposed including West African 1 and West African 2 as distinct subspecies within the *M. tuberculosis* complex (De Jong et al., 2009).

M. microti was first isolated from tuberculous processes in voles. It is slightly different from *M. tuberculosis* and some researchers consider it to be a subspecies of *M. tuberculosis*. Tuberculosis in wild rodents was first discovered in 1927 as part of a study of cyclic density changes in vole populations. Common voles, wood mice and various

other types of mice are particularly susceptible to infection with *M. microti*. However, other small mammals such as guinea pigs, rabbits, mice and rats are resistant to *M. microti* infection, even at high doses of infection. Sporadic cases are described in larger mammals (cattle, llama, cat) and in humans (Emmanuel et al., 2007). *M. canettii* was first described by the French microbiologist Georges Canetti in 1969. In 1997, it was described in more details on the basis of isolates isolated from a 2-year-old Somali child with lymphadenitis. Later, abdominal lymphatic TB was diagnosed in a 56-year-old Swiss man with HIV infection who lived in Kenya. Miltgen et al. (2002) identified an unusual type of mycobacteria in two patients with pulmonary tuberculosis. *M. canettii* species was identified from the samples. Tuberculosis caused by *M. canettii* appears as an important disease in southern Africa. As traveling to this area becomes more common, and techniques for identification of mycobacteria are improving, it is expected that the number of diagnosed cases caused by this species will be higher. Possible natural reservoirs and mode of transmission are still not fully known (Van Soolingen et al., 1997; Pfyffer et al., 1998).

M. caprae is a new member of the *M. tuberculosis* complex, isolated in 1999 from the lymph nodes and lungs of goats. By its phenotypic and genotypic traits it differs from other members of this complex. Several years later (2002 and 2003) it was confirmed that this

was a new species called *Mycobacterium caprae*. *M. Caprae* is a common cause of bovine tuberculosis in many countries of Europe, identified in deer and wild boars. In 2006, it was proved in cattle, pigs and people in Croatia (Aranaz et al., 2003; Cvetni et al., 2007). In 2006, it was detected in cattle, pigs and people in Croatia (Aranaz et al., 2003; Cvetni et al., 2007).

M. pinnipedii is a species isolated from seals in Australia, Argentina, Uruguay, Great Britain and New Zealand. A comparison of isolates from seals in Australia, Argentina, Uruguay, Great Britain and New Zealand was undertaken to determine their relationships to each other and their taxonomic position within the complex. Isolates from six species of seals were compared to representative and standard strains of the *M. tuberculosis* complex. Based on host preference, phenotypic and genetic tests, isolates differed from other species within the *M. tuberculosis* complex. Seals appear to be the natural host for this organism causing granulomatous lesions in the peripheral lymph nodes, lungs, pleura, spleen and peritoneum. Cases of disseminated disease have been found. The causative agent is thought to be the most commonly transmitted by aerosol (Cousins et al., 2003).

Several epizootics of tuberculosis in banded mongoose (*Mungos mungo*) caused by *M. mungi*, have been described. in the Chobe District in Botswana. Banded mongooses are social animals living in close association with humans and they

scavenge human waste. Tuberculosis disease in banded mongooses was initially identified in 2000 and infection spread through cities and the national park. The causative agent was identified by its characteristics similar to those of the *M. tuberculosis* complex (Alexander et al., 2002). From 2000 to 2010 there were seven epidemics with a higher number of banded mongooses, and the disease was identified in broad areas, including protected areas and urban centers. Tuberculosis was detected only in mongooses and humans. The estimation and distribution of tuberculosis in humans has not been performed. Isolation of the new agent presents a new threat to human health (Alexander et al., 2010).

M. orygis is a causative agent of tuberculosis in animals and humans from Africa and South Asia. It is first isolated from the Arabic oryx antelope (*Oryx leucoryx*). *M. orygis* was first characterized based on examination of 22 isolates, eleven of these isolates were from animals (a and 11 were from humans from South Asia. It was proven to cause tuberculosis in animals and people from Africa and South Asia. Mycobacteria were isolated from samples originating from gazelles, deer, antelopes and water buffaloes. Bacterial isolates from antilopes are phylogenetically

different from other members of the *M. tuberculosis* complex, and it was proposed that *M.orygis* was attributed a subspecies status (Van Ingen et al., 2012).

M. suricattae is a microorganism that causes tuberculosis in meerkats (*Suricata suricatta*). Genetic analysis has shown that it is a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and is very similar to *M. mungi*. A study of meerkats in the Kalahari Desert shows that the disease is caused by a unique strain belonging to the *M. tuberculosis* complex. The new species is called *M. suricattae* (Parsons et al., 2013). Tuberculosis was first diagnosed in free-living meerkats in South Africa's Kalahari Desert with detailed description of epidemiology and pathology of the disease (Drewe et al., 2009; Drewe, 2010). Microbacteria previously isolated from meerkats were usually identified as *M. tuberculosis* (Alexander et al., 2002), *M. bovis* (Drewe et al., 2009) or as a member of the *M. tuberculosis* complex (Drewe, 2011). The authors express concern about the appearance of tuberculosis in meerkats, and they believe that this is the result of anthropogenic exposure of these animals. Such infected populations may pose a risk for infection of other wild and domestic animals and humans (Drewe et al., 2009).

MYCOBACTERIUM LEPRAE

M. leprae takes a special place in the division of mycobacteria because in vitro cultivation is not generally possible in spite of many efforts (Pattyn, 1994). This does not mean that in certain environmental conditions it can not be reproduced. One of the properties is that *M. leprae* is pathogenic to humans.

In the US, Louisiana and Texas, leprosy has been detected in naturally infected armadillos (*Dasypus novemcinctus*). The disease has also been identified in one species of monkey (*Cercocebus atys*) and in chimpanzees (Walker and Lochwood, 2007).

NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are opportunistic pathogens of humans and animals. They are found in a wide variety of habitats to which humans and animals are exposed, including drinking water distribution systems and household water and plumbing, soil and dust. Human activities have had direct impacts on their ecology and thereby their epidemiology. In the middle of the 20th century mycobacteria that do not cause tuberculosis, are divided in four groups according to the rate of growth, the morphology of colonies and the production of pigments in light: slow-growing mycobacterium (non-chromogens, photochromogens and scotochromogens) and rapid growing mycobacterium. Different terms such as “atypical mycobacteria”, mycobacteria from the environment, opportunistic mycobacteria or “other mycobacteria except *M. tuberculosis*” were used for them. Buhler and Pollack (1953) discovered lung disease in humans caused by *M. kansasii*, which was incredibly

similar to tuberculosis. Since then, the attention to the pathogenic potency of nontuberculous mycobacteria has been intensified. The occurrence of human immunodeficiency (HIV) and the finding of a large number of different types of NTM even more increases the interest in these microorganisms. The development of new laboratory techniques, particularly in molecular biology, significantly influenced the detection, identification and evidence of new NTM species, which culminated in the later years of the 20th century. According to clinical relevance, they were divided into conditional pathogens, opportunistic mycobacteria and pure saprophytes (Davidson, 1989; Jankovic-Makek, 2014). NTM are oligotrophic, able to grow at low organic matter concentrations and over a wide range of temperatures and even at low oxygen concentrations. They are resistant to disinfection, heavy metals and antibiotics, and compared to other types of mycobacteria they are highly resistant. NTM have been shown

to be normal residents of drinking water distribution systems. They are resistant to various antimicrobial agents used for

disinfection of drinking water and can spread to water distribution systems (Falkinham, 2010).

NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA AND THE ENVIRONMENT

For almost three decades, it is known that non-tuberculous mycobacteria do not spread person-to-person and it is widely accepted that their source is the environment. The largest number of mycobacteria belonging to the genus *Mycobacterium* are nontuberculous mycobacteria. These are important, indispensable opportunistic pathogenic microorganisms and sometimes cause severe pathological processes in humans, poultry, birds and fish. Nontuberculous mycobacteria are saprophytes, symbionts and commensals, and are isolated from the environment, most commonly from water and soil, domestic and wild animals, milk and dairy products, as well as from less well-known media such as biofilm, invertebrates and protozoa. Two of the most important factors are the cell wall of mycobacteria and their great adaptability (Biet et al., 2005; Falkinham, 2009; Faria et al., 2013). In Western countries it has been proven that as the number of infections with *M. tuberculosis* species decreases, the incidence of infections caused by nontuberculous mycobacteria is increasing (Hoefsloot et al., 2013). In the last few years, it has been proven that the amoeba is a large and important reservoir of nontuberculous mycobacteria. In the aquatic system of the hospital, the growth of *Mycobacterium avium* in

Acanthamoeba lenticulata was proven. (Ovrutsky et al., 2013) An important feature of the mycobacterial cell is the presence of a hydrophobic, lipid-rich lipid membrane. Hydrophobicity is one of the most important features because it favors aerosolization, bacterial adhesion to surfaces, biofilm formation and resistance to disinfection and antibiotics. The NTM are oligotrophs, able to grow at low carbon levels, making them effective competitors in low nutrient, and disinfected environments such as water. Biofilm formation and oligotrophia led to survival and growth in drinking water systems and distributions (Falkinham, 2009). There are very interesting differences in the geographical distribution of certain types of nontuberculous mycobacteria, which for now can not be fully explained. The species from the *M. avium* complex prevail in most western countries and countries of the European Union, followed by *M. gordonae* and *M. xenopi*, the other members of *M. avium* complex (*M. Avium-intracellulare*) and *M. fortuitum* are the following most frequently isolated nontuberculous mycobacteria (Van der der Werf et al., 2014). The species of *M. avium* complex is often isolated in the United States, followed by *M. kansasii* and *M. abscessus*. The study carried out in the

Middle East is significantly different, where the main isolated species were *M. abscessus*, *M. fortuitum* and *M. intracellulare*, followed by *M. kansasii*, *M. gordonae* and *M. avium* (Faria et al., 2015). In India *M. fortuitum* was

most commonly isolated. In other Asian countries between the west (Singapore) and the east (Japan), species from the *M. avium* complex cause most of the infections (Simons et al., 2011).

MYCOBACTERIOSIS IN HUMANS

Nontuberculous mycobacteria can cause mycobacteriosis in humans. The disease mostly affect people with impaired immune system, the elderly, people with already existing lung diseases and occasionally in people with normal immune function. So far about 25 types of NTM is often associated with mycobacteria in humans, other species (of which more than 160) are rarely associated with diseases, and most of them are microorganisms from the environment, so far not described as causing disease in humans (Van Ingen et al., 2013). Mycobacteriosis in humans can be roughly divided into four clinical forms (Griffith et al., 2007). Pulmonary mycobacteriosis is the most common clinical form of mycobacteriosis, and the symptoms are similar to pulmonary tuberculosis and can hardly be distinguished without laboratory diagnostics. They mainly occur in patients with pulmonary disease (eg cystic fibrosis, chronic bronchitis or chronic obstructive pulmonary disease - COPD). Pulmonary mycobacteriosis is usually manifested as slow progressive and very

difficult to cure. The most common causes are *M. avium* and *M. abscessus*. Other forms of the disease are rare, and most commonly occur as lymphadenitis in children, especially those who are vaccinated with *M. bovis* BCG vaccine. The most common causative agents are *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* and *M. abscessus*. The disseminated form of mycobacteriosis is most common in people with a weakened immune system, such as patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). This type of disease is most commonly caused by mycobacteria from the *M. avium* complex, *M. simiae*. There is also kin and soft tissue infection manifested by the formation of subcutaneous nodes, abscesses, ulcers, and are caused by *M. abscessus*, *M. chelonae*. Often granulomatous inflammation on the hands and feet can also be caused by the *M. marinum* species or rapidly growing mycobacteria such as *M. fortuitum* (Griffith et al., 2007; Van Ingen et al., 2011; Žmak et al., 2013).

NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA -CAUSATIVE AGENTS OF ANIMAL INFECTIONS

Many nontuberculous mycobacteria are opportunistic pathogens in animals and can cause lymphadenitis, lung, skin, soft tissue, tendon, joint and bone infections (Falkinham, 1999). It is well known that mycobacteria cause fish morbidity and mortality. Mycobacteriosis can occur in saltwater and freshwater fish that live in nature or are grown for human consumption or as decorative aquarium fish. For certain species of fish are *M. marinum*, *M. fortuitum* and *M. chelonae* are among the most common microbacterial agents. These mycobacteria may cause long-lasting illness that is difficult to treat in humans, especially those with low immune system (Gauthier and Rhodes, 2009). *M. marinum* is a well-known and important mycobacteria that causes skin and soft tissue infections, and infected fish and contaminated water are the sources of infection. This type of mycobacteria is considered the most common nontuberculous mycobacterium that causes outbreaks of lung infections in humans (Aubry et al., 2017).

More mycobacterial species can cause tuberculosis in birds, which is important in poultry production and breeding birds as pets. The most common cause of bird tuberculosis is *M. avium*, followed by *M. genavense*, and other less common types

of mycobacteria, e.g. *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* and *M. fortuitum* (Dhama et al., 2011). Sensitivity to mycobacteria that causes tuberculosis in bird varies from species to species. The most sensitive is domestic poultry, sparrows, pheasants and partridges, and the most resistant is the domestic pigeon. Infected birds and contaminated water and soil are the most important source of infection, and these types of mycobacteria can survive for months in the environment. The disease is more common in crowded areas with poor hygiene (Tell et al., 2001). Similar differences in sensitivity to NTM were also observed among other animal species. Thus, pigs are particularly sensitive to infection caused by *M. avium* which can cause much damage to the economy (Cvetnić et al., 2006). Wild birds, pigs and some mammals today are the main reservoir of avian tuberculosis in nature. In the past few years in the poultry industry in the developed world this disease is declining, as a result of many changes in production and positive measures in the past. Lesser-known species of NTM have so far been isolated in domestic and wild animals, but their role in these hosts, especially in the absence of clinical signs and pathomorphological changes, has not yet been clarified (Dhama et al., 2011).

LITERATURE

1. Alexander K. A., Pleydell E., Williams M. C., Lane E. P., Nyange J. F., Michel A. L. (2002): *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife. *Emerg Infect Dis* 8: 598-560.
2. Alexander K. A., Laver P. N., Michel A. L., Williams M. C., van Helden P. D., Warren R. M., van Pittins N. C. G. (2010): Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 16: 1296-1299.
3. Aranaz, A., Cousins D., Mateos A., Dominguez L. (2003): Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1785-1789.
4. Aubry, A., Mougary F., Reibel F., Cambau E. (2017): *Mycobacterium marinum*. *Microbiol Spectr* Doi:10.1128/microbiolspec.TNM17-0038-2016.
5. Biet F., Boschirolu M. L., Thorel M. F., Guilloteau L. A. (2005): Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet Res* 36: 411-436.
6. Biet F., Boschirolu M. L. (2014): Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. *Res Vet Sci* 97: S69-S77.
7. Buhler V. B., Pollak A. (1953): Human infection with atypical acid-fast organisms; report of two cases with patologic findings. *Am J Clin Pathol* 23: 363-374.
8. Cousins D. V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D. M., Butler W. R., Dawson D., Rodriguez D., Loureiro J., Romano M. I., Alito A., Zumarraga M., Bernardelli A. (2003): Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1305-1314.
9. Cvetnić Ž., Špičić S., Benić M., Katalinić-Janković V., Pate M., Krt B., Ocepek M. (2006): Mycobacterial infection of pigs in Croatia. *Acta Vet Hung* 55: 1-9.
10. Cvetnić, Ž., Katalinic-Jankovic V., Sostaric B., Spicic S., Obrovac M., Marjanovic S., Benic M., Kirin B., Vickovic I. (2007): *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *Int J Tuberc Lung Dis* 11: 652-658.
11. Davidson P. T. (1989): The diagnosis and management of disease caused by *M. avium* complex, *M. kansasii*, and other mycobacteria. *Clin Chest Med* 10: 431-433.
12. De Jong B. C., Adetifa I., Walther B., Hill P. C., Antonio M., Ota M., Adegbola R. A. (2009): Differences between TB cases infected with *M. africanum* West-African

type 2, relative to Euro-American *M. tuberculosis* - an update. FEMS Immunol Med Microbiol 58: 102-105.

13. Dhama K., Mahendran M., Tiwari R., Dayal Singh S., Kumar D., Singh S., Sawant P. M. (2011): Tuberculosis in Birds: Insights into the *Mycobacterium avium* Infections. Vet Med Int 20: 23-69.
14. Drewe J. A., Foote A. K., Sutcliffe R. L., Pearce G. P. (2009): Pathology of *Mycobacterium bovis* infection in wild meerkats (*Suricata suricatta*). J Comp Pathol 140: 12-24.
15. Drewe J. A. (2010): Who infects whom? Social networks and tuberculosis transmission in wild meerkats. Proc Biol Sci 277: 633-642.
16. Drewe J. A., Eames K. T. D., Madden J. R., Pearce G. P. (2011): Integrating contact network structure into tuberculosis epidemiology in meerkats in South Africa. implications for control. Prev Vet Med 101: 113-120.
17. Emmanuel F. X., Seagar A. L., Doig C., Rayner A., Claxton P., Laurenson I. (2007): Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. Emerg Infect Dis 13: 1924-1927.
18. Falkinham J. O. (1999): III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 9: 177-215.
19. Falkinham J. O. (2009): Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. J Appl Microbiol 107: 356-367.
20. Falkinham J. O. (2010): Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. Fut Microbiol 5: 951-960.
21. Faria S., Joao I., Jordao L. (2015): General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection. J Pathog Article ID 809014, dx. Doi.org/10.1155/2015/809014.
22. Gauthier D. T., Rhodes M. W. (2009): Mycobacteriosis in fishes: a review. Vet J 180: 33-47.
23. Grange J. M., Redmond W. B. (1978): Host phage relationship in the genus *Mycobacterium* and their clinical significance. Tubercle 59: 203-225.
24. Griffith D. E., Aksamit T., Brown-Elliott B. A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F., Holland S. M., Horsburgh R., Huitt G., Iademaro M. F., Iseman M., Olivier K., Ruoss S., von Reyn C. F., Wallace R. J., Winthrop K. (2007): An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 175: 367-416.

25. Hoefsloot J., Van Ingen J., Andrejak C. i sur. (2013): "The geographic diversity of nontuberculosis mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTB-NET collaborative study". Eur Res J 42: 1604-1613.
26. Janković Makek M. (2014): Epidemiologija i klinička važnost plućnih infekcija uzrokovanih netuberkuloznim mikobakterijama. Disertacija. Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet.
27. LoBue P. A., Enarsson D. A., Thoen C. O. (2010): Tuberculosis in humans and animals: an overview. In J Tuberc Lung Dis 14: 1075-1078.
28. Miltgen J., Morillon M., Koeck J. L., Varnevat A., Briant J. F., Nguyen G., Vervat D., Bonnet D., Vincent V. (2002): Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium* subsp. *canetti*. Emer Infect Dis 8: 1350-1352.
29. Ovrutsky A. R., Chan E. D., Kartalija M., Bai X., Jackson M., Gibbs S., Falkinham J. O., Iseman M. D., Reynolds P. R., McDonnell G., Thomas V. (2013): Occurrence of free-living amoebae and nontuberculous mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. Appl Environ Microbiol 79: 3185-3192.
30. Parsons S. D. C., Drewe J. A., Gey van Pittius N. C., Warren R. M., van Helden P. D. (2013): Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. Emer Infect Dis 19: 2004-2007.
31. Pattyn S. R. (1994): Leprosy (Hansen's disease). In: Beran, G. W., Steele J. H (Eds.) Handbook of Zoonoses, Section A: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial and Mycotic, CRC Press, Boca Raton, Florida. 191 - 199.
32. Pfyffer G. E., Auckenthaler R., van Embden J. D. A., van Soolingen D. (1998): *Mycobacterium canetti*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. Emerg Infect Dis 4: 631-634.
33. Quinn P. J., Markey B. K., Leonard F. C., Fitzpatrick E.S., S. Fanning, Hartigan P. J. (2011): Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Publishing, Oxford. *Mycobacterium* species, 250-262.
34. Simons S., Van Ingen J., Hsueh P. R., Van Hung N., Dekhuijzen P. N., Boeree M. J., van Soolingen D. (2011): Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. Emerg Infect Dis 17: 343-349.
35. Sinha P., Gupta A., Prakash P., Amupurba S., Tripathi R., Srivastara G. N. (2016): Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from non-tubercular mycobacteria by nested multiplex PCR targeting IS6110, MTP40 and 32 kD alpha antigen encoding gene fragments. BMC Infect Dis 16: 123-132.

36. Smith I. (2003): *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 16: 463-496.
37. Tell L. A., Woods L., Cromie R. L. (2001): Mycobacteriosis in birds. Rev Sci Tech 20: 180-203.
38. Tortoli E. (2014): Microbiology features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. Clin Microbiol Rev 27: 727-752.
39. Van Ingen J., van Soolingen D. (2011): Cervico-facial lymphadenitis caused by nontuberculous mycobacteria; host, environmental or bacterial factors? Int J Pediatr Otorhinolaryngol 75: 722-723.
40. Van Ingen J., Rahim Z., Mulder A., Boeree M. J., Simeone R., Brosch R., van Soolingen D. (2012): Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. Emerg Infect Dis 18: 653-655.
41. Van Ingen J. (2013): Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. Semin Respir Crit Care Med 34: 103-109.
42. Van Soolingen D., Hoogenboezem T., De Haas P. E. W., Hermans P. W. M., Koedam M. A., Teppema K. S., P. J. Brennan, Besra G. S., Portaels F., Top J., Schouls L. M., Van Embden J. D. (1997): A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol 47: 1236-1245.
43. Van der Werf M. J., Ködmön C., Katalinić-Janković V., Kummik T., Soini H., Richter E., Papaventsis D., Tortoli E., Perrin M., van Soolingen D., Žolnir-Dovč M., Ostergaard Thomsen V. (2014): Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. BMC Infect Dis 14, 62. Doi. 10.1186/1471-2334-14-62.
44. Walker S. L., Lockwood D. N. J. (2007): Leprosy. Clin Dermatol 25: 165-172.
45. Žolnir-Dovč M., Pate M. (2015): Netuberkulozne mikobakterije kao zoonoze - koliko znamo o njima?. Znanstveno- stručni simpozij: "Klasične bakterijske i parazitarne zoonoze- što nas očekuje?". HAZU (Zagreb, 22.10. 2015.). Zbornik radova, str. 12-18.
46. Žmak, Lj., Janković M., Obrovac M., Katalinić-Janković V. (2013): Netuberkulozne mikobakterije. Infektološki glasnik 33: 95-101.

Paper received: 23.04.2018.

Paper accepted: 24.10.2018.

DOI 10.7251/VETJ1802370V

UDK 616.5-006.6:636.7.09

Originalni naučni rad

HISTOLOŠKI I IMUNOHISTOHEMIJSKI PARAMETRI BITNI ZA KLASIFIKACIJU MASTOCITOMA PASA^{1*}

Ivana Vučićević^{1*}, Darko Marinković¹, Vladimir Kukolj¹, Slađan Nešić¹, Milan
Aničić¹, Sanja Aleksić-Kovačević¹

¹ Katedra za patološku morfologiju, Fakultet veterinarske medicine,
Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

* Korespondentni autor: Ivana Vučićević, e-mail adresa: ivucicevic@gmail.com

Kratak sadržaj: Mastocitomi su najučestaliji tumori kože pasa. Vode poreklo iz kostne srži, a zbog vrlo promenljivog biološkog ponašanja je predloženo nekoliko kriterijuma za njihovu klasifikaciju, uključujući histološku gradaciju i markere proliferacije ćelija. Mitotski indeks, prisustvo višejedarnih ćelija, ćelija sa bizarnim jedrom i kariomegalija su najvažniji parametri za klasifikaciju mastocitoma pasa na mastocitome visokog i niskog stepena maligniteta. Za potvrdu stepena maligniteta mastocitoma bitno je utvrditi i ekspresiju transmembranskog receptora kinaza tipa (KIT) koji igra značajnu ulogu u rastu i diferencijaciji mastocita, a koga kodira c-KIT protoonkogen. Kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, osim membranske ekspresije KIT receptora, može se uočiti i aberantna citoplazmatska ekspresija. Ispitana su ukupno 52 mastocitoma pasa i 12 uzoraka nepromenjene kože pasa. Uzorci kože fiksirani u formalinu i ukalupljeni u parafinu su obojeni hematoksilin-eozinom. Ekspresija KIT receptora je ispitana primenom imunohistohemijske metode bojenja. Klasifikacija mastocitoma na mastocitome visokog i niskog stepena maligniteta je izvršena prema kriterijumima Kiupel-ove dvostepene klasifikacije, uzimajući u obzir i ekspresiju KIT receptora. Od ukupno 52 mastocitoma pasa 16 je bilo niskog stepena maligniteta, dok je 36 klasifikovano kao mastocitomi visokog stepena maligniteta, od kojih 19 mastocitoma pokazuje citoplazmatsku ekspresiju KIT receptora. Kod svih 16 mastocitoma niskog stepena maligniteta ispoljena je samo membranska ekspresija KIT proteina. Činjenica da je kod većine mastocitoma visokog stepena maligniteta ispoljena ekspresija KIT receptora u citoplazmi potvrđuje vezu između aberantne ekspresije KIT receptora i povećane ćelijske proliferacije. Prisustvo mitotskih figura, višejedarnih ćelija, bizarnih jedara i kariomegalije, kao i

^{1*} Презентован на 23. Годишњем савјетовању доктора ветеринарске медицине Републике Српске (БиХ).
Теслић, 6-9- јуна 2018.

tip ekspresije KIT receptora predstavljaju ključne prognostičke parametre kod pasa sa mastocitomima.

Ključne reči: psi, mastocitom, klasifikacija, KIT receptor

UVOD

Mastocitomi su najčešći okrugloćelijski tumori kod pasa, koji ujedno predstavljaju najučestalije tumore kože kod ove životinjske vrste (Welle i sar., 2008). Prema poreklu, mastocitomi pripadaju grupi mezenhimskih tumora kože i mekih tkiva (Hendrick i sar., 1998). Sastavljeni su od različito diferentovanih mastocita koji se uočavaju kao okrugle ćelije sa različitom količinom granula u citoplazmi, poređane u redove ili grupe (Strefezzi i sar., 2009; Jovanović i sar., 2012). Mastocitomi se kod pasa najčešće sreću na trupu (50-60%), ekstremitetima (25 - 40%), glavi i vratu (10%). Na skrotumu, medici, leđima i repu tumor se ređe sreće (Welle i sar., 2008). Makroskopski izgled mastocitoma varira od stepena diferentovanosti. Dobro diferentovani mastocitomi se najčešće pojavljuju kao nodularne, nekapsulirane mase gumaste konzistencije, iznad kojih su polja kože bez dlake. Veličina varira od 1 do 4 cm u prečniku a klinički podsećaju na lipom. Slabije diferentovani mastocitomi imaju tendenciju bržeg rasta, manje su ograničeni i često praćeni inflamacijom i edemom okolnog tkiva (Jubb i sar., 2007). Na njihovoj površini mogu nastati ulceracije, dok se u blizini mogu razviti manji čvorići, tzv. satelitski noduli. Većina mastocitoma nije pigmentisana,

ali se kao povremen nalaz mogu uočiti eritematozni i hiperpigmentisani noduli (Welle i sar., 2008). Lezije na distalnim delovima ekstremiteta, usnama i u području prepona mogu biti u vidu slabo definisanih otoka ili nalik dermatitisu uzrokovanom lizanjem (acral lick dermatitis, eng.) (Gross i sar., 2005; Welle i sar., 2008). Maligni mastocitomi mogu metastazirati putem limfe ili krvi i u većini slučajeva, prvi znak metastaze je uvećanje regionalnog limfnog čvora. Metastaze mastocitoma na plućima su retke, dok se uglavnom javljaju na slezini, jetri i bubrezima, a mogu se često dijagnostikovati i na koži (Morris i sar., 2001).

Etiologija mastocitoma nije u potpunosti poznata, ali se smatra da je, kao i kod većine tumora, multifaktorijalna. Predispozicija pojedinih rasa govori u prilog značaja genetske komponente u nastanku mastocitoma (Welle i sar., 2008). Noviji radovi ističu ulogu površinskog receptora tirozin kinaze (KIT protein, CD117) u etiologiji mastocitoma (Vucicevic i sar., 2016; Halsey i sar., 2017).

Dijagnoza mastocitoma postavlja se na osnovu citoloških bojenja preparata dobijenih pravljenjem razmaza dobijenog biopsijom tumora iglom ili

pravljenja otisak preparata tkiva tumora. Od metoda bojenja, najčešće se koriste Romanowsky tip bojenja (npr. *Diff-Quik*, *Giemsa*, *Wright's*) ili New Methylene Blue (London i sar., 2003; Strefezzi i sar., 2009). Dok se na osnovu citoloških bojenja može utvrditi da li je u pitanju mastocitom, za klasifikaciju tumora je neophodan histopatološki pregled biopsiranog tkiva (Bostock, 1973; Patnaik i sar., 1984; Kiupel i sar., 2011). Diferencijalnodijagnostički, mastocitomi (naročito slabo diferentovani) se mogu zameniti sa drugim okruglo-ćelijskim tumorima (limfomom, plazmocitomom, histiocitomom i transmisivnim veneričnim tumorom) (Welle i sar., 2008; Oliveira i sar., 2012). U svrhu potvrđivanja dijagnoze mastocitoma i razlikovanja od drugih okrugloćelijskih tumora koristi se toluidin plavo (*toluidin blue* - TB, eng.) bojenje za vizuelizaciju citoplazmatskih granula (London i sar., 2003; Strefezzi i sar., 2009).

Klasifikacija mastocitoma je veoma bitna sa prognostičkog aspekta i izbora terapije. Primarna klasifikaciona determinanta je histološka građa mastocitoma. U novije vreme, koristi se dvostepeni sistem klasifikacije na mastocitome visokog i niskog stepena maligniteta. Na osnovu ove podele, mastocitomi visokog stepena maligniteta moraju imati ispunjen najmanje jedan od sledećih kriterijuma: najmanje 7 mitotskih figura na 10 hpf (*High-power Fields* – hpf, eng.), najmanje 3 multinuklearne ćelije na 10 hpf, najmanje 3 bizarna jedra na 10 hpf ili prisustvo

kariomegalije kod najmanje 10% neoplastičnih ćelija (Kiupel i sar., 2011). Predloženi dvostepeni sistem gradiranja trebao bi da se koristi pri svakom rutinskom histološkom ispitivanju i dijagnostikovanju mastocitoma. Za mastocitome visokog stepena maligniteta treba primeniti dodatna ispitivanja, kao što su određivanje ekspresije KIT receptora i skrining na c-KIT mutacije, kako bi se odredila adekvatna terapija (Kiupel i sar., 2011, Sabbatini i sar., 2014).

KIT protein je receptor za faktor rasta matične ćelije i normalno se nalazi na površini hematopoetskih ćelija i mastocita, igrajući značajnu ulogu u rastu i diferencijaciji ovih ćelija. KIT receptor je transmembranski receptor kinaza tip III koga kodira c-KIT protoonkogen. Ekspresija KIT receptora dokazana je imunohistohemijskim bojenjem, kako na površini normalnih, tako i na površini neoplastično transformisanih mastocita pasa. Povećana ekspresija zabeležena je kod slabo diferentovanih i nediferentovanih mastocitoma (Welle i sar., 2008; El-Agamy, 2012). Izuzev membranske ekspresije, opisana je ekspresija KIT proteina fokalno i difuzno u citoplazmi. Tip I ekspresije KIT receptora se karakteriše prebojavanjem membrane mastocita usled lokalizacije KIT proteina u membrani ćelija, dok je prebojavanje citoplazme prisutno u maloj meri ili potpuno izostaje. Tip II ekspresije se karakteriše difuznim prebojavanjem citoplazme. Tip III ekspresije je takođe vezan za prisustvo KIT proteina u

citoplazmi naoplastičnih mastocita i karakteriše se intenzivnim fokalnim prebojavanjem citoplazme neoplastičnih mastocita. Poremećaji u ekspresiji mogu doprineti neoplastičnoj transformaciji (Misdorp, 2004; Takeuchi i sar., 2010). Povećano prisustvo KIT receptora u citoplazmi (fokalno ili difuzno) je u korelaciji sa kraćim preživljavanjem pasa sa mastocitomom, kao i sa kraćim

intervalom do remisije bolesti u odnosu na mastocitome kod kojih je povećana ekspresija membranskih KIT receptora (Webster i sar., 2004).

Cilj našeg ispitivanja je da odredimo vezu između lokalizacije KIT receptora na malignim mastocitima i histološkog stepena posmatranog mastocitoma kod pasa.

MATERIJAL I METODE

Životinje

Ispitivanjima su obuhvaćeni isečci kože 52 psa kod kojih je kliničkim pregledom postavljena sumnja na mastocitom. Isečci nepromenjene kože 12 odraslih pasa, uzorkovani na obdukciji, služili su kao kontrola. Psi različite rase i pola, uzrasta od 3 do 11 godina, poticali su sa teritorije Republike Srbije. Histopatološka dijagnoza kod ovih pasa postavljena je na Katedri za patološku morfologiju, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

Histopatologija

Neposredno nakon biopsije tumora kože pasa, uzorci su fiksirani u 10% neutralnom puferizovanom formalinu ne duže od 48 sati, posle čega su procesovani u automatskom tkivnom procesoru LEICA TP1020. Parafinski blokovi su sečeni pomoću mikrotoma LEICA RM 2235 na tkivne isečke debljine 3-5 μm . Dobijeni preparati su bojeni hematoksilin-eozin (HE) metodom. Na preparatima bojenim hematoksilin-

eozinom postavljena je preliminarna patohistološka dijagnoza mastocitoma, a za njenu potvrdu, preparati su dalje bojeni TB metodom.

Histopatološke osobine tumora, kao što su prisustvo mitoz, multijedarnih ćelija, bizarnih jedara i kariomegalije analizirani su na preparatima bojenim hematoksilin-eozinom. Broj navedenih parametara određivan je na deset vidnih polja svakog tumora, pri uveličanju 400 puta primenom metode opisane od strane Romansik i sar. (2007). Na osnovu navedenih parametara, tumori su razvrstani u dva stepena diferentovanosti – tumore visokog stepena maligniteta i na tumore niskog stepena maligniteta.

Imunohistohemijsko bojenje

U formalinu fiksirani i u parafinu ukalupljeni tkivni uzorci sečeni su na 5 mm tanke isečke koji su zatim bojeni primenom višestepene indirektno imunohistohemijske (IHC) tehnika. Isečci su inkubirani sa primarnim antitelom CD117 (polyclonal rabbit anti-human antibody (DAKO, A4502))

razblaženim fosfatnim puferom (PBS) u odnosu 1:400. Imunorekcija je vizualizovana upotrebom DAB + (3,3'-diaminobenzidinom tetrahidrohlorid, DAKO, K3468). Za kontrastiranje korišćen je Majerov hematoksilin. Korišćene su odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole.

Morfometrijska analiza

Za morfometrijska ispitivanja korišćen je morfometrijski softver Olympus Cell B, uz upotrebu kamere Olympus Color View III. Lokalizacija KIT proteina je određena na način opisan u istraživanju Webster i sar. (2007), s obzirom na to da se razlikuju membranski KIT proteini i dve vrste citoplazmatskih KIT proteina - fokalno i difuzno raspoređeni u citoplazmi. Koji od KIT proteina preovlađuje, određivano je na osnovu prisustva kod najmanje 10% neoplastičnih ćelija tumora. Ćelije na ivici tumora nisu uzimane u razmatranje.

Statistička analiza

U statističkoj analizi dobijenih rezultata, kao osnovne statističke metode, korišćeni su deskriptivni parametri, kao što su aritmetička sredina i standardna devijacija. Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički značajnih razlika korišćen je χ^2 test. Pomoću ovih testova utvrđivano je postojanje statistički signifikantne razlike između ispitivanih parametara na nivou značajnosti od 5% i 1%.

Rezultati

Histološkom analizom isečaka mastocitoma bojenih hematoksilin-eozinom kod 53,85% mastocitoma uočeno je više od šest mitotskih figura na 10 hpf (slika 1a), dok se 46,15% mastocitoma odlikovalo slabijom mitotskom aktivnošću.

Prisustvo više od dve multinuklearne ćelije na 10 hpf bilo je uočeno kod 59,61% mastocitoma (slika 1b). Kod 17,31% mastocitoma su bile prisutne po dve multinuklearne ćelije, dok je kod 19,23% mastocitoma bila uočena po jedna multinuklearna ćelija na istom broju vidnih polja. Multinuklearne ćelije nisu bile uočene kod 3,85 % mastocitoma.

Više od dve ćelije sa bizarnim jedrom na 10 hpf bile su prisutne kod 55,77% mastocitoma (slika 1c). Dve ćelije sa bizarnim jedrom na istom broju vidnih polja bile su uočene kod 7,69% mastocitoma, dok je po jedna ćelija sa bizarnim jedrom bila prisutna kod 26,92% mastocitoma. Kod 9,61% mastocitoma nisu bile uočene ćelije sa bizarnim jedrima.

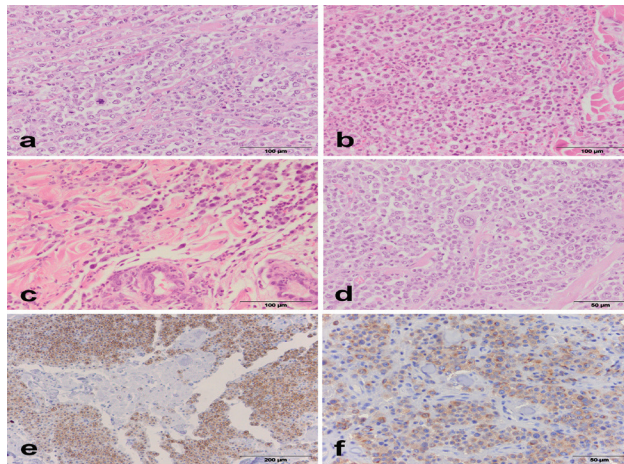
Više od 10% anaplastičnih mastocita sa jedrima promera oko 8-10 mikrometara bilo je uočeno kod 19,23% mastocitoma, dok je 42,30% mastocitoma sadržalo manje od 10% ćelija sa povećanim jedrom (slika 1d). Kod 38,46% mastocitoma nije bila prisutna kariomegalija

Na osnovu kriterijuma Kiupelove klasifikacije mastocitoma i ustanovljenih parametara (mitotski indeks, multijedarne ćelije, bizarna jedra i

kariomegalija) kod dijagnostikovanih mastocitoma, uočilo se da je 36 (69,23%) mastocitoma odgovaralo mastocitomima višeg stepena maligniteta, dok je 16 (30,77%) mastocitoma bilo nižeg stepena maligniteta.

Imunohistohemijskim bojenjem potvrđeno je prisustvo KIT receptora u isečcima tkiva kože pasa sa mastocitomom. Mikroskopskim pregledom preparata uočavaju se tri tipa imunohistohemijskog bojenja mastocita pozitivnih na KIT protein. Većina mastocitoma u ovom ispitivanju imala je tip I ekspresije KIT receptora, odnosno membransku ek-

spresiju (63,46%) (Slika 1e). Ovoj grupi su pripadali svi mastocitomi niskog stepena maligniteta i 17 od 36 mastocitoma visokog stepena maligniteta. Tip II ekspresije bio je prisutan kod 21,15% mastocitoma (Slika 1f) od kojih su svi bili visokog stepena maligniteta. Nijedan od pregledanih mastocitoma nije imao samo tip III ekspresije, ali su se uočavali kombinovani tipovi ekspresije, i to: 11,54% mastocitoma je ispoljavalo membranski i fokalni citoplazmatski tip ekspresije, dok je 3,85% mastocitoma imalo membranski i difuzni citoplazmatski tip ekspresije KIT proteina.



Slika 1. Koža, pas: a) Prisustvo mitotskih figura kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE; b) Prisustvo multijedarnih ćelija kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE; c) Prisustvo ćelija sa bizarnim jedrom kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE; d) Prisustvo kariomegalije kod mastocitoma visokog stepena maligniteta, HE; e) Ekspresija KIT receptora, tip I (membranski) ekspresije, CD117, LSAB2; f) Ekspresija KIT receptora, tip II (difuzni citoplazmatski) ekspresije, CD117, LSAB2;

DISKUSIJA

Mastocitomi predstavljaju najučestalije tumore kože pasa, naročito kada se radi o pojedinim rasama kao što su bokser, zlatni retriever, labrador retriever i drugi (Welle i sar., 2008). Na osnovu rezultata dobijenih u našem istraživanju najveća učestalost mastocitoma uočena je kod pasa rase zlatni retriever (37,5%), a zatim kod pasa rase bokser (20.7%). Slično ovim rezultatima, većina autora navodi da su mastocitome najčešće dijagnostikovali kod pasa rase bokser (London i sar., 2003; Webster i sar., 2006a; Gil da Costa i sar., 2007; Welle i sar., 2008, Vučićević i sar., 2018). Drugi smatraju da iako bokseri imaju povećan rizik od nastanka mastocitoma, kod njih se uglavnom javljaju mastocitomi niskog stepena maligniteta koji imaju povoljniju prognozu (Thamm i sar., 2007).

Histološka građa se čini najdoslednijim prediktivnim parametrom i u bliskoj je vezi sa dvostepenim sistemom klasifikacije mastocitoma koji je predložio Kiupel (Kiupel i sar., 2011) prema kome se mastocitomi dele na mastocitome visokog i niskog stepena maligniteta. Prema kriterijumima dvostepene klasifikacije, mastocitomi pregledani u okviru našeg istraživanja klasifikovani su u mastocitome visokog i mastocitome niskog stepena maligniteta. Od ukupno 52 mastocitoma pasa, trideset šest pripada mastocitomima visokog stepena maligniteta, dok šesnaest mastocitoma ima morfološke karakteristike koje ukazuju na nizak stepen maligniteta. Više

od šest mitotskih figura na 10 hpf uočeno je kod 77,78% mastocitoma visokog stepena maligniteta, te se prisustvo mitotskih figura smatra statistički značajnim parametrom za klasifikaciju mastocitoma u ovom ispitivanju. Dok pojedini autori smatraju da i mastocitomi nižeg stepena maligniteta, mogu da metastaziraju, te da određivanje samo mitotskog indeksa nije pouzdan način predviđanja ponašanja tumora (Séguin i sar., 2006; Webster i sar., 2007), drugi autori smatraju da je mitotska aktivnost ključna osobina za prognozu ponašanja mastocitoma (Romansik i sar., 2007; Kiupel i sar., 2011). Pojedini autori smatraju da se smrtnost povećava već u slučajevima kada je mitotski indeks veći od 5/10 hpf (O'Connell i Thomson, 2011).

Prisustvo više od dve multinuklearne ćelije na 10 hpf uočeno je kod 86,11% mastocitoma visokog stepena maligniteta, što ukazuje da je ovo statistički značajan pokazatelj klasifikacije mastocitoma. Neka ispitivanja ukazuju da postoji značajna povezanost između broja multinuklearnih ćelija u mastocitomu i vremena preživljavanja pasa, tako da se vreme preživljavanja pasa smanjivalo sa povećanjem broja multinuklearnih ćelija (Thompson, 2012).

U našem ispitivanju uočeno je prisustvo više od dve ćelije sa bizarnim jedrom na 10 hpf kod 86,11% mastocitoma višeg stepena maligniteta, dok kod mastocitoma niskog stepena maligniteta nije zabeleženo prisustvo multinuklearnih ćelija.

Takođe, je uočeno da 27,78% mastocitoma visokog stepena maligniteta sadrži više od 10% anaplastičnih mastocita sa jedrima promera oko 8-10 mikrona, što ukazuje na to da se kariomegalija ne može razmatrati kao značajan prediktivni faktor u ovoj studiji.

Postoji značajna korelacija između mastocitoma visokog stepena maligniteta i bržeg javljanja metastaza, kao i kraćeg vremena preživljavanja pacijenata (Kiupel i sar., 2011; Stern, 2012). Stoga, za mastocitome visokog stepena maligniteta treba primeniti dodatna ispitivanja, kao što su određivanje ekspresije KIT receptora i skrining na c-KIT mutacije, kako bi se odredila adekvatna terapija.

Novija istraživanja ukazuju na postojanje, kako normalnih (membranskih), tako i aberantnih citoplazmatskih (fokalnih i difuznih) KIT receptora na mastocitima pasa (Morini i sar., 2004; Gil da Costa i sar., 2007). Za razliku od ranijih istraživanja (Reguera i sar., 2000) koja proučavaju odnos između intenziteta imunohistohemijskog bojenja koji ukazuje na stepen ekspresije KIT proteina i stepena maligniteta tumora, naša studija istražuje povezanost ekspresije aberantnih tipova KIT proteina i histopatološkog stepena mastocitoma. U ispitivanju koje smo sprovedi, uočava se da kod svih mastocitoma niskog stepena maligniteta postoji isključivo membranski tip ekspresije KIT receptora, dok se kod mastocitoma visokog stepena maligniteta pored membranskog tipa ekspresije, javljaju i aberantni tipovi ekspresije KIT proteina. Iz naših rezultata se uočava da

kod mastocitoma niskog stepena maligniteta nema aberantne ekspresije KIT receptora. Naime, nijedan od aberantnih tipova ekspresije se ne izdvaja kao statistički značajan u odnosu na ostale aberantne tipove ekspresije KIT proteina. Međutim, jasna je povezanost aberantnih tipova ekspresije CD117 receptora i stepena maligniteta tumora. Pojedini autori navode da je KIT receptor transmembranski protein, i kao takav, imunoreaktivnost ovog proteina je lokalizovana na citoplazmatskoj membrani nepromenjenih mastocita. Rezultati ispitivanja potvrđuju da što mastocitomi pasa imaju agresivnije biološko ponašanje, to imaju i veću ekspresiju KIT proteina u citoplazmi mastocita (Kiupel i sar., 2004). Takođe, isti autori smatraju da mastocitomi pasa sa povećanom ekspresijom KIT proteina u citoplazmi neoplastičnih mastocita, imaju povećan rizik od lokalnog recidiva i kraće vreme preživljavanja. Neki autori naglašavaju da postoji jaka korelacija između citoplazmatske (aberantne) imunoekspresije KIT proteina i povećane ćelijske proliferacije, a samim tim i višeg stepena maligniteta, ali da nisu uočili značajne razlike između fokalne i difuzne citoplazmatske ekspresije CD117 receptora, što sugerise da fokalna i difuzna citoplazmatska ekspresija KIT proteina možda odražavaju slične ćelijske promene. Poznato je da se citoplazmatska ekspresija KIT receptora dovodi u vezu i sa nekrotičnim i ulceroznim promenama. Naime, citoplazmatska ekspresija KIT receptora je u vezi sa povećanom proliferacijom mastocita, a pojava nekroza u mastocitomu može biti

odraz povećane ćelijske proliferacije koju nije u mogućnosti da isprati odgovarajuća angiogeneza. S druge strane, korelacija između citoplazmatska ekspresije KIT receptora i pojave epidermalnih ulcera-

cija može biti posledica KIT – posredovanog oslobađanja histamina i serotonina, što uzrokuje intenzivan svrab (Gil da Costa i sar., 2007).

ZAKLJUČAK

U novije vreme kao najbitniji prediktivni faktori smatraju se prisustvo mutacija c-kit protoonkogena i aberantna ekspresija KIT proteina. Međutim, pojedini radovi navode da se aberantna KIT ekspresija može uočiti i kod mastocitoma visokog stepena maligniteta kod ko-

jih nije detektovano prisustvo mutacija (Webster i sar., 2006, Vucicevic i sar., 2016). Stoga, bi određivanje ekspresije KIT proteina trebalo da bude deo rutinske dijagnostike i klasifikacije mastocitoma kod pasa.

LITERATURA

1. Bostock D.E., Crocker J., Harris K., Smith P (1989): Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *British Journal of Cancer* 59(6): 915–18.
2. El-Agamy D.S (2012): Targeting c-KIT in the therapy of mast cell disorders: current update. *European Journal of Pharmacology* 690(1-3): 1-3.
3. Gil da Costa R.M., Matos E., Rema A., Lopes C., Pires M.A., Gartner F (2007): CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Veterinary Research* 21(3): 19.
4. Gross T.L., Ihrke P., Walder E.J., Affolter V.K (2005): Mast cell tumors. *Skin Diseases of the Dog and Cat Clinical and Histopathologic Diagnosis*. 2nd edn. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd 853–65.
5. Halsey C.H.C., Thamm D.H., Weishaar K.M., Burton J.H., Charles J.B., Gustafson D.L., Avery A.C., Ehrhart E.J (2017): Expression of Phosphorylated KIT in Canine Mast Cell Tumor. *Veterinary Pathology* 54(3): 387-394.
6. Hendrick M.J., Mahaffey E.A., Moore F.M., Vos J.H., Walder E.J (1998): Mast cell tumors. In: *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, Histological Classification of Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues of Domestic Animals*. 2nd series, ed. Schulman FY, 28–29. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC.

7. Jovanović M., Aleksić-Kovačević S., Knežević M (2012): Specijalna veterinarska patologija, Makarije d.o.o., Beograd.
8. Jubb, Kennedy, Palmer (2007): Pathology of Domestic Animals, Saunders Elsevier, 5th edition, 771-73.
9. Kiupel M., Webster J.D., Kaneene J.B., Miller R., Yuzbasiyan-Gurkan V (2004): The use of kit and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors Vet Pathol 41(4): 371-77.
10. Kiupel M., Webster J.D., Bailey K.L., Best S., DeLay J., Detrisac C.J. i sar. (2011): Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. Veterinary Pathology 48(1): 147-55.
11. London C.A., Seguin B (2003): Mast cell tumors in the dog. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice 33(3): 473-89.
12. Misdorp W (2004): Mast cells and canine mast cell tumours: a review. Veterinary Quarterly 26(4): 156-69.
13. Morris J., Dobson J (2001): Small Animal Oncology. Blackwell Science 59-62.
14. O'Connell K., Thomson M (2011): Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. Veterinary and Comparative Oncology 11(1): 51-62.
15. Oliveira F.N., Elliott J.W., Lewis B.C., Mathews G.G., Brown R.M., Treadway C.M., Langohr I.M (2013): Cutaneous Mast Cell Tumor With Epitheliotropism in 3 Dogs. Veterinary Pathology 50(2): 234-37.
16. Patnaik A.K., Ehler W.J., MacEwen E.G (1984): Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. Veterinary Pathology 21(5): 469-74.
17. Reguera M.J., Rabanal R.M., Puigdemont A., Ferrer L (2000): Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. Am J Dermatopathol 22(1): 49-54.
18. Romansik E.M., Reilly C.M., Kass P.H., Moore P.F., London C.A (2007): Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. Vet Pathol 44(3): 335-41.
19. Sabbatini S., Scarpa F., Berlato D., Bettini G (2014): Histologic grading of canine mast cell tumor: Is 2 better than 3?. Vet. Pathol 52(1): 70-3
20. Seguin B., Besancon M.F., McCallan J.L. i sar. (2006): Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). J Vet Intern Med 20: 933-940.

21. Stern W.A (2012): Histologic Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Is There a Good System?. *J Vet Sci Med Diagn* 1: 1.
22. Strefezzi R.F., Kleeb S.R., Xavier J.G., Catao-Dias J.L (2009): Prognostic indicators for mast cell tumors. *Bray J Vet Pathol* 2: 110-21.
23. Takeuchi Y., Fujino Y., Watanabe M., Nakagawa T., Ohno K., Sasaki N., Sugano S., Tsujimoto H (2010): Aberrant autophosphorylation of c-KIT receptor in canine mast cell tumor cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol* 137(3-4): 208-16.
24. Thamm D.H., Vail D.M: Mast cell tumors, In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors (2007): *Small Animal Clinical Oncology*, Saunders, Philadelphia.
25. Thompson J.J (2012): Canine Mast Cell Tumours: Characterization of Subcutaneous Tumours and Receptor Tyrosine Kinase Profiling. PhD Thesis, Guelph, Ontario, Canada.
26. Vučićević, I., Marinković, D., Kukolj, V., Nešić, S., Aničić, M., Aleksić-Kovačević, S (2016): Kit receptor expression in canine cutaneous mast cell tumours (CMCTS) without c-kit mutation. *Acta Veterinaria-Beograd* 66 (2): 222-233
27. Vučićević I., Marinković D., Kukolj V., Nešić S., Aničić M., Aleksić-Kovačević S (2018): Mast cell tumor within a lipoma in a white toy poodle. *Veterinarski Glasnik*, 72 (1): 64-67.
28. Webster J.D., Kiupel M., Kaneene J.B., Miller R., Yuzbasiyan-Gurkan V (2004): The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 41(4): 371-7.
29. Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Kaneene J.B., Miller R., Resau J.H., Kiupel M., (2006): The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 8(2): 104-11.
30. Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R.A., Kaneene J.B., Kiupel M (2007): Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology* 44(3): 298-308.
31. Welle M.M., Rohrer C.B., Howard J., Rüfenacht S (2008): Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology* 19(6): 321-39.

Rad primljen: 30.04.2018.

Rad prihvaćen: 11.10.2018.

DOI 10.7251/VETJEN1802370V

UDK 616.5-006.6:636.7.09

Original scientific paper

IMPORTANT HISTOLOGICAL AND IMMUNOCHEMICAL PARAMETERS FOR CLASSIFICATION OF CANINE MAST CELL TUMORS^{2*}

Ivana Vučićević^{1*}, Darko Marinković¹, Vladimir Kukolj¹, Slađan Nešić¹, Milan
Aničić¹, Sanja Aleksić-Kovačević¹

¹ Department for Pathological Morphology, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Belgrade, Belgrade, Serbia

* Corresponding Author: Ivana Vučićević, e-mail address: ivucicevic@gmail.com

Abstract: Mast cell tumors (MCTs) are one of the most common neoplasms in dogs. They originate from the bone marrow. Several criteria have been proposed for their classification, including histological grading and cell proliferation markers. The mitotic index, multiple nuclei, cells with bizarre nuclei and karyomegaly are the most important parameters for the classification of MCTs on high and low-grade malignancy. For the confirmation of MCT malignancy grade it is also important to determine the expression of the transmembrane kinase (KIT) receptor that has a significant role in the growth and differentiation of mast cell tumors. In high-grade malignancy MCTs in addition to membrane expression of the KIT receptor, aberrant cytoplasmic expression can be also observed. Fifty-two MCTs and 12 control samples of skin from dogs without MCTs were examined. Routinely processed tissue samples were stained with hematoxylin-eosin. Expression of KIT receptor was tested immunohistochemically. The classification of MCTs on high and low-grade malignancy was performed according to the Kiupel's 2-tier classification and the expression of KIT receptors. Sixteen of 52 MCTs were of a low-grade malignancy, while thirty-six were classified as a high-grade malignancy of which 19 MCTs showed aberrant cytoplasm labelling of KIT receptor. All 16 low-grade malignancy MCTs had only membrane expression of KIT receptor. Most high-grade malignancy MCTs showed cytoplasmic KIT expression indicating the link between aberrant KIT expression and increased cell proliferation. The presence of mitotic figures, multinucleated cells, bizarre nuclei and karyomegaly, as well as KIT receptor

^{2*} Presented at the 23rd Annual Consulting of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (B&H).
Teslic, June 6-9, 2018

expression pattern are the most important prognostic factors in dogs with mast cell tumor.

Key words: *dogs, mast cell tumor, classification, KIT receptor*

INTRODUCTION

Mast cell tumors are the most common round cell tumors in dogs, and at the same time are the most common skin tumors in this animal species (Welle et al., 2008). Mast cell tumors belong to a group of mesenchymal tumors of the skin and soft tissues (Hendrick et al., 1998). They are composed of differentiated mast cells, which are seen as round cells with different amounts of granules in the cytoplasm, sorted into rows or groups (Strefezzi et al., 2009; Jovanović et al., 2012). Mast cell tumors in dogs are most commonly found on the trunk (50-60%), extremities (25-40%), head and neck (10%). This tumor is less common on scrotum, perineum, back and tail (Welle et al., 2008). The macroscopic appearance of mast cell tumors varies from the degree of differentiation. Well-differentiated mast cell tumors are most commonly present as nodular, nonencapsulated rubber-like mass, above which the areas of the skin are hairless. The size varies from 1 to 4 cm in diameter and they clinically resembles lipoma. Poorly differentiated mast cell tumors have a tendency for faster growth, they are less limited and often accompanied by inflammation and edema of the surrounding tissue (Jubb et al., 2007). Ulceration may occur on their surface, while smaller nodes (satellite nodules) may develop nearby. Most

mast cell tumors are not pigmented, but erythematous and hyperpigmented nodules (Welle et al., 2008) can be observed in occasional findings. The lesions at the distal parts of the limbs, the lips and the groin area may be in the form of poorly defined swellings or resembling acral lick dermatitis (eng.) (Gross et al., 2005; Welle et al., 2008). Malignant mast cell tumors can spread through lymph or blood, and in most cases, the first sign of metastasis is the enlargement of the regional lymph node. Spread to the lungs is not common, while they will most likely spread to the spleen, liver and kidneys. Also they can often be diagnosed on the skin (Morris et al., 2001).

Etiology of mast cell tumors is not fully known, but it is considered, as with most tumors, to be multifactorial. The predisposition of certain breeds shows the importance of genetic in the appearance of MCTs (Welle et al., 2008). Recent papers also emphasize the role of surface receptor tyrosine kinase (KIT protein, CD117) (Vucicevic et al., 2016; Halsey et al., 2017). The diagnosis of mast cell tumors is based on the staining of cytologic smears obtained by fine needle biopsy or by using the impression smears technique. The most commonly used staining methods are Romanowsky

staining (eg Diff-Quik, Giemsa, Wright's) or New methylene blue (London et al., 2003; Strefezzi et al., 2009). While mast cell tumors can be determined on the basis of cytological staining, a histopathological examination of biopsy tissue is indispensable for tumor classification (Bostock, 1973; Patnaik et al., 1984; Kiupel et al., 2011). Mast cell tumors (especially poorly differentiated ones) can be mistaken for other round-cell tumors (lymphoma, plasmacytoma, histiocytoma and transmissible venereal tumour) (Welle et al., 2008; Oliveira et al., 2012). For the purpose of confirming mast cell tumor diagnosis and differentiation from other tumors, toluidine blue (TB) is used for visualizing cytoplasmic granules (London et al., 2003; Strefezzi et al., 2009).

The classification of mast cell tumors is very important when it comes to disease prognosis and type of therapy. The histological examination of mast cell tumors is the primary classification determinant. More recently, a two-stage classification system for mast cell tumors of high and low malignancy has been used. Based on this division, high malignancy mast cell tumors must meet at least one of the following criteria: at least 7 mitotic figures per 10 hpf (High-power Fields – hpf), at least 3 multinucleated cells in 10 hpf, at least 3 bizarre nuclei in 10 hpf or karyomegaly of at least 10% of neoplastic cells (Kiupel et al., 2011). The proposed 2-tier grading system should be used in any routine histological examination and

diagnosis of mast cell tumors. For high grade malignancy MCTs, additional studies such as determination of KIT receptor expression and c-KIT mutation screening should be performed in order to determine adequate therapy (Kiupel et al., 2011, Sabbatini et al., 2014).

KIT protein is growth factor receptor of stem cell and is normally found on the surface of hematopoietic cells and mast cells, playing a significant role in the growth and differentiation of these cells. This protein is a type III transmembrane receptor encoded by the proto-oncogene c-kit. KIT receptor expression was detected by immunohistochemical staining both on the surface of normal and on the surface of neoplastic mast cells. Increased expression was observed in poorly differentiated and undifferentiated MCTs (Welle et al., 2008; El-Agamy, 2012). Apart from membrane expression, KIT expression was detected focally and diffusely in the cytoplasm.

The KIT-staining patterns are identified as pattern I - membrane-associated staining due to the localization of KIT proteins in the cell membrane while cytoplasmic staining is present in small amounts or completely absent, pattern II - diffuse cytoplasmic staining and pattern III - also relates to the presence of KIT proteins in the cytoplasm of the neoplastic mast cells and is characterized by intense focal cytoplasmic staining. Expression disorders can contribute to neoplastic transformation (Misdorp, 2004; Takeuchi

et al., 2010). The increased cytoplasmic expression of KIT receptors (focal or diffuse) is correlated with shorter survival of dogs with mast cell tumors and shorter intervals for remission of the disease compared to mast cell tumors

with increased membrane expression (Webster et al., 2004). The aim of our study is to determine the link between the localization of KIT receptors and histologic grade of MCTs observed in dogs.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The examinations included skin samples of 52 dogs in which MCT is suspected by clinical examination. Samples of unchanged skin of 12 adult dogs, sampled at autopsy, were used as control. Dogs of different breed and sex, ages 3 to 11, were from the territory of the Republic of Serbia. Histopathologic diagnosis was made at the Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade.

Histopathology

Immediately after the skin tumor biopsy, the samples were fixed in 10% neutral buffered formalin for no more than 48 hours, after which they were processed in the LEICA TP1020 tissue processor. Paraffin blocks were cut using the LEICA RM 2235 microtome into 3-5 μm thick sections. The obtained preparations were stained with hematoxylin-eosin (HE) method. Preliminary pathohistologic diagnosis of MCTs was made on sections stained by hematoxylin-eosin, and for its confirmation, the slides were further stained by toluidin-blue staining kit. Histopathological features of the tumor, such as the presence of mitosis, multinucleated cells, cells with bizarre

nuclei and karyomegaly, were analyzed on slides stained with hematoxylin-eosin. The number of these parameters was determined on ten high power fields of each tumor (400x), using the method described by Romansik et al. (2007). Based on these parameters, the tumors are classified into two levels of differentiation – high grade and low grade tumors.

Immunohistochemical staining

Formalin-fixed paraffin embedded tissue samples were cut into 5 μm thin sections, which were then stained using a multi-step indirect immunohistochemical (IHC) technique. The sections were incubated with a primary antibody CD117 (Rabbit anti-Human Polyclonal Antibody (DAKO, A4502)) diluted with phosphate buffer saline (PBS) in a ratio of 1:400. Immunoreaction was visualized using DAB + (3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride, DAKO, K3468). Mayer's hematoxylin was used for counterstaining. Appropriate positive and negative controls were used.

Morphometric analysis

For morphometric analysis, Olympus Cell B morphometric software and

Olympus ColorView III camera were used. The localization of KIT proteins was determined in the manner described in Webster et al. research (2007), since membrane KIT proteins and two types of cytoplasmic KIT proteins (focally and diffusely distributed in the cytoplasm) differ. -. Dominant KIT protein pattern was determined based on the presence in at least 10% of neoplastic tumor cells. Cells at the edges of the tumor were not taken into consideration.

Statistical analysis

Descriptive parameters, such as arithmetic mean and standard deviation, were used in the statistical analysis of the obtained results. Chi-square test was used to test and determine statistically significant differences. These tests determined the existence of a statistically significant difference between the tested parameters at the significance level of 5% and 1%.

RESULTS

Histological analysis of tissue sections stained with hematoxylin and eosin revealed more than six mitotic figures per 10 hpf in 53.85% of MCTs (Figure 1a), while 46.15% of MCTs were characterized by poor mitotic activity. The presence of more than two multinucleated cells in 10 hpf was observed in 59.61% of MCTs (Figure 1b). In 17.31% of MCTs, two multinucleated cells were present, while one multinucleated cell was observed in 19.23% of MCTs on the same number of visual fields. Multinucleated cells were not observed in 3.85% of MCTs. More than two cells with bizarre nuclei in 10 hpf were present in 55.77% of MCTs (Figure 1c). Two cells with bizarre nuclei on the same number of visual fields were observed in 7.69% MCTs, while one cell with bizarre nuclei was present in 26.92% of MCTs. In 9.61% of MCTs, cells with bizarre nuclei were not detected. More than 10% of anaplastic mast cells with nuclei of about 8-10 micrometers in diameter were observed in 19.23% of MCTs, while 42.30% of MCTs contained

less than 10% of the cells with increased nucleus (Figure 1d). In 38.46% of MCTs no karyomegaly was present.

Based on the criteria of Kiupel's classification and established parameters (mitotic figures, multinucleated cells, bizarre nuclei and karyomegaly,) in diagnosed MCTs, 36 (69.23%) of MCTs corresponded to MCTs of higher malignancy, while 16 (30.77 %) of MCTs were of a lower degree of malignancy. Immunohistochemical staining confirmed the presence of KIT receptors in skin tissue sections of the dogs with MCTs. Microscopic examination of the sections revealed three types of immunohistochemical staining patterns for KIT positive cells. The majority of MCTs in this study had KIT expression pattern I or membrane expression (63.46%) (Figure 1e). This group included all low grade malignancy MCTs and 17 out of 36 high grade malignancy MCTs. Expression pattern II was present in 21.15% mast cell tumors

(Figure 1f), all of which were high grade. None of the examined mast cell tumors had only pattern III, but combined patterns were observed, namely: 11.54%

of MCTs exhibited membrane and focal cytoplasmic expression, while 3.85% of MCTs had membrane and diffuse cytoplasmic expression of KIT receptors.

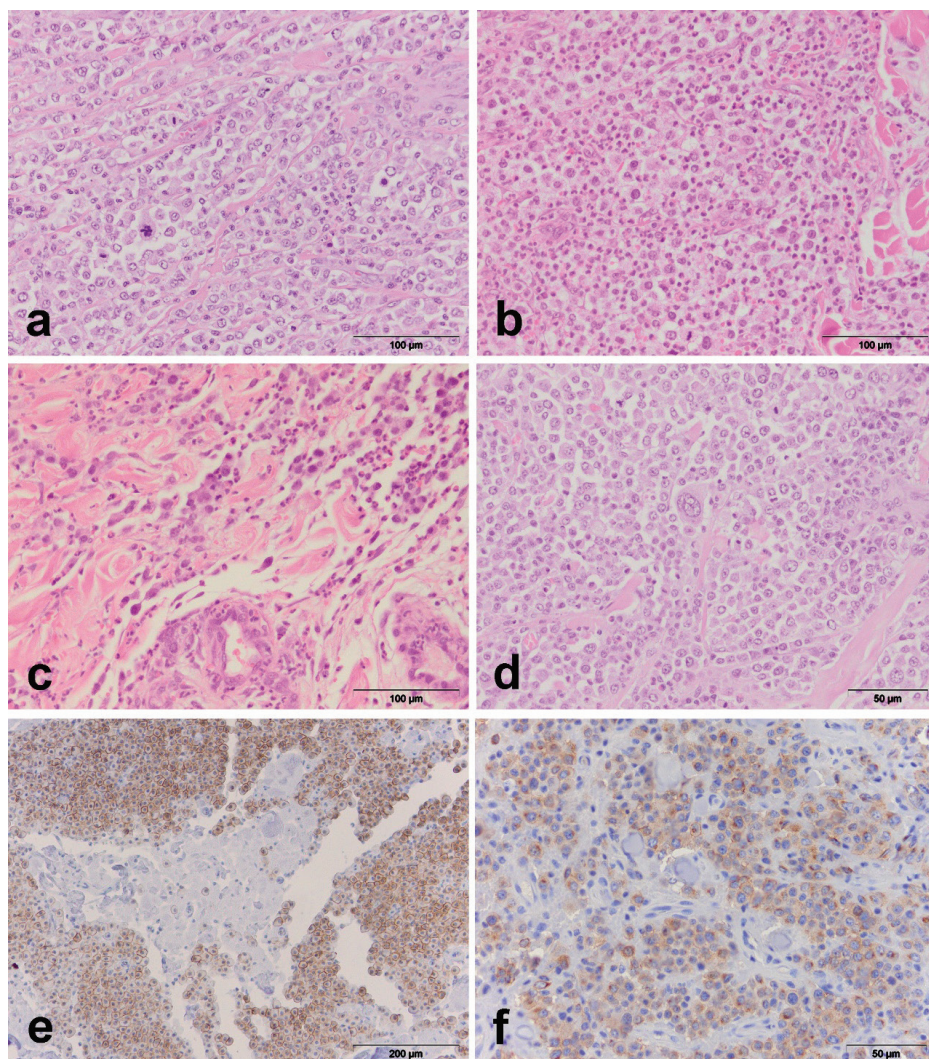


Figure 1. Skin, dog: a) The presence of mitotic figure in high grade MCT, HE; b) The presence of multinucleated cells in high grade MCTs, HE; c) The presence of cells with bizarre nuclei in high grade MCTs, HE; d) The presence of karyomegaly in high grade MCTs, HE; e) Expression of pattern I (membrane expression), CD117, LSAB2; f) Expression of pattern II (diffuse cytoplasmic expression), CD117, LSAB2;

DISCUSSION

Mast cell tumors are the most common dog skin tumors, especially when it comes to certain breeds such as boxer, golden retriever, labrador retriever and others (Welle et al., 2008). Based on the results obtained in our study, the highest incidence of mast cell tumors was observed in golden retrievers (37.5%), followed by boxers (20.7%). Similar to these results, most authors state that mast cell tumors were most commonly diagnosed in boxers (London and Sarah, 2003; Webster et al., 2006a; Gil da Costa et al., 2007; Welle et al., 2008; Vucicic et al., 2018). Others consider that although boxers have an increased risk of mast cell tumor formation, they are usually of low grade malignancy and have a more favorable prognosis (Thamm et al., 2007).

Histological examination appears to be the most consistent predictive parameter and is closely related to the 2-tire classification system proposed by Kiupel (Kiupel et al., 2011) according to which mast cell tumors are divided into high grade and low grade MCTs. According to the 2-tire system, MCTs examined in our research have been classified in high grade and low grade MCTs. Out of 52 MCTs in dogs, thirty-six were high grade tumors, while sixteen MCTs had morphological characteristics indicating a low degree of malignancy. More than six mitotic figures per 10 hpf were detected in 77.78% of high grade MCTs, and the presence of mitotic figures is statistically significant parameter

for classification of MCTs in this study. While some authors consider that low grade MCTs can metastasize, and that determining only the mitotic index is not a reliable way of predicting tumor behavior (Séguin et al., 2006; Webster et al., 2007); other authors consider mitotic activity to be an important feature for the prognosis of mast cell tumor behavior (Romansik et al., 2007; Kiupel et al., 2011). Some authors believe that mortality increases in cases where the mitotic index is greater than 5/10 hpf (O'Connell and Thomson, 2011).

The presence of more than two multinucleated cells in 10 hpf was observed in 86.11% of high-grade MCTs, indicating that this is a statistically significant indicator of MCTs classification. Some studies indicate that there is a significant correlation between the number of multinucleated cells in MCTs and survival time, so that survival time decreases with the increase in the number of multinucleated cells (Thompson, 2012).

In our study, the presence of more than two cells with bizarre nuclei in 10 hpf was observed in 86.11% of high grade MCTs, while the presence of multinucleated cells in low grade MCTs was not observed.

It was also observed that 27.78% of high grade MCTs contain more than 10% anaplastic MCTs with nuclei of 8-10 microns in diameter, indicating that the karyomegaly can not be considered

as a significant predictive factor in this study. There is a significant correlation between high grade MCTs and faster metastases, as well as a shorter survival time of patients (Kiupel et al., 2011; Stern, 2012). Therefore, for high grade mast cell tumors, additional tests such as determining the expression of KIT receptors and screening for mutations of c-KIT should be used in order to determine adequate therapy.

Recent studies indicate the existence of both normal (membrane) and aberrant cytoplasmic (focal and diffuse) KIT receptor expression of MCTs in dogs (Morini et al., 2004; Gil da Costa et al., 2007). Unlike previous studies (Reguera et al., 2000) which examined the relationship between intensity of immunohistochemical staining indicating the degree of KIT expression and the degree of tumor malignancy, our study examines the interconnection of aberrant expression of this protein and histopathological grade of mast cell tumor. In our study, it is observed that in low grade MCTs there is only membrane expression, while in high grade MCTs, in addition to membrane expression, there is also aberrant expression. From our results, it is noted that low grade MCTs have no aberrant expression of the KIT receptor. None of aberrant expression pattern is statistically significant in relation to other aberrant expression patterns.

However, the correlation between aberrant CD117 expression and the

degree of tumor malignancy is clear. Some authors state that KIT receptor is a transmembrane protein, and as such, the immunoreactivity of this protein is localized on the cytoplasmic membrane of unchanged mast cells. The results of the study confirm that canine MCTs that have more aggressive biological behavior, they also have greater cytoplasmic KIT expression (Kiupel et al., 2004). Also, the same authors claim that mast cells with increased cytoplasmic KIT expression have an increased risk of local recurrence and shorter survival time. Some authors emphasize a strong correlation between the cytoplasmic (aberrant) immunoexpression and increased cell proliferation, and therefore a higher degree of malignancy, but they did not notice significant differences between the focal and diffuse cytoplasmic CD117 expression, suggesting that focal and diffuse cytoplasmic expression of KIT receptor may reflect similar cell changes. It is known that cytoplasmic KIT receptor expression is associated with both necrotic and ulcerative changes. Cytoplasmic KIT receptor expression is related to increased mast cell proliferation, and the occurrence of necrosis in mast cell tumors can be a reflection of increased cell proliferation which appropriate angiogenesis isn't able to follow. On the other hand, the correlation between the cytoplasmic KIT receptor expression and occurrence of epidermal ulcerations can be due to KIT-mediated release of histamine and serotonin, which causes intense itching (Gil da Costa et al., 2007).

CONCLUSION

More recently, the presence of c-kit proto-oncogene mutation and aberrant KIT expression are considered to be the most prominent predictive factors. However, some papers state that aberrant KIT receptor expression can be seen in high grade MCTs in which no mutation was detected (Webster et al., 2006, Vucicevic et al., 2016). Therefore, determination of KIT receptor expression should be part of routine diagnostics and classification of mast cell tumors in dogs.

LITERATURE

1. Bostock D.E., Crocker J., Harris K., Smith P (1989): Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *British Journal of Cancer* 59(6): 915–18.
2. El-Agamy D.S (2012): Targeting c-KIT in the therapy of mast cell disorders: current update. *European Journal of Pharmacology* 690(1-3): 1-3.
3. Gil da Costa R.M., Matos E., Rema A., Lopes C., Pires M.A., Gartner F (2007): CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC Veterinary Research* 21(3): 19.
4. Gross T.L., Ihrke P., Walder E.J., Affolter V.K (2005): Mast cell tumors. *Skin Diseases of the Dog and Cat Clinical and Histopathologic Diagnosis*. 2nd edn. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd 853–65.
5. Halsey C.H.C., Thamm D.H., Weishaar K.M., Burton J.H., Charles J.B., Gustafson D.L., Avery A.C., Ehrhart E.J (2017): Expression of Phosphorylated KIT in Canine Mast Cell Tumor. *Veterinary Pathology* 54(3): 387-394.
6. Hendrick M.J., Mahaffey E.A., Moore F.M., Vos J.H., Walder E.J (1998): Mast cell tumors. In: *World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, Histological Classification of Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues of Domestic Animals*. 2nd series, ed. Schulman FY, 28–29. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC.
7. Jovanović M., Aleksić-Kovačević S., Knežević M (2012): Specijalna veterinarska patologija, Makarije d.o.o., Beograd.
8. Jubb, Kennedy, Palmer (2007): *Pathology of Domestic Animals*, Saunders Elsevier, 5th edition, 771-73.
9. Kiupel M., Webster J.D., Kaneene J.B., Miller R., Yuzbasiyan-Gurkan V (2004): The use of kit and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine

cutaneous mast cell tumors *Vet Pathol* 41(4): 371-77.

10. Kiupel M., Webster J.D., Bailey K.L., Best S., DeLay J., Detrisac C.J. i sar. (2011): Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Veterinary Pathology* 48(1): 147-55.
11. London C.A., Seguin B (2003): Mast cell tumors in the dog. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 33(3): 473-89.
12. Misdorp W (2004): Mast cells and canine mast cell tumours: a review. *Veterinary Quarterly* 26(4): 156-69.
13. Morris J., Dobson J (2001): *Small Animal Oncology*. Blackwell Science 59-62.
14. O'Connell K., Thomson M (2011): Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. *Veterinary and Comparative Oncology* 11(1): 51-62.
15. Oliveira F.N., Elliott J.W., Lewis B.C., Mathews G.G., Brown R.M., Treadway C.M., Langohr I.M (2013): Cutaneous Mast Cell Tumor With Epitheliotropism in 3 Dogs. *Veterinary Pathology* 50(2): 234-37.
16. Patnaik A.K., Ehler W.J., MacEwen E.G (1984): Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology* 21(5): 469-74.
17. Reguera M.J., Rabanal R.M., Puigdemont A., Ferrer L (2000): Canine mast cell tumors express stem cell factor receptor. *Am J Dermatopathol* 22(1): 49-54.
18. Romansik E.M., Reilly C.M., Kass P.H., Moore P.F., London C.A (2007): Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 44(3): 335-41.
19. Sabattini S., Scarpa F., Berlato D., Bettini G (2014): Histologic grading of canine mast cell tumor: Is 2 better than 3?. *Vet. Pathol* 52(1): 70-3
20. Seguin B., Besancon M.F., McCallan J.L. I sar. (2006): Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). *J Vet Intern Med* 20: 933-940.
21. Stern W.A (2012): Histologic Grading of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Is There a Good System?. *J Vet Sci Med Diagn* 1: 1.
22. Strefezzi R.F., Kleeb S.R., Xavier J.G., Catao-Dias J.L (2009): Prognostic indicators for mast cell tumors. *Bray J Vet Pathol* 2: 110-21.

23. Takeuchi Y., Fujino Y., Watanabe M., Nakagawa T., Ohno K., Sasaki N., Sugano S., Tsujimoto H (2010): Aberrant autophosphorylation of c-KIT receptor in canine mast cell tumor cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol* 137(3-4): 208-16.
24. Thamm D.H., Vail D.M: Mast cell tumors, In: Withrow SJ, MacEwen EG, editors (2007): *Small Animal Clinical Oncology*, Saunders, Philadelphia.
25. Thompson J.J (2012): *Canine Mast Cell Tumours: Characterization of Subcutaneous Tumours and Receptor Tyrosine Kinase Profiling*. PhD Thesis, Guelph, Ontario, Canada.
26. Vučićević, I., Marinković, D., Kukolj, V., Nešić, S., Aničić, M., Aleksić-Kovačević, S (2016): Kit receptor expression in canine cutaneous mast cell tumours (CMCTS) without c-kit mutation. *Acta Veterinaria-Beograd* 66 (2): 222-233
27. Vučićević I., Marinković D., Kukolj V., Nešić S., Aničić M., Aleksić-Kovačević S (2018): Mast cell tumor within a lipoma in a white toy poodle. *Veterinarski Glasnik*, 72 (1): 64-67.
28. Webster J.D., Kiupel M., Kaneene J.B., Miller R., Yuzbasiyan-Gurkan V (2004): The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol* 41(4): 371-7.
29. Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Kaneene J.B., Miller R., Resau J.H., Kiupel M., (2006): The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia* 8(2): 104-11.
30. Webster J.D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R.A., Kaneene J.B., Kiupel M (2007): Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology* 44(3): 298-308.
31. Welle M.M., Rohrer C.B., Howard J., Rüfenacht S (2008): Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology* 19(6): 321-39.

Paper received: 30.04.2018.

Paper accepted: 11.10.2018.

DOI 10.7251/VETJ1802392V

UDK 636.2.09:616.981.42

Originalni naučni rad

ZNAČAJ UPOTREBE ALERGIJSKOG KOŽNOG TESTA NA BRUCELIN U DIJAGNOSTICI BRUCELOZE GOVEDA^{1*}

Lejla Velić^{1*}, Toni Eterović¹, Silvijo Špičić², Željko Cvetnić², Amina Hrković Porobija¹, Benjamin Čengić¹, Selma Filipović¹, Tarik Bajrović¹

¹ Veterinarski fakultet, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

² Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

*Korespondentni autor: Lejla Velić lejla.velic@vfs.unsa.ba

Kratak sadržaj: Brucele u organizmu inficiranih životinja induciraju i humoralni i ćelijski imunološki odgovor. Humoralni imunološki odgovor se bazira na praćenju pojave specifičnih antitijela protiv glatkog lipopolisaharida (S-LPS) ćelijske membrane brucela. Međutim kod говеда u dokazu specifičnih antitijela klasičnim serološkim metodama mogu se detektovati antigene determinate za druge vrste mikroorganizama (unakrsna reaktivnost) kao što su: *Escherichia coli* 0:157, *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Salmonella urban*, *Pseudomonas malthophilia* i *Pasteurellae*. Cilj ovog rada je utvrditi ćelijski imunološki odgovor koji se bazira na upotrebi pročišćenog i standardiziranog alergena, kojem je u potpunosti odstranjen lipopolisaharid te kao takav ne dovodi do razvoja humoralnog imunološkog odgovora. Ukupno je ispitano 16 говеда s područja Federacije Bosne i Hercegovine kod kojih je - Rose Bengal testom ireakcijom vezivanja komplementa utvrđeno prisustvo specifičnih antitijela na бруцелозу. Кожни тест је изведен према упутима произвођача. U testu je korišten brucelin, ekstrakt *B. melitensis* B115 (Synbiotics Brucellergene OCB). Kod 14 говеда je nakon 72 sata od aplikacije utvrđeno zadebljanje kožnog nabora, dok kod dva говеда nije izmjereno nikakvo zadebljanje. Razlog svakako treba tražiti u činjenici da su dva говеда imala pozitivan rezultat samo u Rose Bengal testu te se to može prepisati unakrsnoj reakciji s antigeno srodnim mikroorganizmima.

Kožni алергијски тест није препоруљив као самосталан дијагностички алат јер не реагују све заражене животиње, стога овај тест се не може препоручити као индивидуални дијагностички тест или у сврху међународне трговине. Међутим, због високе специфичности и адекватне осјетљивости на нивоу стада или стада, може се препоручити за надзор стада / стада у подручјима слободним од бруцелозе.

Кључне ријечи: бруцелоза, говеда, бруцелин, хуморални имунитет, ћелијски имунитет

^{1*} Презентован на 23. Годишњем савјетовању доктора ветеринарске медицине Републике Српске (БиХ). Теслић, 6-9- јуна 2018.

UVOD

Uzročnik bruceloze su fakultativne intracelularne gram–negativne bakterije iz roda *Brucella*. Kod prijemljivih životinja brucele potiču humoralni i celularni imunološki odgovor. Dok se humoralni imunološki odgovor bazira na praćenju pojave i rasta titra specifičnih antitijela protiv lipopolisaharida- -glatkih brucela (S-LPS) (Benet i sar., 1991), ćelijski imunološki odgovor zasnovan je na aktivaciji makrofaga od strane limfokina koje izlučuju T ćelije. Na praćenje humoralnog imunološkog odgovora serološkim metodama utiču mnogi faktori kao što su dug i varijabilan period inkubacije bolesti tokom kojeg su serološki testovi negativni (Nelson i sar., 1966.), imunološki odgovor nastao vakcinacijom, varijacija u serološkim odgovorima pojedinih govoda kao i stadijum gravidnosti u vrijeme infekcije životinja (Fensterbank i sar. 1975.).

Brojni serološki testovi koji su trenutno dostupni jasno ukazuju da ni jedan test ne može zadovoljiti ono što se definiše kao „idealno“ kao što je otkrivanje rane faze infekcije tokom dugog i promjenljivog inkubacionog perioda, prisustvo nespecifičnih antitijela (unakrsne reakcije), otkrivanje latentnih ili hroničnih nosioca uzročnika i razlikovanje vakcinalnih od infektivnih antitijela (Nielsen i Duncan, 1990). Cilj ovog rada je utvrditi ćelijski imunološki odgovor kod serološki pozitivnih govoda upotrebom pročišćenog i standardiziranog alergena, kojem je u potpunosti odstranjen lipopolisaharid te kao takav ne dovodi do razvoja humoralnog imunološkog odgovora kao i ukazati na značaj primjene ovog testa u postavljanju konačne dijagnoze bruceloze kod govoda.

MATERIAL I METODE

Ispitivanje životinje

Istraživanje je provedeno na 14 govoda kod kojih je Rose Bengal testom (test brze serumske aglutinacije) i reakcijom vezivanja komplementa (RVK) utvrđeno prisustvo specifičnih antitijela za uzročnika bruceloze, kao i dva govoda kod kojega je Rose Bengal testom utvrđena pozitivna reakcija, dok je reakcija vezivanja komplementa dala negativan rezultat. Svi ispitani uzorci govoda su poticali iz gazdinstva u kojima se zajedno uzgajaju govoda i ovce koje

nisu bile vakcinisane. Uzorci krvi govoda za serološka ispitivanja dostavljani su na ispitivanje u Laboratorij za virusologiju i serologiju, Nacionalni referentni laboratorij za brucelozu u okviru godišnje naredbe za kontrolu zaraznih i parazitarne bolesti u Federaciji Bosne i Hercegovine za 2017. godinu.

Kožni test

Test je izvođen prema uputstvu OIE Manuala (2016) i Seagerman i sar., (1999) - brucelinom, koji je ekstrakt *B. melitensis* B115 (Synbiotics Brucellergene OCB).

Prema uputstvu proizvođača dlaka je šišana sa bočne strane i intradermalno je aplicirano 0,1 ml brucelina (2000 jedinica/ml). Debljina kožnog nabora je neposredno prije aplikacije mjerena - kutimetrom. Brucelin smo aplicirali s injektorom i iglom. Potvrda uspješne aplikacije bio je opipljiv čvorić na mjestu aplikacije. Očitavanje reakcije smo vršili 42-72 sata nakon aplikacije, primarno palpacijom, a nakon toga i mjerenjem kutimetrom. Pozitivna reakcija se ocjenjuje kvalitativno ili stvaranjem lokalnog ograničenog edematoznog otoka i otvrdnuća. Svako povećanje kožnog nabora veće - od 1,5 mm se

smatralo pozitivnom reakcijom. U cilju smanjenja mogućnosti varijacija u očitavanju, apliciranje kao i očitavanje je vršila ista osoba.

РЕЗУЛТАТИ

Kod svih говеда коришћених у испитивању није забилежена болност, некроза или отекнуће регионалних лимфних чворова на страни врата на којој је аплициран алерген.

Реакција је очитавана једнократно, седамдесет два сата након апликације бруцелина - мјерењем дебљине кожног нabora. Добијене вриједности мјерења приказане су у табели 1.

Табела 1. Вриједности мјерења кожног нabora прије и после апликације бруцелина

Говеда бр.	Кожни нabor прије апликације бруцелина (mm)	Кожни нabor 72 сата након апликације бруцелина (mm)	Разлика у дебљини кожног нabora (mm)
1.	10	21	11
2.	9	12	3
3.	12	20	8
4.	13	16	3
5.	10	17	7
6.	10,5	17	6,5
7.	9	10	1
8.	13	19	6
9.	20	22	2
10.	8	11	3
11.	9	13	4
12.	10	15	5
13.	6	8	2
14.	6	13	7
15.	7	7	0
16.	10	13	3

Kao što je vidljivo u tabeli od 16 testiranih životinja povećanje kožnog nabora je utvrđeno kod 14, dok kod dva goveda nisu zabeležene promene. Prosječna vrijednost povećanja zadebljanja se kretala u prosjeku 4,5 mm. Iako se kožni alergijski test na brucelin bazira na reakciji kasne

preosjetljivosti, fenomenu koji se koristi kod - tuberkulinizacije, reakcija nakon aplikacije brucelina je dva do tri puta manje intenzivna u odnosu na - tuberkulinizaciju (Saegerman i sar, 1999) (slika 1).



Slika 1. Mjerenje kožnog nabora kutimetrom.

DISKUSIJA

Postavljanje precizne i konačne dijagnoze kod oboljenja kao što je bruceloza je od velike važnosti u kontroli bolesti kako kod životinja tako i kod ljudi. S obzirom na to da se bruceloza kod životinja manifestira pobačajima gravidnih ženki u zadnjoj trećini graviditeta postavljanje kliničke sumnje se bazira na anamnestičkim podacima vezanim za reproduktivne poremećaje u stadu. Konačna dijagnoza se bazira na primjeni laboratorijskih direktnih i indirektnih metoda. Zlatni standard u di-

agnostičkog materijala (Alton i sar. 1988). Međutim ova metoda zahtjeva odgovarajući biosigurnosni nivo - jer se radi o uzročniku visokog rizika. Molekularne metode su s druge strane važan alat u dijanostiци bruceloze - i u epizootiološkim istraživanjima, ali zahtijevaju veoma skupu i opremu kao i visoko educirano osoblje (Godfroid sar., 2010). Primjena seroloških metoda također ima svojih prednosti i mana. Serološki testovi za - izvođenje ne zahtijevaju posebne uslove, manje su zahtjevni, sigurniji i mnogo ekonomičniji u

odnosu na bakteriološke i molekularne metode. Iako je opće prihvaćeno da su serološki testovi pouzdani u dijagnostici bruceloze kod goveda (FAO/WHO, 1986), - niti jedan dostupan serološki test ne može detektirati specifična antitela u svim fazama infekcije - (Nielsen, 2002). U istraživanjima provedenim 60tih i 80tih godina prošlog vijeka utvrđeno je da u serumu goveda inficiranih malim brojem brucela imunološki odgovor je slab ili upotpunosti izostaje (Rose i sar., 1964; Nicoletti i Muraschi, 1966, Ray i sar., 1988).

Također, u slučajevima infekcije brucelama u kasnoj fazi graviditeta može doći do normalnog poroda, ali su takve životinje inficirane iako se u serumu takvih životinja rijetko može dokazati signifikantan titar antitijela (Cunningham, 1968).

Nedostatak seroloških testova se ogleda u tome što se kod dokazivanja prisustva antitijela protiv bruceloze u serumu inficiranih životinja mogu unakrsno dokazati antitijela nastala poticanjem antigena srodnih mikroorganizama kao što su: *Escherichia coli* 0:157, *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Salmonella urban*, *Pseudomonas malthophilia* i *Pasteurellae* (Corbel, 1985, Kittelberger i sar., 1995). Iz ovog proizilazi da ne postoji niti jedan serološki test koji bi mogao da precizno detektuje sve stadije bruceloze (Mylrea i Fraser, 1976, Nielsen, 2002).

U našem istraživanju koristili smo pročišćeni i standardizirani alergen brucelin kojem je u potpunosti odstranjen lipopolisaharid, te kao takav

ne može dovesti do stvaranja specifičnih antitijela. Čelijski imunološki odgovor predstavlja najvažnij mehanizam odbrane kod infekcije brucelama. Mehanizam se sastoji u tome da limfocitnom stimulacijom dolazi do inhibicije migracije makrofaga, blastogeneze limfocita i razvoja kasnog tipa senzitivnosti (Soper i sar. 1978). Utvrđivanjem povećanja kožnog nabora kod 14 od 16 goveda kod kojih su s obje serološke metode (RB i RVK) dale pozitivan rezultat dokazuje da je kožni alergijski test najspecifičniji indirektni test za dijagnostiku bruceloze kod nevakciniranih životinja. Iako osetljivost i specifičnost kožnog alergijskog testa zavisi od odabranih kriterija za interpretaciju rezultata (De Massis i sar, 2005), - rezultati dobiveni ovim istraživanjima se podudaraju s rezultatima istraživanja drugih autora (MacDiarmida i Hellstroma, 1987, Pouillot i sar., 1997, Seagermana i sar., 1999). Mnogi autori (Bercovich i sar., 1992., Plommet, 1984., Seagerman i sar., 1999) smatraju da se vrijednost zadebljanja kožnog nabora - jednako i veće od 1mm, ne uzima kao granična vrijednost, nego da se svako vidljiva i/ili opipljiva reakcija smatra pozitivnom.

Negativan rezultat na kožni alergijski test koji smo dobili u našem istraživanju kod dva goveda je zabilježen kod goveda kod kojih je Rose Bengal bio pozitivan, dok je RVK dao negativan rezultat, a koji se prema Corbel, (1985) te Kittelberger sar. (1995) dovodi u vezu sa unakrsnom reakcijom sa drugim antigen srodnim

mikroorganizmima.

Važno je napomenuti da životinje koje su vakcinisane sa *B. melitensis* Rev.1, *B. abortus* S19 ili RB51 mogu dati pozitivne rezultate kožnim alergijskim testom godinama nakon vakcinacije (Pouillot i sar., 1997; De Massis i sar., 2005). Zbog toga se ovaj test ne može preporučiti ni kao jedini dijagnostički test, niti u svrhu međunarodne trgovine u područjima gdje se koriste *Brucella*

vakcine. Također važno je napomenuti da ne reaguju sve zaražene životinje, stoga ovaj test se ne može preporučiti kao individualni dijagnostički test ili u svrhu međunarodne trgovine. Međutim, zbog visoke specifičnosti i adekvatne osjetljivosti na nivou stada ili stada, može se preporučiti za nadzor stada / stada u područjima slobodnim od бруцелозе (OIE 2016).

ZAKLJUČAK

Na osnovu iznesenog može se zaključiti da primjena kožnog алергијског теста у дијагностици бруцелозе говеда има нарочито велику вриједност код говеда код којих су серолошки тестови показали сумњив и нејасан резултат као потврдна метода код невакцинисаних говеда. У условима гдје је бруцелоza ензоотског карактера гдје се примјењује вакцинација малих преживара те у условима гдје се овце и козе заједно држе с говедима

на истим пањјацима и настaмбaма увођење додатног теста у дијагностици бруцелозе као што је кожни тест касне преосјетљивости на бруцелин је користан дијагностички алат у дијагностици бруцелоз. Недостатак кожног теста се огледа у томе да није примјенљив у случајевима вакцинације животиња као и то да се у код понављања кожног алергијског теста треба саčekати период десензибилизације организма 6 седмица (OIE 2016).

LITERATURA

1. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. and Verger J.M. (1988): Techniques for the Brucellosis Laboratory, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris.
2. Benet J.J., Massard C., Garin-Bastuji B., Moutou F., Dufour B., Schaeffer C. and Cotton T. (1991): Reactions serologiques atypiques dans le depistage de la brucellose bovine: Enquene Bpidemiologique dans les departements condemes. Epidtmiol. Sante Anim., 19: 97-130.
3. Bercovich Z., Ter Laak E.A., Vanlipzig J.H.H. (1992): Detection of brucellosis in dairy herds after an outbreak of the disease using a delayed-type hypersensitivity test. *Preventive Veterinary Medicine*, **13**, 277–285.
4. Corbel M.J. (1985): Recent advances in the study of *Brucella* antigens and Their serological cross-reactions. *Vet Bull* 55, 927-942.

5. Cunningham B.(1968): The control and eradication of brucellosis. I. Serological response in cattle following vaccination with S,9 and killed *Brucella* 45120 adjuvant vaccine, *Vet. Rec.*, 82, 7.
6. De Massis F, Giovannini A., Di Emidio B., Ronchi G.F., Tittarelli M., Di Ventura M., Nannini D and Caporale V. (2005): Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Veterinariy italiana*, 41 (4), 291-299.
7. FAO/WHO (1986): Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis, 740:1-132.
8. Fensterbank R., Plummet M., and Pardon, P. (1975): Traitement de la brucellose bovine par l' oxytetracycline, *Ann. Rech. Vet.*, 6, 43.
9. Godfroid J., Nielsen K., Saegerman C. (2010.): Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat. Med. J.*, 15;51, 4:296-305.
10. Kittelberger R., Hilbink F., Hansen M.F., Ross G.P., Joyce M.A., Fenwick S., Heesemann J., Wolf-Waltz H., Nielsen K. (1995): Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 II the use of *Yersinia* outer proteins for the specific detection of *Yersinia enterocolitica* infections in ruminants. *Vet Microbiol.* 47(3-4):271-80.
11. MacDiarmid S.C., Hellstrom J.S. (1987): An intradermal test for the diagnosis of brucellosis in extensively managed cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 4, 361-369.
12. Mylrea P.J., Fraser G.C. (1976): The use of supplementary tests in the serological diagnosis of bovine brucellosis. *Aust. Vet.J.* 52: 261-266.
13. Nelson C. J., Anderson R. K., Kimberling C. V., and Pietz D. E. (1966): Enzootic factors of bovine brucellosis: comparative bacteriologic studies of infected herds, *Am. J. Vet. Res.*, 25, 1515.
14. Nicoletti P. and Muraschi T. F. (1966): Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the diagnosis of brucellosis in problem cattle herds, *Am. J. Vet. Res.*, 27, 689.
15. Nielsen K. (2002): Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol*; 90: 447–59.
16. Nielsen K., Duncan J.R. (1990): Animal Brucellosis, Animal Diseases Research Institute Agriculture Canada, Nepean, Ontario.
17. OIE (2016): "Terrestrial manual, Bovine brucellosis," in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*)(NB: Version adopted in May 2016.

18. Plommet M. (1984): Les dernieres etapes de la prophylaxie de la brucellosis bovine. Bull Mens Soc Vet Prat Fr, 68, 507-520.
19. Pouillot R., Garin- Bastuji B., Gerbier G., Coche Y., Cau C., Dufour B et al (1997): The brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis Vet.Res.28 (4), 365-374.
20. Ray W.C., Brown R.R., Stringfellow D.A., Schnurrenberger P.R., Scanlan C.M., Swann A.I. (1988): Bovine brucellosis: an investigation of latency in progeny of culture-positive cows. J. Am. Vet. Med. Assoc., 192, 182-186
21. Rose J, E., Lambert G., and Roepke M. H. (1964): Ultra-centrifugation and heat. Inactivation studies on serogglutinins of pregnant heifers artificially infected with virulent *Brucella abortus*, Am. J. Vet. Res., 25, 329.
22. Seagerman C., Vo T.K., De Waele L., Glison, D., Bastin A., Dubray G., Flanagan P., Limet J.N., Ietesson J.J and Godfroid, J. (1999): Diagnosis of Bovine Brucellosis by Skin Test: Conditions for the test and evaluation of its performance. The Veterinary Record, 145: pp 214 – 218.
23. Soper F. E., Muscoplat C. C., and Johnson D. W. (1978): In vitro stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: analysis of variation of lymphocyte blastogenic response in normal dairy cattle, Am. J. Vet. Res., 39, 1039.

Rad primljen: 05.06.2018.

Rad prihvaćen: 31.10.2018.

DOI 10.7251/VETJEN1802392V

UDK 636.2.09:616.981.42

Original scientific paper

THE IMPORTANCE OF BRUCELLIN ALGERIC SKIN TEST FOR DIAGNOSIS OF BOVINE BRUCELLOSIS^{2*}

Lejla Velić^{1*}, Toni Eterović¹, Silvio Špičić², Željko Cvetnić², Amina Hrković Porobija¹, Benjamin Čengić¹, Selma Filipović¹, Tarik Bajrović¹

¹ Veterinary faculty, Sarajevo, Bosna and Herzegovina

² Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

*Corresponding Author: Lejla Velić: lejla.velic@vfs.unsa.ba

Abstract: Infection with *Brucella* results in the induction of both humoral and cellular immune responses. Humoral immune response is based on monitoring the occurrence of specific antibodies against smooth lipopolysaccharide (S-LPS) of *Brucella*. However, in cattle, classical serological methods can detect antigenic determinants for other types of microorganisms (cross reactivity) such as *Escherichia coli* 0:157, *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Salmonella urban*, *Pseudomonas malthophilia* and *Pasteurella*. The aim of our work was to determine the immunological response based on the use of standardized and purified allergen in which lipopolysaccharide has been removed and doesn't induce humoral immune response. A total of 16 dairy cattle previously tested positive using RBT (Rose Bengal test) and CFT (complement fixation test) were tested for confirmation with BST (brucelline skin test) according to the instructions of the producer. *B. melitensis* B115 (Synbiotics Brucellergene OCB) was used in the test. 14 of 16 cattle reacted with skin thickening >1 mm after 72 hours from the application of brucellin. 2 animals with no skin thickening or thickening <1mm also reacted negative in CFT. This outcome can be attributed to cross reactions with other antigens than *Brucella* that commonly occurs in Rose Bengal test.

Brucellin allergic skin test is not recommended as a standalone diagnostic tool because all infected animals do not react therefore this test cannot be recommended as a self-sufficient diagnostic test or for the purpose of international trade. However, due to high specificity and adequate sensitivity at the herd level, it can be recommended for the control of herds in areas free of brucellosis.

Keywords: brucellosis, cattle, brucellin, humoral immunity, cellular immunity.

^{2*} Presented at the 23rd Annual Consulting of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (B&H). Teslic, June 6-9, 2018

INTRODUCTION

Brucellosis is caused by facultative intracellular Gram-negative bacteria of the genus *Brucella*. In susceptible animals, brucella induces a humoral and cellular immune response. While the humoral immune response is based on monitoring the occurrence and growth of titres of specific antibodies against lipopolysaccharides - smooth strain of *Brucella* (S-LPS) (Benet et al., 1991), the cellular immune response is based on activation of macrophages by lymphokines secreted by T cells. Monitoring of the humoral immune response by serological methods is influenced by many factors such as the long and variable incubation period during which the serological tests are negative (Nelson et al., 1966), the immunological response generated by vaccination, variation in serological responses of individual cattle as well

as stage of pregnancy at the time of infection (Fensterbank et al 1975). Numerous serological tests currently available clearly indicate that no test is “ideal” in terms of early infection detection during a long and variable incubation period, the presence of non-specific antibodies (cross-reactions), detection of latent or chronic carriers and the differentiation of infection from vaccination (Nielsen and Duncan, 1990). The aim of this paper is to determine the cellular immune response in serologically positive cattle using a purified and standardized Brucellin allergen, almost completely devoid of lipopolysaccharide and consequently does not lead to the development of humoral immune response. Also the study indicates the significance of this test in making the final diagnosis of brucellosis in cattle.

MATERIAL OF METHODS

Examined animals

A study was carried out on cattle (14 animals). The Rose Bengal test (fast serum agglutination test) and complement fixation reaction (CFR) determined the presence of *Brucella*-specific antibodies. The Rose bengal test was found positive in 2 cases while complement fixation reaction gave negative results. All examined bovine originated from farms where unvaccinated cattle and sheep were bred together. Bovine

blood samples for serological testing were submitted for examination to the Laboratory for Virology and Serology, National Reference Laboratory for Brucellosis, within the annual order for the control of infectious and parasitic diseases in the Federation of Bosnia and Herzegovina for 2017.

Skin test

The test was performed according to the OIE Manual (2016) and Seagerman et al., (1999) - brucelin, which is the

B. melitensis B115 extract (Synbiotics Brucellergene OCB). According to the manufacturer's instructions the hair was cut from the side and 0.1 ml of brucellin (2000 units / ml) was intradermally injected. Skinfold thickness was measured with a caliper prior to the application of brucellin. Brucellin was applied with an injector and a needle. A positive reaction is indicated by local swelling and induration. The test is read after 48- 72 hours, primarily by palpation, and then by measuring with a caliper. A positive reaction is evaluated qualitatively or by creating a local edema and induration. Any increase in the skin thickness greater than 1.5 mm

was considered as a positive reaction. In order to reduce the possibility of variation in reading, the application and the reading were performed by the same person.

RESULTS

No disease, necrosis or swelling of regional lymph nodes on the side of the neck where the allergen was applied was observed in cattle used in the study. The reaction was read only once by measuring the thickness of the skin fold, seventy-two hours after the injection of brucellin. The obtained measurement values are shown in Table 1.

Table 1. Skinfold measurements before and after brucellin application.

Cattle No.	Skinfold before administration of Brucellin(mm)	Skinfold 72 hours after administration of Brucellin (mm)	Difference in skinfold thickness (mm)
1.	10	21	11
2.	9	12	3
3.	12	20	8
4.	13	16	3
5.	10	17	7
6.	10,5	17	6,5
7.	9	10	1
8.	13	19	6
9.	20	22	2
10.	8	11	3
11.	9	13	4
12.	10	15	5
13.	6	8	2
14.	6	13	7
15.	7	7	0
16.	10	13	3

As seen in the table of 16 animals tested, the increase in skin fold was found in 14, while no changes were noted in two of them. An average value of thickness increase was 4.5 mm. Although the brucellin skin allergy test is based on a delayed-type hypersensitivity reaction, the phenomenon used in tuberculinization, the reaction after administration of Brucellin is two to three times less intense than the one in tuberculinization (Saegerman et al., 1999) (Fig. 1).



Measuring skinfold with a caliper

DISCUSSION

Making precise and definitive diagnoses in diseases such as brucellosis is of great importance in controlling the disease both in animals and humans. Since brucellosis in animals is manifested by abortions in the third trimester of pregnancy, clinical suspicion is based on anamnestic data related to reproductive disorders in the herd. The final diagnosis is based on the application of direct and indirect laboratory methods. The 'gold standard' in the diagnosis of brucellosis is the isolation of *Brucella* spp from the diagnostic material (Alton et al., 1988). However, this method requires an adequate biosecurity level - because

it is a highly infectious agent. Molecular methods, on the other hand, are an important tool in brucellosis diagnosis - and in epizootiological studies, but they require expensive equipment as well as highly educated staff (Godfroid et al., 2010). The application of serological methods also has its advantages and disadvantages. Serological tests do not require special conditions, they are less demanding, safer and more economical than bacteriological and molecular methods. Although it is generally accepted that serological tests are reliable in the diagnosis of brucellosis in cattle (FAO / WHO,

1986), none of the available serological tests can detect specific antibodies at all stages of the infection (Nielsen, 2002). In the researches carried out in the 60's and 80's of the last century, it was found that in the serum of bovine infected with *Brucella* present in small numbers, the immune response was weak or absent (Rose and Sar., 1964; Nicoletti and Muraschi, 1966; Ray et al., 1988). Also, in cases of brucellosis in the late stage of pregnancy, normal delivery may occur, but such animals are infected even though in serum of such animals a significant antibody titer can rarely be detected (Cunningham, 1968). The drawback of serological tests is the presence of cross-reactions with antigenically similar microorganisms such as *Escherichia coli* 0: 157, *Yersinia enterocolitica* 0: 9, *Salmonella urban*, *Pseudomonas malthophilia* and *Pasteurellae* (Corbel, 1985, Kittelberger et al., 1995). Consequently there is no serological test that could accurately detect all stages of brucellosis (Mylrea and Fraser, 1976, Nielsen, 2002). In our research, we used a purified and standardized Brucellin allergen completely devoid of lipopolysaccharide which can not lead to the production of specific antibodies. Cellular immune response is the most important defense mechanism in *Brucella* infection. The mechanism involves lymphocytic stimulation resulting in inhibition of macrophage migration, lymphocyte blastogenesis and delayed-type hypersensitivity development (Soper et al., 1978). An increase in skinfold

in 14 cattle in which both serological methods (RB and CFR) gave positive results shows that the skin allergy test is the most specific indirect test for the diagnosis of brucellosis in unvaccinated animals. Although the sensitivity and specificity of the skin allergy test depends on the chosen criteria for interpreting the results (De Massis et al, 2005), - the results obtained by these studies coincide with the results of other authors' research (MacDiarmida and Hellstrom, 1987, Pouillot et al., 1997, Seagerman et al., 1999). Many authors (Bercovich et al., 1992, Plommet, 1984, Seagerman et al., 1999) consider that skin-fold thickness values- equal to or greater than 1mm - is not taken as a limit value, but that each visible and / or tangible reaction is considered positive.

The negative result of the skin allergy obtained in two cases where Rose Bengal test was positive, while CFR gave a negative result. According to Corbel, (1985) and Kittelberger et al. (1995) this happens due to cross-reacting with other antigenically related microorganisms. It is important to note that animals vaccinated with *B. melitensis* Rev.1, *B. abortus* S19 or RB51 can react in a skin allergy test for years after vaccination (Pouillot et al., 1997; De Massis et al., 2005). Therefore, this test can not be recommended as the only diagnostic test, nor for the purpose of international trade in the areas where *Brucella* vaccine is used. It is also important to note that not all infected animals react, therefore this test can not be recommended as

an individual diagnostic test or for the purpose of international trade. However, due to high specificity and adequate sensitivity at the herd, it can be recommended for the control of herds in areas free of brucellosis (REI 2016).

CONCLUSION

Based on the above, it can be concluded that the use of a skin allergy test in bovine brucellosis diagnosis has a particularly high value in case of suspicious (unclear) result of serological testing as a confirmatory method in unvaccinated cattle.

The introduction of an additional test in brucellosis diagnosis such as a delayed-type brucellosis hypersensitivity is a useful diagnostic tool if brucellosis

is of enzootic character and where vaccination of small ruminants is applied as well as in conditions where sheep and goats are held together with cattle on the same pastures and habitats. The lack of a skin test is reflected in the fact that it is not applicable in cases of animal vaccination and that before the repetition of a skin allergy test it is necessary to wait 6 weeks to desensitize the organism (OIE 2016).

LITERATURA

1. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. and Verger J.M. (1988): Techniques for the Brucellosis Laboratory, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris.
2. Benet J.J., Massard C., Garin-Bastuji B., Moutou F., Dufour B., Schaeffer C. and Cotton T. (1991): Reactions serologiques atypiques dans le depistage de la brucellose bovine: Enquete Bpidemiologique dans les departements condemes. *Epidtmiol. Sante Anim.*, 19: 97-130.
3. Bercovich Z., Ter Laak E.A., Vanlipzig J.H.H. (1992): Detection of brucellosis in dairy herds after an outbreak of the disease using a delayed-type hypersensitivity test. *Preventive Veterinary Medicine*, **13**, 277–285.
4. Corbel M.J. (1985): Recent advances in the study of *Brucella* antigens and Their serological cross-reactions. *Vet Bull* 55, 927-942.
5. Cunningham B.(1968): The control and eradication of brucellosis. I. Serological response in cattle following vaccination with S,9 and killed *Brucella* 45120 adjuvant vaccine, *Vet. Rec.*, 82, 7.
6. De Massis F, Giovannini A., Di Emidio B., Ronchi G.F., Tittarelli M., Di Ventura M., Nannini D and Caporale V. (2005): Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Veterinariy italiana*, 41 (4), 291-299.

7. FAO/WHO (1986): Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis, 740:1-132.
8. Fensterbank R., Plummet M., and Pardon, P. (1975): Traitement de la brucellose bovine par l' oxytetracycline, Ann. Rech. Vet., 6, 43.
9. Godfroid J., Nielsen K., Saegerman C. (2010.): Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. Croat. Med. J., 15;51, 4:296-305.
10. Kittelberger R., Hilbink F., Hansen M.F., Ross G.P., Joyce M.A., Fenwick S., Heesemann J., Wolf-Waltz H., Nielsen K. (1995): Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 II the use of *Yersinia* outer proteins for the specific detection of *Yersinia enterocolitica* infections in ruminants. Vet Microbiol. 47(3-4):271-80.
11. MacDiarmid S.C., Hellstrom J.S. (1987): An intradermal test for the diagnosis of brucellosis in extensively managed cattle herds. Preventive Veterinary Medicine, 4, 361-369.
12. Mylrea P.J., Fraser G.C. (1976): The use of supplementary tests in the serological diagnosis of bovine brucellosis. Aust. Vet.J. 52: 261-266.
13. Nelson C. J., Anderson R. K., Kimberling C. V., and Pietz D. E. (1966): Enzootic factors of bovine brucellosis: comparative bacteriologic studies of infected herds, Am. J. Vet. Res., 25, 1515.
14. Nicoletti P. and Muraschi T. F. (1966): Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the diagnosis of brucellosis in problem cattle herds, Am. J. Vet. Res., 27, 689.
15. Nielsen K. (2002): Diagnosis of brucellosis by serology. Vet Microbiol; 90: 447–59.
16. Nielsen K., Duncan J.R. (1990): Animal Brucellosis, Animal Diseases Research Institute Agriculture Canada, Nepean, Ontario.
17. OIE (2016): "Terrestrial manual, Bovine brucellosis," in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*)(NB: Version adopted in May 2016.
18. Plommet M. (1984): Les dernieres etapes de la prophylaxie de la brucellosis bovine. Bull Mens Soc Vet Prat Fr, 68, 507-520.
19. Pouillot R., Garin- Bastuji B., Gerbier G., Coche Y., Cau C., Dufour B et al (1997): The brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis Vet.Res.28 (4), 365-374.

20. Ray W.C., Brown R.R., Stringfellow D.A., Schnurrenberger P.R., Scanlan C.M., Swann A.I. (1988): **Bovine brucellosis: an investigation of latency in progeny of culture-positive cows.** J. Am. Vet. Med. Assoc., 192, 182-186
21. Rose J, E., Lambert G., and Roepke M. H. (1964): Ultra-centrifugation and heat. Inactivation studies on serogglutinins of pregnant heifers artificially infected with virulent *Brucella abortus*, *Am. J. Vet. Res.*, 25, 329.
22. Seagerman C., Vo T.K., De Waele L., Glison, D., Bastin A., Dubray G., Flanagan P., Limet J.N., Ietesson J.J and Godfroid, J. (1999): Diagnosis of Bovine Brucellosis by Skin Test: Conditions for the test and evaluation of its performance. *The Veterinary Record*, 145: pp 214 – 218.
23. Soper F. E., Muscoplat C. C., and Johnson D. W. (1978): *In vitro* stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: analysis of variation of lymphocyte blastogenic response in normal dairy cattle, *Am. J. Vet. Res.*, 39, 1039.

Paper received: 05.06.2018.

Paper accepted: 31.10.2018.

DOI 10.7251/VETJ1802408D

UDK 636.8.09:616.995.132(497.6)

*Опис случаја***ANTE MORTEM ДИЈАГНОСТИКА *AELUROSTRONGYLUS ABSTRUSUS* (RAILLIET, 1898) КОД ДОМАЋЕ МАЧКЕ У РЕПУБЛИЦИ СРПСКОЈ (БИХ)****Миљан ДОБРИЈЕВИЋ¹, Оливер СТЕВАНОВИЋ^{1*}, Дејан ВУЈАНИЋ¹**

¹ Ветеринарска амбуланта „БЛ ВЕТ“ Бања Лука, Булевар Војводе Степе Степановића број 173,
78000 Бања Лука, Република Српска, БиХ

* Коресподентни аутор, E-mail: oliver.13.stevanovic.bih@gmail.com

Кратак садржај: У раду је описана појава верминозне бронхопнеумоније код домаће мачке узроковане нематодом *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898). Јединка мушког пола је у ранијим клиничким прегледима, показивала неке од знакова респираторних сметњи, али дефинитвна дијагноза није постављена. С обзиром да је мачак остао у лошој кондицији, препоручен је копролошки преглед. Након копролошке дијагностике и налаза развојних облика паразита *A. abstrusus*, извршен је поновни клинички преглед, рендгенографија грудног коша и примјењена је терапија. На основу додатних анализа закључено је да је ријеч о хроничној елулостронгилози. Ово је први опис елулостронгилозе код мачке у Републици Српској и Босни и Херцеговини, који указује на потребу да се рутински копролошки прегледи спроводе у свакодневној ветеринарској пракси.

Кључне ријечи: мачка, верминозна бронхопнеумонија, *Aelurostrongylus abstrusus*

УВОД

Инфекције мачака пулмоналним метастронгилидама су посљедњих година добиле на значају у клиничкој паразитологији. Описано је неколико врста плућних нематода из суперфамилије *Metastrongyloidea*, који паразитирају у плућима до-

маћих и дивљих фелида. Најзначајније су врсте *Aelurostrongylus abstrusus*, *Oslerus rostratus*, *Troglostrongylus brevior*, *Troglostrongylus subcrenatus* и *Angiostrongylus chabaudi* - L1 ларве. На основу доступних литературних података запажа се да је врста *A. abstrusus*

(Strongylida: Angiostrongylidae) најзаступљенија код мачака у Европи. Gavrilović и сар. (2017) описују фаталну грануломатозну пнеумонију код мачића у Србији узроковану овом методом, што потврђује могућу раширеност наведеног паразита код мачака на подручју Балкана. У Босни и Херцеговини је утврђено присуство врсте *T. brevior* код риса (Alić и сар. 2016). Спроведене студије су се базирале углавном на *post mortem* прегледима (Gavrilović и сар. 2017), док је у клиничкој пракси верминозна пнеумонија ријетко дијагностикована.

Елулостронгилоза код мачака протиче углавном субклинички, а код инфекције већег интензитета могуће су респираторне сметње (Ilić и сар. 2017). Од респираторних промјена су

уочавају се сљедећи клинички знаци: кијање, кашаљ, носни исцједак, диспноја и тахипноја, али су описани и хронични случајеви са израженом кахексијом и општом слабашћу (Traversa и Di Cesare, 2016). На елулостронгилиозу код мачака се може посумњати на основу клиничког прегледа и радиографског прегледа грудног коша, док се дефинитивна дијагноза поставља на основу детекције ларви првог стадијума (Л1) *A. abstrusus* у фецесу и садржају добијеном након бронхоалвеоларне лаваже (Ilić и сар. 2017).

У овом раду је описана *ante mortem* дијагноза верминозне бронхопнеумоније код домаће мачке са територије града Бања Луке, Република Српске (БиХ).

ОПИС СЛУЧАЈА

Рутинским копролошким прегледом дијагностиковане су ларве *A. abstrusus* (Railliet, 1898) код домаће мачке. Увидом у софтвер и на основу ранијих клиничких прегледа утврђено је да је мачак показивао неке од респираторних симптома болести, али дефи-

нитивна дијагноза није била постављена. Након копролошког налаза контактиран је власник и препоручено је да се мачак доведе на поновни клинички преглед, рендгенографски преглед торакса и терапију.

ИСТОРИЈА СЛУЧАЈА

Рутинским копролошким прегледом дијагностиковане су ларве *A. abstrusus* (Railliet, 1898) код домаће мачке. Увидом у софтвер и на основу ранијих клиничких прегледа утврђено је да је мачак показивао неке од респираторних симптома болести, али дефи-

нитивна дијагноза није била постављена. Након копролошког налаза контактиран је власник и препоручено је да се мачак доведе на поновни клинички преглед, рендгенографски преглед торакса и терапију.

Пацијент је домаћа мачка, мужјак, стар око 1,5 године, некастриран. Ријеч је о мачки која се слободно креће око газдинства у Врбањи (рурално насеље у Бања Луци). Сви подаци о дијагностици и терапији пацијента су архивирани у софтвер Ветеринарске амбуланте „БЛ Вет“ Бања Лука. Прегледом података софтвера, може се уочити да је једна од интервенција била повезана са појавом неких респираторних смијетњи. У марту мјесецу мачак је доведен у амбуланту у тешком здравственом стању, при чему је дијагностикован *otitis externa*. Неколико дана касније, крајем марта 2018. године, мачак је поново доведен у амбуланту под сумњом да се отровао текућином за прање фелуга. Одбијао је храну и воду. Клинички прегледом

је установљен: коњуктивитис са тешким очним исцјетком, едем лица, исцједак из носа, тахипнеја, фебра и тахикардија. Мачак је кихао и кашљао. Био је депресиван и кахектичан. Хематолошки анализе су показале: еритроцитозу и леукоцитозу. Апликовани су енрофлоксацин, цефалексин, инфузионо Хартманов раствор, нестероидни антиинфламаторни лијекови. Животиња је била серолошки негативна на вирус имунодефицијенције мачака и вирус леукемије мачака (имунохроматографски тест). Након поновљене терапије здравствено стање се поправило, али лоше кондиционе стање је било разлог да се препоручи копролошки преглед.

КОПРОЛОШКИ ПРЕГЛЕД

Фецес мачке је подвргнут рутинском паразитолошком прегледу методом флотације са засићеним воденим раствором цинк сулфата (специфичне тежине 1,30-1,40 на 20 С). Микроскопским прегледом утврђене су паразитске метастронгилоидне ларве, које није било могуће детерминисати, јер су биле смежуране под високим осмотским притиском цинк сулфата. Да би се потврдила инфекција, остатак узорка је испитан Бермановом техником - Конбој модификација за мале узорке (Penagos-Tabares и сар. 2016). Приближно 5 грама узорка је спаковано у дуплу газу и постављено у фалкон тубу од 50 ml која је претходно испуње-

на водом и затворене чепом. Седимент је прегледан након 24 часа у трипликату (2-3 капи седимента су пребачене Пастеровом пипетом на три предмета стакла). Након што су установљене ларве у седименту, додато је неколико капи водоник пероксида и/или Луголовог раствора, за имобилизацију и фиксацију ларви и лакше спровођење морфолошког прегледа (Слика 1). Ларве првог стадијума су морфолошки детерминисане према референтним описима (Traversa и Di Cesare, 2016; Diakou и сар. 2016). На основу морфолошких карактеристика постављена је дијагноза нематоде *Aelurostrongylus abstrusus*.



Слика 1. „А“ - на главеном или anteriорном дијелу дијагностикованих ларви се налази апикални „плато“, тако да ларва изгледа равно одсјечена; „Б“ Репни или постериорни дио ларви има типични „S“ облик. Дорзално реп ларве се оштро повија са примјетним вентралним и дорзалним инцизурама (усеклине), при чему реп завршава дугметасти врхом. Врх репа се сужава од половине терминално у танку нит. (размјерник: 50 μm)

Након што је копролошки установљен *A. abstrusus* код мачке, контактиран је власник и препоручена је рен-

дгнографија торакса (у циљу утврђивања степена лезија), клинички преглед и спровођење терапије.

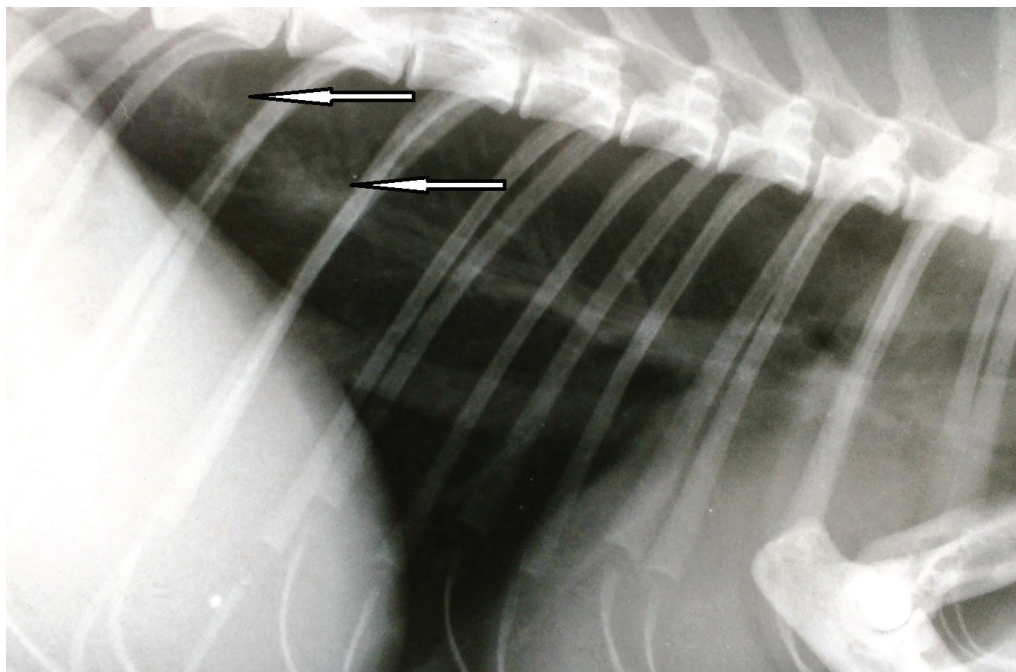
КЛИНИЧКИ ПРЕГЛЕД

Када је мачак, након постављања дијагнозе, поново доведен у амбуланту нису запажени клинички знаци специфични за кардиопулмонална обољења. Примјећена је лоша ухрањеност и тјелесна кондиција.

РАДИОГРАФСКИ ПРЕГЛЕД

Торакалном рендгенографијом („LL“ пројекција) је установљен бронхо-интерстицијални цртеж са задебљаним зидовима бронхија услед перибронхијалне инфилтрације. Значајније локализоване, интерстицијалне промјене су биле присутне на дорзално - каудалном дијелу плућа (дијафраг-

матски режњеви), гдје је сјенка плућа била измјењена. Ове промјене немају јасну границу ограничења, повећају нехомогено засјенчење прозирне (транспарентне) слике плућа и одговарају верминозној бронхопнеумонији (хроничан, ексудативан, локализован запаљенски процес) (Слика 2)



Слика 2. Рендгенограм торакса инфицираног мачка (LL пројекција)

Терапија. С обзиром да је пацијент био одрасли мачак, ивермектин је апликован субкутано у дози од 0,4 mg/kg, уз напомену власнику да је потребно извршити контролу 2-3 седмице након терапије (Kirkpatrick и Megella,

1987). Након терапије, контактирали смо власника од кога смо сазнали да је здравствено стање мачка стабилно, и да је поправио тјелесну кондицију. Узорак фецеса није достављен на контролни копролошки преглед.

ДИСКУСИЈА

У свакодневной пракси, само незнатан број ветеринара спроводи редовне копролошке претраге паса и мачака. Овакав приступ у паразитолошкој дијагностици има за последицу изостајање правовремене и валидне дијагностике већег броја паразитских инфекција, из чега се види да је рутинска лабораторијска процедура потцијењена. Дијагноза елулостронгилозе мачака је ријеткост у пракси. До сада је описана у неколико за маља Европе, а свакако највећи допринос у познавању ове метастронгилоидозе су дали италијански истраживачи (Traversa и Di Cesare, 2016). Епидемиолошки гледано, постоје подручја гдје се ово обољење појављује ендемски и једно је од првих обољења у диференцијалној дијагностици, на које ветеринари посумњају, након обављеног клиничког прегледа и утврђивања респираторних поремећаја.

С друге стране, на подручју Балканског полуострва налази елулостронгилозе мачака засновани су на резултатима паразитолошке секције. Преваленција ове метастронгилиде је већа у медитеранским земљама. У Републици Хрватској, утврђена преваленција је 22% (Grabarević и сар. 1999), а у поје-

диним дијеловима Италије утврђена она је износила 18,5% (Traversa и сар., 2008). У Албанији доказана је преваленција приближно 50%, 15,3% у Немачкој, 10,6%, у Великој Британији, 2,6% у Холандији, 14% у Мађарској (Traversa и Di Cesare, 2014). Резултати добијени у овом истраживању потврђују налаз овог паразита у Републици Српској и Босни и Херцеговини.

Клиничка слика варира код мачака у зависности од степена инфекције, али болест протиче углавном субклинички (Scott, 1973). Обољевају мачићи или имунокомпромитоване мачке, када је могуће уочити: кашаљ, мукопурулентни носни исцједак, кашаљ, кијање и отежано дисање. У описаном случају се ради о субклиничкој инфекцији, иако је могуће да је паразитоза допринијела респираторним смјетњама које су примјећене почетком марта. За вријеме клиничког прегледа је примјећена слабија ухрањеност животиње, што се често виђа с обзиром да је мачак имао могућност слободног кретања ван газдинства и често контакт са другим мачкама, посебно за вријеме периода парења. Радиографски налаз указује на хроничан процес, са благим промјенама на дијафрагматским

режњевима. Слични подаци наводе се у литератури, с обзиром да радиографски налаз зависи од степена оштећења плућа (*Lacava* и сар. 2017). Пошто је у приказаном случају опсервирана мачка, код које за вријеме клиничког прегледа нису установљени узнапредовали респираторни симптоми, нити су рендгенографским прегледом утврђене дисеминоване лезије плућа, закључује се да је дијагностикована хронична и субклиничка елулостронгилоза.

Лезије на плућима су локализоване у дијафрагматским режњевима, а зид бронхија је задебљан, што указује на постојање мјешовитог обрасца лезија. Код интензивнијих инфекција са *A. abstrusus* на рендгенограму се уочавају генерализоване интерстицијалне лезије у плућима афектираних мачака (*Lacava* и сар. 2017). Уз то, детектоване промјене на дијафрагматским плућним режњевима у нашем случају су специфичне за верминозну бронхопнеумонију.

У литератури је описано неколико антипаразитета, као и различите формулације, које ефикасно дјелују на не-

матоду *A. abstrusus*: фенбендазол, селамектин, моксидектин, празиквантел, левамизол и ивермектин (*Elsheikha* и сар. 2016). Међутим, у Републици Српској, многи од ових лијекова нису регистровани за употребу код мачака, што у знатној мери ограничава терапеутске и профилактичке могућности у борби против ове нематодозе. Орални и/или „spot on“ препарати су безбједнији за употребу, али терапијски протоколи су дужи. Због описане токсичности, препорука је да се избегава парентерална апликација ивермектина код мачића (*Lewis* и сар. 1994).

Добијени налаз указује да је потребно учесталије спровођење копролошких претрага од стране клиничара, што би свакако повећало број регистрованих случајева елулостронгилозе, али и других паразитоза код мачака. Доказано присуство обољења на територији Републике Српске и Босне и Херцеговине, указује на неопходност спровођења епидемиолошке студије, у циљу одређивања заступљености елулостронгилозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alić A., Traversa D., Duscher G.G., Kadrić M., Di Cesare A. and Hodžić, A., (2015): *Troglostrongylus brevior* in an Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasites & vectors*, 8(1), p.653.
2. Diakou A., Psalla, D., Migli, D., Di Cesare, A., Youlatos, D., Marcer, F., & Traversa, D. (2016): *First evidence of the European wildcat (Felis silvestris silvestris) as definitive host of Angiostrongylus chabaudi*. *Parasitology research*, 115(3), 1235-1244.
3. Ilić T., Mandić, M., Stepanović, P., Obrenović, S. and Sanda, D., (2017): *Cardiopulmonary metastrongyloidosis of dogs and cats contribution to diagnose*. *Veterinarski glasnik*, 71(2), pp.69-86
4. Gavrilović P., Jovanović, M., Gavrilović, A. and Nešić, S., (2017): *Fatal aelurostrongylosis in a kitten in Serbia*. *Acta parasitologica*, 62(2), pp.488-491.
5. Grabarevic Z., Curic, S., Tustonja, A., Artukovic, B., Simec, Z., Ramadan, K. and Zivicnjak, T., (1999): *Incidence and regional distribution of the lungworm Aelurostrongylus abstrusus in cats in Croatia*. *Veterinarski arhiv*, 69(5), pp.279-288.
6. Elsheikha H.M., Schnyder, M., Traversa, D., Di Cesare, A., Wright, I. and Lacher, D.W., (2016): *Updates on feline aelurostrongylosis and research priorities for the next decade*. *Parasites & vectors*, 9(1), p.389
7. Penagos-Tabares F., Lange, M. K., Chaparro-Gutiérrez, J. J., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2018): *Angiostrongylus vasorum and Aelurostrongylus abstrusus: Neglected and underestimated parasites in South America*. *Parasites & Vectors*, 11, 208. <http://doi.org/10.1186/s13071-018-2765-0>
8. Scott DW.(1973): *Current knowledge of aelurostrongylosis in the cat. Literature review and case reports*. *Cornell Vet*. 1973;63:483–500.
9. Traversa D., Lia, R.P., Iorio, R., Boari, A., Paradies, P., Capelli, G., Avolio, S. and Otranto, D., (2008): *Diagnosis and risk factors of Aelurostrongylus abstrusus (Nematoda, Strongylida) infection in cats from Italy*. *Veterinary parasitology*, 153: 182-186.
10. Traversa D., & Di Cesare, A. (2016): *Diagnosis and management of lungworm infections in cats: cornerstones, dilemmas and new avenues*. *Journal of feline medicine and surgery*, 18(1), 7-20.
11. Traversa D, Di Cesare A. (2014): *Cardio-pulmonary parasitic nematodes affecting cats in Europe: unraveling the past, depicting the present, and predicting the future*. *Front Vet Sci*. 2014;1:11.

12. Lewis D.T., Merchant, S.R. and Neer, T.M., (1994): *Ivermectin toxicosis in a kitten. Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205(4), pp.584-586
13. Lacava G., Zini, E., Marchesotti, F., Domenech, O., Romano, F., Manzocchi, S., Venco, L. and Auriemma, E., (2017): *Computed tomography, radiology and echocardiography in cats naturally infected with Aelurostrongylus abstrusus. Journal of feline medicine and surgery*, 19(4), pp.446-453.
14. Kirkpatrick C.E; Megella, C. (1987): *Use of Ivermectin in treatment of Aelurostrongylus abstrusus and Toxocara cati infections in a cat. J Am Vet Med Assoc*, , 190 (10), 1305-1310

Рад примљен: 05.09.2018.

Рад прихваћен: 12.10.2018.

DOI 10.7251/VETJEN1802408D

UDK 636.8.09:616.995.132(497.6)

Case report

ANTE MORTEM DIAGNOSIS OF *AELUROSTRONGYLUS ABSTRUSUS* (RAILLIET, 1898) IN DOMESTIC CAT IN REPUBLIC OF SRPSKA (BIH)

Miljan DOBRIJEVIĆ¹, Oliver STEVANOVIĆ¹, Dejan VUJANIĆ¹

¹ Veterinary clinic "BL VET" Banja Luka,

Bulevar Vojvode Stepe Stepanovića 173, 78 000 Banja Luka Republic of Srpska, B&H

* Corresponding Author, e-mail: oliver.13.stevanovic.bih@gmail.com

Abstract: This paper describes the occurrence of verminous bronchopneumonia in a domestic cat caused by the lung nematode *Aelurostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898). The male cat showed some of the signs of respiratory distress in earlier clinical examinations, but the definitive diagnosis was not made. Since the cat has been in poor condition, a coprological examination was recommended. After coprological diagnostics and findings of larval stage of parasite *A. abstrusus*, clinical examination and radiology of thorax was repeated, and therapy were applied. Based on additional analysis, a chronic aelurostrongylosis was recorded. This is the first description of aelurostrongylosis in cats in Republika Srpska and Bosnia and Herzegovina, which points to the need that routine coprological examinations must be carried out in daily veterinary practice.

Keywords: *cat, verminous bronchopneumonia, Aelurostrongylus abstrusus*

INTRODUCTION

Infection of cats with pulmonary metastrongyloid nematode have gained significance in clinical parasitology in recent years. Several species of pulmonary nematodes from the superfamily Metastrongyloidea, which parasitize in the lungs of domestic and wild felids, have been described.

The most important are the species *Aelurostrongylus abstrusus*, *Oslerus rostratus*, *Troglostrongylus brevior*, *Troglostrongylus subcrenatus* and *Angiostrongylus chabaudi* - L1 larvae. On the basis of available literature data, it is noted that the species *A. abstrusus* (Strongylida: Angiostrongylidae) is

the most common in cats in Europe. Gavrilovic et al. (2017) describe fatal granulomatous pneumonia in kitten in Serbia caused by this nematode, which confirms the possible spread of this parasite in cats in the Balkans. In Bosnia and Herzegovina, the presence of *T.brevior* was detected in lynx (Alić and sar. 2016). The conducted studies were mainly based on post-mortem examinations (Gavrilović et al. 2017), but in clinical practice verminous pneumonia is rarely diagnosed.

Aelurostrongylus of cats is mainly subclinical, and in the case of infection with higher intensity, respiratory signs are possible (Ilić et al., 2017). The following clinical signs (respiratory changes) are noted: sneezing, coughi,

nasal discharge, dyspnoea and tachypnea, but there were also chronic cases with pronounced cachexia and general weakness recorded (Traversa and Di Cesare, 2016) *Aelurostrongylus* of cats can be suspected on the basis of clinical examination and radiographic examination of the thorax, while the definitive diagnosis is set on the detection of the first stage larva (L1) of *Aelurostrongylus abstrusus* in the feces and the bronchoalveolar lavage content (Ilić et al. 2017).

This paper describes the ante-mortem diagnosis of verminous bronchopneumonia in a domestic cat from the territory of Banja Luka, Republika Srpska (BiH).

CASE DESCRIPTION

Larvae of *A. abstrusus* (Railliet, 1898) in domestic cat were diagnosed after routine coprological examination. According to the data in the software and on the basis of earlier clinical examinations, it was found that the cat showed some of the respiratory symptoms of the disease, but

a definite diagnosis was not established. After a coprological findings, the owner was contacted when is recommended that cat should be brought for repeated clinical examination, radiography of thorax and therapy.

CASE HISTORY

The patient is a domestic cat, male, around 1.5 years old, uncastrated. This is outdoor cat which freely moves around the household in Vrbanja (rural region in Banja Luka). All data on patient diagnostics and therapy were archived in the software of Veterinary ambulance «BL Vet» Banja Luka. By reviewing the data, it can be noticed that

one of the interventions was associated with the occurrence of some respiratory abnormalities. In March, the cat was brought in bad health in ambulance, and it was diagnosed with external otitis. A few days later, at the end of March 2018, the cat was brought back suspected of being poisoned with alloy wheel cleaner. He refused food and water. Clinical

examination revealed: conjunctivitis with severe eye discharge, facial oedema, nasal discharge, tachypnea, fever and tachycardia. The cat was sneezing and coughing. It was depressed and cachectic. Hematological tests showed: erythrocytosis and leukocytosis. Enrofloxacin, cefalexin, Hartmann's solution and non-steroidal anti-

inflammatory drugs were administered. The animal was serologically negative to feline immunodeficiency and feline leukemia virus (immunocromatographic test). After repeated therapy, the health was improved, but the poor condition was the reason to recommend a coprological examination.

COPROLOGICAL EXAMINATION

Cat feces were subjected to routine parasitological examination by flotation method with saturated aqueous solution of zinc sulfate (specific gravity of 1.30-1.40 at 20 ° C). Microscopic examination revealed parasitic metastrongyloid larvae, which could not be determined because they were shriveled under high osmotic pressure of zinc sulfate. To confirm the infection, the rest of the sample was tested by Baermann technique – Conboy modification for small samples (Penagos-Tabares et al., 2016). Approximately 5 grams of the sample was packed in a double gauze and placed in a 50 ml falcon tube which was previously filled with water

and closed with a plug. Sediment was examined after 24 hours in triplicate (2-3 drops of sediment were transferred by Pasteur pipette to three slides) After the larvae were found in the sediment, several drops of hydrogen peroxide and / or Lugol's solution were added, for the immobilisation and fixation of the larvae and for easier morphological examination (Figure 1). First stage larvae are morphologically determined according to reference descriptions (Traversa and Di Cesare, 2016; Diakou et al., 2016). The diagnosis of the nematode *Aelurostrongylus abstrusus* was made on the basis of morphological characteristics.



Figure 1. «A» - there is an apical «plateau» on the anterior part of diagnosed larvae so that it looks as it was cut straight. «B» The tail or posterior part of the leg has a typical «S» shape. Dorsally the tail sharply bends with noticeable ventral and dorsal incisions (cuts), ending with a button-like shape. Tip of the tail narrows from the middle to a thin filament.

After *A. abstrusus* was diagnosed, of lesions), clinical examination and the owner was contacted and thoracalx-ray (in order to determine the degree the implementation of therapy were recommended.

CLINICAL EXAMINATION

When the cat, after the diagnosis, was brought back, no clinical signs specific to cardiopulmonary diseases were

observed. Bad nutrition and physical condition were noticed.

RADIOGRAPHIC INSPECTION

Radiography of thorax («LL» projection) revealed a broncho-interstitial pattern with thickened bronchial walls due to peribronchial infiltration. Significantly localized, interstitial changes were present in dorso-caudal part of the lungs (diaphragmatic lobes), where the

shadow of the lungs was changed. These changes do not have a clear boundary limit, they increase non-homogeneous shading of transparent lung shadow and correspond to verminous bronchopneumonia (chronic, exudative, localized inflammation process) (Figure

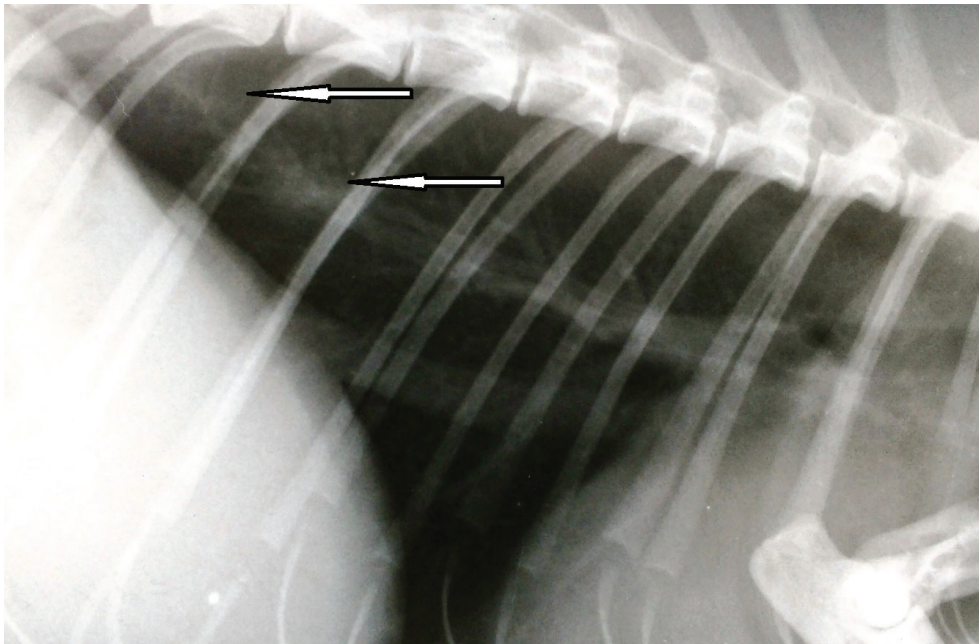


Figure 2. Chest x-ray of the infected cat (LL projection)

Therapy. Since the patient was an adult cat, ivermectin was administered subcutaneously at a dose of 0.4 mg / kg, informing the owner that control is necessary 2-3 weeks after treatment (Kirkpatrick and Megella, 1987). After

the therapy, we contacted the owner from whom we found out that the condition of the cat was stable and that his condition improved. The faeces sample was not submitted to the control coprological examination.

DISCUSSION

In everyday practice, only a small number of veterinarians conduct regular coprological tests of dogs and cats. The consequence of this approach to parasitic diagnosis is the lack of timely and valid diagnostic of a large number of parasitic infections, which shows that routine laboratory procedure is underestimated. The diagnosis of *aelurostrongylosis* of cats is rare in practice. So far it has been described in several European countries, but Italian researchers gave the greatest contribution to the knowledge of *metastrongyloidosis* (Traversa and Di Cesare, 2016). Epidemiologically, there are areas where this disease appears endemically and is one of the first differential diagnosis that veterinarians suspect after a clinical examination and the diagnosis of respiratory disorders.

On the other hand, in the area of the Balkan Peninsula, diagnosis of *aelurostrongylosis* in cats is based on the results of the parasitological section. The prevalence of this *metastrongyloids* is higher in Mediterranean countries. In Croatia, the prevalence was 22% (Grabarevic et al. 1999), and in some parts of Italy it was found to be 18.5% (Traversa et al., 2008). In Albania, prevalence is estimated to be around

50%, 15.3% in Germany, 10.6% in the UK, 2.6% in the Netherlands, 14% in Hungary (Traversa and Di Cesare, 2014). The results obtained in this study confirm the finding of this parasite in Republika Srpska and Bosnia and Herzegovina.

The clinical picture varies in cats depending on the degree of infection, but the disease is mainly subclinical (Scott, 1973). Kittens or immunocompromised cats are affected when they have one of the following signs: coughing, mucopurulent nasal discharge, sneezing and difficulty breathing. In the described case, it is a subclinical infection, although it is possible that parasitosis contributed to the respiratory disturbances observed in early March. During the clinical examination, poor nutrition of the animal was noticed, which is often seen because the cat had the possibility of free movement outside the house and contact with other cats, especially during the mating period. The radiographic finding indicates a chronic process with mild changes on the diaphragmatic lobes. Similar data are found in the literature, since the radiographic findings depends on the degree of lung damage (Lacava et al., 2017). Since in the presented case there were no respiratory symptoms or

disseminated lung lesions determined by a radiographic examination, it was concluded that in this case chronic and subclinical *aelurostrongylosis* was diagnosed.

Lung lesions are localized in diaphragm lobes, and the bronchial wall is thickened, indicating the existence of a mixed pattern of lung lesion. For more intensive infections with *A. abstrusus* radiography shows generalized interstitial lesions in the lungs of affected cats (Lacava et al., 2017). Additionally, the detected changes in the lung lobe in our case are specific to verminous bronchopneumonia.

Several antiparasitics have been described in the literature as well as various formulations that are effective on the nematode *A. abstrusus*: fenbendazole, selamectin, moxidectin, praziquantel, levamisole and ivermectin (Elsheikha et al., 2016) However, in Republika Srpska,

many of these drugs are not registered, which significantly restricts therapeutic and prophylactic opportunities in the fight against this nematodiosis. Oral and / or spot-on preparations are safer for use, but therapeutic protocols are longer. Because of the described toxicity, recommendation is to avoid the parenteral application of ivermectin in kittens (Lewis et al., 1994).

The obtained finding suggests that clinicians should conduct the coprological examination more frequently, which would certainly increase the number of registered cases of *aelurostrongylosis* and other parasitosis in cats. Evidence of the presence of this disease in the territory of Republika Srpska and Bosnia and Herzegovina indicates the necessity of conducting an epidemiological study in order to determine the prevalence of *aelurostrongylosis*.

LITERATURE

1. Alić A., Traversa, D., Duscher, G.G., Kadrić, M., Di Cesare, A. and Hodžić, A., (2015): *Troglostrongylus brevior* in an Eurasian lynx (*Lynx lynx*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasites & vectors*, 8(1), p.653.
2. Diakou A., Psalla, D., Migli, D., Di Cesare, A., Youlatos, D., Marcer, F., & Traversa, D. (2016): First evidence of the European wildcat (*Felis silvestris silvestris*) as definitive host of *Angiostrongylus chabaudi*. *Parasitology research*, 115(3), 1235-1244.
3. Ilić T., Mandić, M., Stepanović, P., Obrenović, S. and Sanda, D., (2017): Cardiopulmonary metastrongyloidosis of dogs and cats contribution to diagnose. *Veterinarski glasnik*, 71(2), pp.69-86
4. Gavrilović P., Jovanović, M., Gavrilović, A. and Nešić, S., (2017): Fatal *aelurostrongylosis* in a kitten in Serbia. *Acta parasitologica*, 62(2), pp.488-491.
5. Grabarevic Z., Curic, S., Tustonja, A., Artukovic, B., Simec, Z., Ramadan, K. and Zivicnjak, T., (1999): Incidence and regional distribution of the lungworm *Aelurostrongylus abstrusus* in cats in Croatia. *Veterinarski arhiv*, 69(5), pp.279-288.
6. Elsheikha H.M., Schnyder, M., Traversa, D., Di Cesare, A., Wright, I. and Lacher, D.W., (2016): Updates on feline *aelurostrongylosis* and research priorities for the next decade. *Parasites & vectors*, 9(1), p.389
7. Penagos-Tabares F., Lange, M. K., Chaparro-Gutiérrez, J. J., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2018): *Angiostrongylus vasorum* and *Aelurostrongylus abstrusus*: Neglected and underestimated parasites in South America. *Parasites & Vectors*, 11, 208. <http://doi.org/10.1186/s13071-018-2765-0>
8. Scott DW. (1973): Current knowledge of *aelurostrongylosis* in the cat. Literature review and case reports. *Cornell Vet.* 1973; 63:483–500.
9. Traversa D., Lia, R.P., Iorio, R., Boari, A., Paradies, P., Capelli, G., Avolio, S. and Otranto, D., (2008): Diagnosis and risk factors of *Aelurostrongylus abstrusus* (Nematoda, Strongylida) infection in cats from Italy. *Veterinary parasitology*, 153: 182-186.
10. Traversa D., & Di Cesare, A. (2016): Diagnosis and management of lungworm infections in cats: cornerstones, dilemmas and new avenues. *Journal of feline medicine and surgery*, 18(1), 7-20.

11. Traversa D, Di Cesare A. (2014): Cardio-pulmonary parasitic nematodes affecting cats in Europe: unraveling the past, depicting the present, and predicting the future. *Front Vet Sci.* 2014;1:11.
12. Lewis D.T., Merchant, S.R. and Neer, T.M., (1994): Ivermectin toxicosis in a kitten. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205(4), pp.584-586
13. Lacava G., Zini, E., Marchesotti, F., Domenech, O., Romano, F., Manzocchi, S., Venco, L. and Auriemma, E., (2017): Computed tomography, radiology and echocardiography in cats naturally infected with *Aelurostrongylus abstrusus*. *Journal of feline medicine and surgery*, 19(4), pp.446-453.
14. Kirkpatrick C.E; Megella, C. (1987): Use of Ivermectin in treatment of *Aelurostrongylus abstrusus* and *Toxocara cati* infections in a cat. *J Am Vet Med Assoc*, , 190 (10), 1305-1310

Paper received: 05.09.2018.

Paper accepted: 12.10.2018.

DOI 10.7251/VETJ1802428R

UDK 616.5-002.828:636.2

Оригиналан научни рад

ПОЈАВА ТРИХОФИТОЗЕ КОД ТОВНЕ ЈУНАДИ^{1*}

Ивана ДАВИДОВ^{1*}, Миодраг РАДИНОВИЋ¹, Зорана КОВАЧЕВИЋ¹,
Михајло ЕРДЕЉАН¹, Аннамариа ГАЛФИ¹, Саша ИЛИЋ¹

¹ Департман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду,
Трг Доситеја Обрадовића 8, Нови Сад, Република Србија

* Коресподентни аутор, ivana.davidov@polj.edu.rs

Кратак садржај: Трихофитоза је једна од честих обољења говеда, које изазива гљивица *Trichophyton verrucosum* чије споре остају дуго виталне у спољашњој средини. Уједно је ово обољење зооноза, јер једнако могу да се инфицирају људи и животиње. Инфекција се брзо шири, а ово гљивично обољење доводи одређених економских губитака. У току овог истраживања су била укључена товна јунад старости 4 месеца која су транспортована из јужне Србије у део Војводине- Мачву. Након месец дана од транспорта дошло је до избијања карактеристичних сиво- беличастих округлих промена на кожи товне јунади. Товна јунад са пет индивидуалних газдинстава није примала терапију, док је товна јунад са других пет газдинстава примала терапију применом препарата Dekanol®. На основу добијених резултата може се закључити да за постизање ефекта сузбијања трихофитозе, најбоље је примењивати терапију или још боље спроводити вакцинацију товне јунади уз примену квалитативне исхране.

Кључне речи: трихофитоза, товна јунад, зооноза

^{1*} Презентован на 23. Годишњем савјетовању доктора ветеринарске медицине Републике Српске (БиХ). Теслић, 6-9- јуна 2018.

УВОД

Гљивична обољења коже су веома честа код људи и животиња и углавном су зоонозе. Једно од таквих обољења је и трихофитоза говеда, која доводи до смањења квалитета млека, меса и коже, те изазива велике економске штете. С друге стране, пошто се може пренети на људе, уједно је и велика опасност по људско јавно здравље (Agnetti et al., 2014; El-Tras et al., 2015).

Последњих година, у свету и у Србији (Рогожарски и сар., 2012) је примећено све више случајева овог обољења. Сматра се да је у просеку 30% укупног броја говеда у неком тренутку било заражено овом гљивицом, али су варијације велике у зависности од региона. Најугроженији су предели Јужне Европе и Блиског Истока. Велики број заражених грла је пријављен у Италији, провинцији Умбрија, где постоје фарме на којој је 100% животиња заражено (Papini et al., 2009; Agnetti et al., 2014).

Трихофитоза се најчешће јавља код говеда, мада могу да оболе и магарци, пси, козе, овце и коњи. Нарочито је заступљена у условима конвенционалног интензивног млечног говедарства, где се гаје високо млечне расе говеда, каква је холштајн-фризијска раса. Учесталост појављивања ове болести је већа у позну јесен и зиму, што је разумљиво уколико се посматрају услови држања животиња. Наиме, зими су животиње затворене у шталама, где су најчешће услови смештаја и хигијене незадо-

вољавајући. Такође, зими је и исхрана животиња неодговарајућа и слабија, те им имунитет опада (Papini et al., 2009).

Узрочник трихофитозе говеда је гљивица *Trichophyton verrucosum*, која има способност инфицирања и људи. Ова гљивица ствара веома отпорне споре којима се преноси инфекција. У сувом материјалу споре остају способне за размножавање неколико година. У промењеним деловима коже отпорне су на ултраљубичасте светлост (Seebacher et al., 2008). У епидермису трихофитон исклијава, ураста у длачне фоликуле, длаку и корен длаке тако да се длака ломи и испада. Гљивица живи на површини коже, а својим протеолитичким и кератолитичким ензимима и егзотоксинима изазива паракератозу и промене запаљенске природе (Summerbell, 2000; Бојковски и сар., 2013). Гљивица *Trichophyton verrucosum* се сматра факултативно патогеном, а погодује јој зимско стајско држање, влажна клима, топло време и нехигијенски услови држања (Morrell et Stratman, 2011).

У великим запатима задржава се годинама, па јој довођење млађих грла у запат омогућава ширење, јер истенису стекле довољну отпорност. Претпоставља се да недостатак витамина А погодује настанку и ширењу болести, а томе још доприноси и неадекватна исхрана, хроничне кожне и паразитске болести. Код прележане болести, у крвном серуму животиња утврђена су ан-

титела (Шаманц и Стаматовић, 1999; Радојчић и сар., 2017).

На телу оболелих животиња јављају се сиво-беле промене, и то локално, најчешће на врату и глави (чеона регија и око очију), али се могу јавити и на предњим екстремитетима, грудима и сапима. Ове промене су величине 10-50 mm, овалног облика, благо испупчене, са крастама које се тешко одвајају, и веома често на месту ових промена длака је опала. Такође, присутно је константно перутање коже на месту тих промена. У просеку, број промена на једној животињи је између 10 и 30, али може ићи и до 50 (Sayfarth et al., 2011). Најподложнија овом обољењу су говеда, и то женска грла, нарочито јунице и грла млађа од 12 месеци, мада се често јавља и код крава. Ово се може објаснити недовољно развијеним имунитетом код млађих грла. Инфекција и преношење болести се дешава директним контактом између болесних и здравих животиња, али и индиректно, из инфициране околине, будући да споре могу да остану виталне

и до четири године (Papini et al., 2009; O'Gorman et al., 2015, Бојковски и сар., 2007).

Обзиром да је ова болест је зооноза, најугроженији су људи који су у директном контакту са оболелим животињама, као што су музачи, ветеринари, помоћно особље у штали, људи који раде у обради коже и други (Agnetti et al., 2014; El-Tras et al., 2015).

Код људи се ове промене испољавају углавном на глави, пределу браде, али неретко и на изложеним деловима тела, као што су нокти, шаке и руке. Симптоми су слични као и код оболелих животиња, најчешће са печатима без косе уколико је обољење на глави, а на подлактицама се могу јавити циркумскрипне еритрематозне промене (Agnetti et al., 2014; El-Tras et al., 2015).

Циљ овог рада је да се уочи у ком степену долази до промене на кожи код товних јунади након транспорта и које су смештене у објекте са неадекватним хигијенским условима.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

У јулу 2017. године међу товним јунадима смештеним на десет сеоских пољопривредних газдинства у селу код Богатића у области Мачве, појавило се кожно обољење трихофитоза. На основу анамnestичких података товна јунад су водила порекло из јужна Србије (Пирот, Лесковац, Врање) и била су допремљена друмским транспортом у Мачву. Сва грла су била сименталске

расе и старости 4 месеца. Након допремања у року од тридесет дана власници су приметили округле сиво-беличасте печате на глави, врату и сапима јунади.

Укупан број товне јунади са променама на кожи, у свих десет газдинстава је био 180. Са свих грла је узет скарификат на промењеним местима коже ради изоловања узрочника и по-

стављања тачне дијагнозе. Узет скарификат коже је у 10% раствору КОН послат у лабораторију, где је под светлосним микроскопом уочен узрочник трихофитозе. Обзиром на то да сам микроскопски преглед понекад није довољан, урађено је засејавање на подлогама којим су израсле колоније у облику перликоје су карактеристичне за гљивицу *Trichophyton verrucosum*.

Након изолације узрочника и потврде кожног обољења трихофитозе код товне јунади са свих десет индивидуалних газдинстава, на пет газдинстава је спроведена терапија применом препарата Dekanol® прскањем коже два пута у размаку од 15 дана, односно утрљавањем препарата тупферима

упредео око очију. Пре терапије красите су нежно и пажљиво очишћене меканом памучном крпом. Свако грло је имало своју памучну крпу, која се након употребе спаљивала. Товна јунад осталих пет газдинстава је била без терапије односно били су излагани сунцу и у исхрани су им додавани витаминско-минерални додаци. У свих десет индивидуалних газдинстава су оболела грла била одвојена од здравих и урађена је дезинфекција објекта у којима су товна јунад била смештена.

Сви добијени резултати су обрађени стандардним статистичким методама применом програма Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛТАТИ

Гљивица *Trichophyton verrucosum* је била изолована код свих 180 товних јунади који су имали јасну клиничку слику трихофитозе као што су сиво-бе-

личисте циркумскриптне промене са или без длаке на кожи главе, лица, врата, трупа и сапи (слика 1 и 2).



Слика 1. Налаз карактеристичних сиво-беличастих промена на кожи лица товне јунади



Слика 2. Сиво-беличасте циркумскриптне промене на кожи трупа товне јунади

Пре примене терапије односно излагања товне јунади сунцу и додавањем витаминско-минералних додатака у храни, кожане лезије су прегледане и забележене су њихове локализације и бројност. Од укупног броја товне јунади ($n=180$) лезије на кожи су имале разичит изглед без обзира на локализацију промене.

У табели 1 се налазе резултати са локализацијом и типизацијом кожных лезија са пет газдинстава где се није примењивала терапија, већ су у периоду од 30 дана, товним јунацима у храну додани витаминско-минерални додаци и јунак су била излагана дејству сунчеве светлости. Укупан број товних јунади са ових пет газдинстава је био 80.

Табела 1. Збирни резултати локализације и типизације лезија на кожи након постављања дијагнозе и након 30 дана излагања товних јунади сунцу и додатавња витаминско-минералних додатака

Локација кожних лезија	Типизација кожних лезија и број товних јунади са променама								Σ товне јунади		% без опорвака
	Лезије са длаком		Лезије без длаке		Красте		Кератинизација				
	Пре	После	Пре	После	Пре	После	Пре	После	Пре	После	
Лице	19	12	11	8	0	0	7	5	37	25	67,57%
Глава	1	0	21	17	5	0	15	11	42	28	66,67%
Врат	0	0	15	12	9	5	7	6	31	23	74,19%
Труп	0	0	13	9	14	11	14	12	41	32	78,05%
Сапи	3	1	23	19	18	13	9	9	53	42	79,24%

Од укупно 80 прегледаних товних јунади, уочених лезија на кожи према локализација је било на лицу, глави, врату, труп и сапима. Ове промене нису једнако подељење по регијама, већ је било и грла које су имале кожне лезије на више места. Након тридесет дана од како је дијагностикована трихофитоза код товне јунади, како је урађена дезинфекција објекта и како су товна јунад изложена дејству сунца уз витаминско-минерали додатак у храни, уочило се да је 73,14% грла и даље било са лазијама на кожи, које су карактеристичне за трихофитозу.

Међутим, код товне јунади са других пет индивидуалних газдинстава којих је било 100 (n=100) могао се уочити ефекат терапије. Терапија се састојала од примене препарата Dekanol® прскањем коже два пута у размаку од 15 дана. После примене последње терапијске дозе препарата, ефекат дате терапије је посматран након 15 дана, што значи да је цео процес трајања огледа трајао 30 дана. У табели 2 се налазе резултати са локализацијом и типизацијом кожних лезија са пет газдинстава где се примењивала терапија, а укупан број товних јунади са ових пет газдинстава је био 100.

Табела 2. Збирни резултати локализације и типизације лезија на кожи након постављања дијагнозе и након 15 дана од последње терапије

Локација кожних лезија	Типизација кожних лезија и број товних јунади са променама								Σ товне јунади		% без опорвака
	Лезије са длаком		Лезије без длаке		Красте		Кератинизација				
	Пре	После	Пре	После	Пре	После	Пре	После	Пре	После	
Лице	5	0	16	1	7	0	24	1	52	2	3,85%
Глава	36	0	29	1	13	0	35	4	113	5	4,42%
Врат	32	1	2	0	19	0	17	1	70	2	2,86%
Труп	19	0	4	0	25	0	3	0	51	0	0%
Сапи	22	0	19	1	31	0	22	1	94	2	2,13%

Од укупно 100 прегледаних товних јунади, уочених лезија на кожи према локализација је било на лицу, глави, врату, труп и сапима. Ове промене нису једнако подељење по регијама, већ је било и грла које су имале кожне лезије на више места. Након три-

десет дана од како је дијагностикована трихофитоза код товне јунади, како је урађена дезинфекција објекта и 15 дана од примене последње терапије, уочило се да је само 2,65% грла било са лазијама на кожи, које су карактеристичне за трихофитозу.

ДИСКУСИЈА

Трихофитоза говеда је велики проблем ветеринарима, али и људима који раде са животињама због зоо-нотског карактера. Најчешћи узрочник дерматофитоза говеда је гљивица *Trichophyton verrucosum*, која има зоо-нотски карактер и која има моћ брзог ширења, како са животиње на животињу, тако и на човека.

На телу оболелих животиња јављају се сиво-беле промене, и то локално, најчешће на врату и глави, али се могу јавити и на предњим екстремитетима, грудима и сапима. Ове промене су величине 10-50 mm, овалног облика, благо испупчене, са крастама које се тешко одвајају, и веома често на месту ових промена длака је опала. Такође, присутно је константно перутање коже на месту тих промена. У просеку, број промена на једној животињи је између 10 и 30, али може ићи и до 50 (Sayfarth et al., 2011). У току овог истраживања није забележено перутање коже на местима где су постојале лезије изазване гљивицом *Trichophyton verrucosum*. Највећи број лезија на кожи у свих десет индивидуалних газдинстава је био на глави и сапима. Крaste су у највећем броју биле локализоване на сапима, док је процес кератинизације захватао највећим делом главу товне јунади.

Терапија се прилично разликује међу државама, јер није свуда исто регулисана употреба одређених активних једињења из препарата. У свету су у употреби купке или спрејеви са 4%

раствором калцијум-сулфида, затим 0,5% натријум-хипохлорита или 1% раствором повидон јода. Појединачне промене се могу третирати лосионима и мастима на бази миконазола или клотримазола (Шаманц и Стаматовић, 1999).

У Србији се користе препарати деканол и иманверол, а у задње време се све више користи вакцина (Радојчић и сар., 2017). Управо примена деканола у току овог истраживања је показала позитиван ефекат у циљу лечења товне јунади од гљивично-кожног обољења трихофитозе.

Вакцинацијом се спречава појава обољења, инфицирање других животиња и људи, као и инфицирање околине, те је вакцина веома користан начин сузбијања ове болести. Четрнаест дана након вакцинације, врши се ревакцинација. Испитивањем ефекта атенуиране вакцине на говеда која су оболела од трихофитозе, Arslan et al. (2007) су дошли до закључка да применом вакцинације оболелих говеда долази до брзог оздрављења без нарушавања функције виталних органа као што су јетра и бубрези.

Када је у питању обољење трихофитоза, посебну пажњу треба обратити на хигијену објеката и животиња. Веома је важно да животиње увек имају чисту и суву простирку, да се објекти редовно изђубравају, да су животиње чисте, да постоји константан доток свежег ваз-

духа. Такође, у зимском периоду мора се обратити пажња на оптимално балансирање obroka уз додавање витамина и минерала, како би се животињама обезбедиле све потребе. Такође, на прву сумњу да је нека животиња оболела треба је издвојити у карантин, дезинфиковати сав прибор и део објекта

са којим је била у контакту и што пре кренути са терапијом, јер се на основу овог истраживања може приметити одсуство ефекта излечења применом излагања грла сунцу и додавањем витамина и минерала у храну уз претходну дезинфекцију објекат у којем су смештена товна јунад.

ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата истраживања може се закључити да на појаву настанка обољења трихофитозе утичу стесогени фактори као што је транспорт, као и неадекватни хигијенски услови објекта у којима су смештена товна јунад.

Такође, за постизање брзог ефекта сузбијања трихофитозе, најбоље је примењивати терапију или још боље спроводити вакцинацију товне јунади уз примену квалитативне исхране.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agnetti F., Righi C., Scoccia E., Felici A., Crotti S., Moretta I., Papini M. (2014). *Trichophyton verrucosum* infection in cattle farms of Umbria (Central Italy) and transmission to humans. *Mycoses*. 57(7): 400–405.
2. Arslan H.H., Yarim G.F., Yavuz O., Bas B. (2007). *Positive effects of attenuated Trichophyton verrucosum strain administration in treatment of the bovine trichophytosis*. *Revue Vet Med*. 158(10): 509–513.
3. Bojkovski J., Giadinis N., Rogožarski D., Relić R., Savić B., Pavlović I. (2013). *Prikaz kliničkih slučajeva trihoficije i papilomatoze kod visoko mlečnih krava*. *Zbornik naučnih radova*, Institut PKB, Agroekonimk Beograd. 19(3-4): 115–121.
4. Bojkovski J., Hristov S., Stanković B., Jaksimović-Todorović M., Davidović V., Zlatanović Z. (2007). *Bolesti kože visoko-mlečnih krava*. *Simpozijum Veterinarska medicina, stočarstvo, i ekonomika u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, sa međunarodnim učešćem*, Herceg Novi 25.06.-1.07. *zbornik radova* str.25.
5. El-Tras W.F., Tayel A.A., Mohamed R.A., El-Kordy D.M., El-Kady N.N., Samir A. (2015). *Mixed rearing correlates with the existence of Trichophytonverrucosum pathogens in humans*. *Dermatologica Sinica*. 33(3): 130–133.
6. Morrell J., Stratman E. (2011). *Primary Care and Specialty Care Delays in Diagnosing Infection Related to Cattle Exposure*. *Journal of Agromedicine*. 16(4): 244–250.

7. O'Gorman S.M., Britton D., Collins P. (2015). *An uncommon dermatophyte infection: two cases of cutaneous infection with Trichophyton verrucosum*. Clinical and Experimental Dermatology. 40(4): 395–398.
8. Papini R., Nadoni S., Fanelli A., Mancianti F. (2009). *High Infection Rate of Trichophyton verrucosum in Calves from Central Italy*. Zoonoses and Public Health. 56(2): 59–64.
9. Rogožarski D., Bojkovski J., Relić R., Savić B., Pavlović I. (2012). *Contribution to knowledge trichophytia by cattle*. Bulltein UASVM Cluj-Napoca Symposiums, The 11th International Symposium “Prospects for the 3rd millennium agriculture, Veterinary Medicine. 69 (1-2): 428-430.
10. Radojičić B., Bojkovski J., Jonić B., Ćutuk R. (2017). *Bolesti preživara*. Akademski misao, Beograd, II izdanje, osnovni udžbenik za studente Fakulteta veterinarske medicine, Beograd.
11. Sayfarth F., Roediger C., Graser Y., Erhard M., Burmester A., Elsner P., Hipler U.C. (2011): *Case report: Trichophyton verrucosum infection after needlestick injury with an attenuated live vaccine against cattle ringworm*. Mycoses. 54(6): 870–876.
12. Seebacher C., Bouchara J.-Ph., Mignon B. (2008). *Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections*. Mycopathologia. 166(5-6): 335–352.
13. Summerbell R. (2000). *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Revista Iberoamericana de Micología. 17(1): 30–43.
14. Шаманц Х., Стаматовић С. (1999). *Болести њовега*. Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Београд.

Рад примљен: 30.04.2018.

Рад прихваћен: 11.10.2018.

DOI 10.7251/VETJEN1802428R

UDK 616.5-002.828:636.2

Original scientific paper

TRICHOPHYTOSIS IN BEEF CATTLE^{1*}

Ivana DAVIDOV^{1*}, Miodrag RADINOVIĆ¹, Zorana KOVAČEVIĆ¹,
Mihajlo ERDELJAN¹, Annamaria GALFI¹, Saša ILIĆ¹

¹ Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Serbia

* Corresponding author, e-mail: ivana.davidov@polj.edu.rs

Abstract: Trichophytosis is one of the most common skin diseases in cattle. Trichophytosis is a transmissible infectious skin disease caused most often by *Trichophyton verrucosum* with spores which can remain alive for years in a dry environment. This is a zoonotic disease, as it can equally infect people and animals. The infection spreads rapidly, and this fungal disease leads to certain economic losses. Direct contact with infected animals is the most common method of spreading the infection. During this research, beef cattle aged 4 months were transported from southern Serbia to the part of Vojvodina - Mačva. One month after the transportation, the characteristic gray-white round changes occurred on the skin of beef cattle. Affected animals from five individual farms did not receive any treatment, while animals from other five farms were treated with Decanol® solution. As a conclusion, application of therapy or vaccination along with a high quality diet is the best way to suppress triphophytosis.

Keywords: Trichophytosis, beef cattle, zoonosis

^{1*} Presented at the 23rd Annual Consulting of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (B&H).
Teslic, June 6-9, 2018

INTRODUCTION

Fungal diseases of the skin are very common in humans and animals and are zoonotic in general. One of these diseases is trichophytosis of cattle, which leads to a decrease in the quality of milk, meat and skin, and causes great economic damage. On the other hand, since it can be transmitted to humans, it is also a major threat to human public health (Agnetti et al., 2014; El-Tras et al., 2015). In recent years, in the world and in Serbia (Rogožarski i sar., 2012), more and more cases of this disease have been reported. It is estimated that on average 30% of the total number of cattle at some point was infected with this fungus, but variations are great depending on the region. The most endangered are the regions of South Europe and the Middle East. A large number of infected herds were reported in Italy, the province of Umbria, where there are farms where 100% of the animals are infected (Papini et al., 2009; Agnetti et al., 2014).

Trichophytosis is most commonly recognized in cattle, although donkeys, dogs, goats, sheep and horses can also suffer from it. It is particularly present in the conditions of conventional intensive dairy farming, where high-producing cattle breeds are cultivated, such as the Holstein-Friesian cows. The incidence of this disease is higher in late autumn and winter, which is understandable if the conditions of keeping animals are observed. In winter the animals are kept in the stables, where conditions of

accommodation and hygiene are often unsatisfactory. Also, in winter, animal nutrition is inadequate and weaker, and cattle immunity decreases (Papini et al., 2009).

The causative agent of trichophytosis is trichophyton verrucosum, which has the ability to infect humans. This fungus creates very resistant spores that transmit infections. In dry matter the spores remain capable of multiplication for several years. Changed parts of the skin are resistant to ultraviolet light (Seebacher et al., 2008). Trichophyton germinates in the epidermis, grows into hair follicles and root, and the hair breaks and falls out. Fungus lives on the surface of the skin, with its proteolytic and keratolytic enzymes and exotoxins causing parakeratosis and inflammatory changes (Summerbell, 2000; Boykovsky et al., 2013). The fungus Trichophyton verrucosum is considered to be a facultative pathogen, and it favors moist climate, warm weather and unhygienic conditions of keeping (Morrell et Stratman, 2011).

In large herds it retains for years, so bringing younger heads of cattle to the herd allows spreading, because they are not sufficiently resistant. The lack of vitamin A is presumed to be conducive to the onset and spread of the disease, which is also contributed by inadequate nutrition, chronic skin and parasitic diseases. Antibodies were found in the blood serum of the animals which had

this disease (Šamanc i Stamatović, 1999; Radojčić et al., 2017).

On the body of infected animals, there are gray and white changes, locally, most often on the neck and head (forehead region and around the eyes), but they can occur on the forelimbs, chest and croup. These changes are 10-50 mm in size, oval in shape, slightly protruding, with hard-to-reach scabs, and very often hair falls out in these areas. Also, constant dandruff is present. On average, the number of changes on one animal is between 10 and 30, but it can go up to 50 (Sayfarth et al., 2011). The most prone to this disease are female herds, especially heifers and calves younger than 12 months, although it often occur in cows as well. Infection and transmission of the disease is caused by direct contact between diseased and healthy animals, but also indirectly, from the infected environment, since

the spores can remain vital up to four years (Papini et al., 2009; O'Gorman et al., 2015; Bojkovski et al., 2007).

Since this disease is zoonotic, the most endangered are people who are in direct contact with affected animals, such as milkers, veterinarians, support staff in the stables, people working in leather processing and others (Agnetti et al., 2014; El- Tras et al., 2015). In humans, these changes appear mainly on the head, the chin area, but often also on the exposed parts of the body, such as nails, fists, and hands. Symptoms are similar to those of infected animals, most often with hairless seals if the disease is on the head, and circumscribed erythematous can occur in the forearm region (Agnetti et al., 2014; El-Tras et al., 2015). The aim of this paper is to notice the extent to which skin changes occur in beef cattle after transportation, placed in facilities with inadequate hygienic conditions.

MATERIAL AND METHODS

In July 2017, trichophytosis occurred among beef cattle kept on ten rural farms in the village of Bogatić in Mačva district. Based on the anamnestic data, beef cattle originated from southern Serbia (Pirot, Leskovac, Vranje) and were brought to Mačva by road transport. The whole herd was of 4 months old Simmental breed cattle. Within thirty days, the owners noticed round gray-white seals on the animals' head, neck and back. The total number of females with changes in the skin, on all ten farms, was 180. From all heads of cattle, scarified skin was

taken from altered skin spots to isolate the causative agent and set up a correct diagnosis. The scrapings were sent to a laboratory in a 10% KOH solution, where the causative agent of trichophytosis was detected under a light microscope. Since microscopic examination is sometimes insufficient, the next step was inoculation into medium in which the colonies in the form of beads characteristic for the fungus *Trichophyton verrucosum*, have grown.

After the isolation of the pathogens and the confirmation of trichophytosis

in beef cattle from all ten individual farms, on five of them affected animals were treated with Dekanol® preparation by spraying it twice in 15 days or by rubbing the preparation with soft cloth around the eyes. Prior to the therapy, scabs were carefully cleaned with a soft cotton cloth. All cotton cloths were burned after the use. Affected animals

on the other 5 farms were exposed to the sun and they were given vitamin-mineral supplements in the diet. In all ten individual farms, diseased herds were separated from healthy ones and the facilities were disinfected. All obtained results were processed with standard statistical methods using Microsoft Office Excel 2007.

RESULTS

Trichophyton verrucosum fungus was isolated from all 180 heads of cattle that had a clear clinical picture of trichophytosis such as gray-white

circumscribed lesions with or without hair on the skin of the head, face, neck, body and croup (Figures 1 and 2).



Figure 1. Findings of characteristic gray-white changes in the skin of beef cattle



Figure 2. Gray-white circumscribed lesions on the body

Before the application of the therapy or the exposure of beef cattle to the sun and the addition of vitamin and mineral supplements in food, skin lesions were examined and their localities and numbers were recorded. Of the total number of beef cattle (n = 180), lesions on the skin had a different appearance regardless of the localization of the change.

Table 1 shows the results with the localization and type of skin lesions from five farms where no therapy was applied, but the animals were exposed to the sun and were being given vitamin and mineral supplements for 30 days. The total number of beef cattle from these five farms was 80.

Location of skin lesions	Types of skin lesions and number of animals with changes								Σ beef cattle		% without recovery
	Lesions with hair		Lesions without hair		Scabs		Keratinization				
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	
Face	19	12	11	8	0	0	7	5	37	25	67,57%
Head	1	0	21	17	5	0	15	11	42	28	66,67%
Neck	0	0	15	12	9	5	7	6	31	23	74,19%
Body	0	0	13	9	14	11	14	12	41	32	78,05%
Croup	3	1	23	19	18	13	9	9	53	42	79,24%

Out of 80 examined animals, lesions on the skin were localized on the face, head, neck, body and croup. These changes are not equally distributed by regions, there were also herds that had skin lesions in multiple locations. Thirty days after diagnosing trichophytosis, disinfection of the facility, exposure of the animals to the sun along with the vitamin-mineral supplements in the diet, 73.14% of the animals still had skin lesions characteristic for trichophytosis.

However, in the case of beef cattle from the other five farms with 100

animals (n = 100), the effect of the therapy was noticeable. The therapy consisted of the application of Decanol® by spraying the skin twice in 15 days. After administration of the last therapeutic dose, the effect of therapy was observed after 15 days, which means that the experiment lasted for 30 days.

Table 2 shows the results with the localization and classification of skin lesions from five farms where therapy was applied and the total number of animals was 100.

Table 2. Collective results of localization and classification of skin lesions after diagnosis and 15 days after the last treatment

Location of skin lesions	Classification of skin lesions and number of animals with changes								Σ beef cattle		% without recovery
	Lesions with hair		Lesions without hair		Scabs		Keratinization				
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	
Face	5	0	16	1	7	0	24	1	52	2	3.85%
Head	36	0	29	1	13	0	35	4	113	5	4.42%
Neck	32	1	2	0	19	0	17	1	70	2	2.86%
Body	19	0	4	0	25	0	3	0	51	0	0%
Croup	22	0	19	1	31	0	22	1	94	2	2.13%

In a total of 100 examined animals, lesions on the skin were found on the face, head, neck, body and croup. These changes are not equally distributed by regions, but there were also animals with skin lesions in multiple locations. Thirty

days after the diagnosis of trichophytosis in beef cattle, disinfection of the facility, and 15 days after the last therapy, only 2.65% of the animals was detected with skin lesions characteristic for trihophytosis.

DISCUSSION

Trihofitosis is a major problem for veterinarians, but also for people who work with animals due to its zoonotic character. The most common cause of trihophytosis is fungi Trichophyton verrucosum, which has a zoonotic character and spreads rapidly both to animals and humans.

On the body of affected animals, gray-white changes occur locally, most often on the neck and head, but they may also occur on the front limbs, the chest and the croup. These changes are 10-50 mm in size, oval in shape, slightly protruding, with hard-to-reach scabs, and very often hair falls out in these

areas. Also, constant dandruff is present. On average, the number of changes on one animal is between 10 and 30, but it can go up to 50 (Sayfarth et al., 2011). During this study, dandruff was not observed on the lesions caused by the fungus *Trichophyton verrucosum*. The greatest number of skin lesions in all ten individual farms was on the head and croup. Scabs were mostly found on croups while keratinization was present mostly on head.

The treatment varies considerably among countries, as the use of certain active compounds is not everywhere regulated in the same way. Worldwide, baths or sprays are used with 4% calcium sulfate solution, 0.5% sodium hypochlorite or 1% povidone-iodine solution. Individual changes can be treated with lotions and ointments based on myconazole or clotrimazole (Šamanc and Stamatović, 1999). In Serbia, decanol and imaverol preparations are used, and the vaccine is increasingly being used (Radojčić et al., 2017). The application of the decanol during this study has shown a positive effect in the treatment of trichophytosis in beef cattle. Vaccination prevents the onset of the disease, the infection of other animals and humans, as well as the infection

of the environment, and the vaccine is a very useful way of suppressing this disease. Fourteen days after vaccination, revaccination is performed. By examining the effect of attenuated vaccine on cattle suffering from triphochytosis, Arslan et al. (2007) have come to the conclusion that vaccination of diseased cattle leads to rapid healing without disturbing the function of vital organs such as the liver and kidneys.

When it comes to this disease, special attention should be paid to hygiene of the objects and animals. It is very important that animals always have a clean and dry rug, that objects are regularly disinfected, that the animals are clean and that there is a constant supply of fresh air. Also, in the winter period, attention must be paid to optimal balancing of the meals with the addition of vitamins and minerals. When the disease is suspected, the affected animal should automatically be quarantined, the object and equipment should be disinfected and the therapy should be applied as soon as possible as this research shows the absence of the effect of curing by exposing cattle to the sun and adding vitamins and minerals in the food with a previous disinfection of the facility.

CONCLUSION

Based on the results of the research it can be concluded that the appearance of trichophytosis is influenced by the stressogenic factors such as transport, as well as inadequate hygienic conditions of the beef cattle handling facilities.

Also, in order to achieve a rapid effect on the suppression of trichophytosis, it is best to apply therapy or an even better option is to implement vaccination along with a high quality diet.

REFERENCES

1. Agnetti F., Righi C., Scoccia E., Felici A., Crotti S., Moretta I., Papini M. (2014). *Trichophyton verrucosum* infection in cattle farms of Umbria (Central Italy) and transmission to humans. *Mycoses*. 57(7): 400–405.
2. Arslan H.H., Yarim G.F., Yavuz O., Bas B. (2007). *Positive effects of attenuated Trichophyton verrucosum strain administration in treatment of the bovine trichophytosis*. *Revue Vet Med*. 158(10): 509-513.
3. Bojkovski J., Giadinis N., Rogožarski D., Relić R., Savić B., Pavlović I. (2013). *Prikaz klinčkih slučajeva trihoficije i papilomatoze kod visoko mlečnih krava*. *Zbornik naučnih radova, Institut PKB, Agroekonimk Beograd*. 19(3-4): 115-121.
4. Bojkovski J., Hristov S., Stanković B., Joksimović-Todorović M., Davidović V., Zlatanović Z. (2007). *Bolesti kože visoko-mlečnih krava*. *Simpozijum Veterinarska medicina, stočarstvo, i ekonomika u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, sa međunarodnim učešćem, Herceg Novi 25.06.-1.07. zbornik radova str.25*.
5. El-Tras W.F., Tayel A.A., Mohamed R.A., El-Kordy D.M., El-Kady N.N., Samir A. (2015). *Mixed rearing correlates with the existence of Trichophytonverrucosum pathogens in humans*. *DermatologicaSinica*. 33(3): 130–133.
6. Morrell J., Stratman E. (2011). *Primary Care and Specialty Care Delays in Diagnosing Infection Related to Cattle Exposure*. *Journal of Agromedicine*. 16(4): 244–250.
7. O'Gorman S.M., Britton D., Collins P. (2015). *An uncommon dermatophyte infection: two cases of cutaneous infection with Trichophyton verrucosum*. *Clinical and Experimental Dermatology*. 40(4): 395–398.
8. Papini R., Nadoni S., Fanelli A., Mancianti F. (2009). *High Infection Rate of Trichophyton verrucosum in Calves from Central Italy*. *Zoonoses and Public Health*. 56(2): 59–64.
9. Rogožarski D., Bojkovski J., Relić R., Savić B., Pavlović I. (2012). *Contribution*

- to knowledge trichophytia by cattle*. Bulltein UASVM Cluj-Napoca Symposiums, The 11th International Symposium "Prospects for the 3rd millennium agriculture, Veterinary Medicine. 69 (1-2): 428-430.
10. Radojičić B., Bojkovski J, Jonić B, Ćutuk R. (2017). *Bolesti preživara*. Akademska misao, Beograd, II izdanje, osnovni udžbenik za studente Fakulteta veterinarske medicine, Beograd.
 11. Sayfarth F., Roediger C., Graser Y., Erhard M., Burmester A., Elsner P., Hipler U.C. (2011): *Case report: Trichophyton verrucosum infection after needlestick injury with an attenuated live vaccine against cattle ringworm*. Mycoses. 54(6): 870–876.
 12. Seebacher C., Bouchara J.-Ph., Mignon B. (2008). *Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections*. Mycopathologia. 166(5-6): 335–352.
 13. Summerbell R. (2000). *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*. Revista Iberoamericana de Micología. 17(1): 30–43.
 14. Шаманц Х., Стаматовић С. (1999). *Болести њовега*. Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду, Београд.

Paper received: 30.04.2018.

Paper accepted: 11.10.2018.

DOI 10.7251/VETJ1802446H

UDK 637.3:[637.12.054:543.635.3

*Originalni naučni rad***MASNO-KISELINSKI SASTAV LIVANJSKOG SIRA^{1*}**

**Amina HRKOVIĆ-POROBIJA^{1*}, Aida HODŽIĆ¹,
Mensur VEGARA², Lejla VELIĆ¹, Aida KAVAZOVIĆ¹,
Almira SOFTIĆ¹, Tarik MUTEVELIĆ¹, Ermin ŠALJIĆ¹**

¹ Veterinarski fakultet Sarajevo, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

² Norwegian University of Life Sciences, Aas, Norway As, Norway

* Korespondentni autor: Amina Hrković-Porobija, e-mail: amina.hrkovic@vfs.unsa.ba

Kratak sadržaj: Tokom svoje 132-godišnje proizvodnje, karakteristike Livanjskog sira su se mijenjale, najprije zbog prelaska sa ovčijeg na kravlje mlijeko, odnosno njihovu mješavinu. Livanjski sir svoju specifičnost može zahvaliti, prije svega, prisustvu specifičnog biljnog pokrivača planinskog područja, klimatskim uvjetima i mlijeku autohtone ovce pramenke. Cilj ovoga rada je odrediti masno-kiselinski sastav Livanjskog sira, sa posebnim osvrtom na sadržaj bioaktivnih komponenti koje imaju pozitivan efekat po zdravlje ljudi, kao i na praćenje eventualnih promjena u njihovom sadržaju u ovisnosti o periodu uzorkovanja, odnosno hranidbe. Za proizvodnju Livanjskog sira, koji je uzorkovan nakon 90 dana zrenja u ambijentalnim uslovima, korišteno je zbirno mlijeko ovaca, uz napomenu da je ovčijem mlijeku dodavano kravlje, u odnosu (80:20) koji se uobičajeno koristi u tradicionalnoj proizvodnji ovog sira. Uzorci su analizirani gasnim hromatografom u laboratoriji „As Vitas“ Oslo Innovation Centre, prema proceduri opisanoj u radu Luna i saradnici (2005). Ukupno su određene 24 masne kiseline, kroz tri vremenska perioda uzorkovanja (juli, august i septembar). U uzorcima sira, sadržaj zasićenih masnih kiselina (SFA) bio je veći u odnosu na mononezasićene (MUFA) i polinezasićene (PUFA). Sastav masnih kiselina ispitivanih uzoraka sira je specifičan, jer sadrži masne kiseline za koje je dokazano da imaju izuzetno povoljan efekat po ljudsko zdravlje.

Ključne riječi: *ovca, mlijeko, sir, masne kiseline, zdravlje*

^{1*} Презентован на 23. Годишњем савјетовању доктора ветеринарске медицине Републике Српске (БиХ). Теслић, 6-9- јуна 2018.

UVOD

O korisnim sastojcima mlijeka i mliječnih proizvoda je puno toga napisano, no postoji stav jednog dijela nutricionističkih stručnjaka da su mliječne masnoće štetne zbog visokog sadržaja zasićenih masnih kiselina i trans-masnih kiselina. Sir, kao koncentrirani mliječni proizvod, ima ogromnu popularnost u ishrani, zbog njegovog okusa, funkcionalnosti i nutritivnih svojstava. Sir je izvor visokokvalitetnih proteina, kalcija i mnogih drugih važnih nutrijenata, koji daju vrijedan doprinos kvalitetnoj prehrani.

Sir je značajan izvor masti u ljudskoj ishrani i sadrži mnoštvo masnih kiselina. Masti sira trenutno imaju negativan imidž, uglavnom zbog percepcije potrošača o zasićenim i *trans*- masnim kiselinama na zdravstveno stanje kardiovaskularnog sistema. Uprkos prisustvu značajnih količina takvih masnih kiselina, nema jasnih dokaza koji potvrđuju da konzumiranje sira negativno utiče na bilo koju bolest. Štaviše, sir sadrži i druge masne kiseline, npr. konjugovanu linolnu kiselinu i oleinsku kiselinu, koje imaju potencijal da poboljšaju dugoročno zdravlje. Proizvodnja kvalitetnog ovčijeg sira, u prvom redu ovisi o kvaliteti mlijeka za sirenje, odnosno o njegovim fizičko-hemijskim, a posebno higijenskim osobinama. U proizvodnji autohtonih sireva koristi se sirovo mlijeko ovaca držanih na ekstenzivan način, pri čemu je njihova mliječnost manja, a hemijski sastav mlijeka za sirenje karakteriziran

je visokim udjelom pojedinih sastojaka (Matutinović i sar., 2007). Sirevi proizvedeni od sirovog mlijeka brže zriju i imaju intenzivniji okus u odnosu na industrijski proizvedene sireve (Savić, 2010). Imajući u vidu visok kvalitet ovčijeg mlijeka, koji karakteriše niska alergena aktivnost, visoka koncentracija nutraceutičkih jedinjenja i relativno visoka cijena ovčijeg sira, postoji značajan potencijal svjetskog tržišta za ovu industriju. Zbog toga što se velike količine ovčijeg mlijeka pretvaraju u sir, kvalitet mlijeka se ocjenjuje u smislu njegovih tehnoloških i koagulacionih svojstava, koja zavise prvenstveno od sadržaja masti i proteina. Međutim, sve veća pažnja potrošača na nutritivne i zdravstvene aspekte hrane, usmjerila je proizvođače mliječnih ovaca u pravcu postizanja odgovarajućeg sastava mliječnih lipida (Nuda i sar., 2014). Dugo vremena percepcija potrošača o mastima animalnog porijekla je bila povezana sa povećanim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, posebno zbog velike količine SFA. Sastav masnih kiselina i koncentracija u mlijeku ovisi o dva glavna faktora: zdravstvenog stanja životinje, uključujući pasminu, dob, stadij laktacije, okolišne faktore, i ishrane životinja s posebnim naglaskom na vrstu krmne smjese (Falchero i sar., 2010). Glavne promjene u ishrani koje se ciljano rade su smanjenje zasićenih odnosa nezasićenih masnih kiselina i povećanje nivoa konjugirane linolne kiseline i omega-3 polinezasićenih

masnih kiselina. Ishrana životinja je glavni faktor koji reguliše sastav mliječnih masti, a manipulacija hranom sa različitim vrstama masti smatra se ključnom strategijom za postizanje poželjnog profila masnih kiselina.

U ovom radu smo istražili masno-kiselinski sastav Livanjskog sira, koji je jedan od najpoznatijih sireva s područja bivše Jugoslavije. Riječ je o tvrdom, punomasnom siru, koji ima umjereno slan, pikantan okus, tipičan za ovčije

sireve. Livanjski sir svoju specifičnost može zahvaliti prije svega specifičnosti biljnog pokrivača planinskog područja, klimatskim uslovima i mlijeku autohtone ovce pramenke. Danas se, posebno u periodima kada nema ovčijeg mlijeka, Livanjski sir pravi na isti način, ali u različitim omjerima ovčjeg i kravljeg mlijeka, ponekad i samo od kravljeg mlijeka, što je naznačeno na etiketi.

MATERIJAL I METODE

Za istraživanje determinirajući faktor bila je tradicionalna tehnologija proizvodnje. Ispitivanja su izvedena na ovcama pasmine pramenka. Životinje su bile označene odgovarajućim brojem ušne markice, na osnovu kojih su se uzimali uzorci uvijek od istih životinja, kroz različite vremenske periode. U toku uzimanja uzoraka, hranidba ovaca bazirala se na ispaši. Istraživanje je obuhvatalo uzimanje svježeg ovčijeg mlijeka u toku jutarnje muže koja se obavljala ručno, a za proizvodnju Livanjskog sira korišteno je zbirno mlijeko ovaca od kojih smo prethodno uzorkovali mlijeko, uz napomenu da je ovčijem mlijeku dodavano kravlje, u odnosu (80:20) koji se uobičajeno koristi u tradicionalnoj proizvodnji ovog sira. Uzorci su uzorkovani nakon 90 dana zrenja u izvornim ambijentalnim uvjetima. U uzorcima sira, metodom gasne hromatografije (GC), određena je masno-kiselinska kompozicija: maslačna (C4:0), kapronska (C6:0), kaprilna (C8:0),

kaprinska (C10:0), laurinska (C12:0), miristinska (C14:0), pentadekanska (C15:0), palmitinska (C16:0), margarinna (C17:0), stearinska (C18:0), arahinska (C20:0), miristoleinska (C14:1cis-9), palmitoleinska (C16:1 cis-9), oleinska (C18:1 cis-9), C18:1 cis-11, elaidinska (C18:1 trans-9), C18:1 trans-10, vakcenska (C18:1 trans-11), arahidonska (C20:4c5,c8,c11,c14), eikosapentaenska kiselina (C20:5c5,c8,c11,c14,c17), dokosaheksaenska kiselina (C22:6 c7,c10,c13,c16,c19), linolna (C18:2 n-6), α linolenska (C18:3 n-3), rumenska (C18:2 cis-9 trans-11 CLA).

Uzorci su poslani u zamrznutom stanju na suhom ledu i analizirani u laboratoriji „As Vitas“, Oslo Innovation Centre, Norveška. Uzorci sira su prije analize odmrznuti na sobnoj temperaturi i homogenizirani. Priprema uzoraka je izvršena prema proceduri opisanoj u radu Luna i saradnika (2005), koja uključuje izdvajanje mliječne masti centrifugiranjem i metilaciju masnih

kiselina, pri čemu nastaju metil-estri masnih kiselina (FAME), koji se analiziraju na gasnom hromatografu. Primijenjena je GC metoda sa velikom rezolucijom, koja omogućava veoma dobru separaciju FAME. Korištena je kolona Select FAME dužine 200 mm i izotermalna separacija pika 18:1. Analiza je vršena na instrumentu Agilent 689N GC sa split/splitless injektorom, autosemplerom 7683B i plameno-jonizacijskim detektorom (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Separacija je izvedena korištenjem kapilarne kolone od staljenog silicijum dioksida (Varian Inc.) CP-SELECT CBFOR FAME (200 mm dužina, 0,25 mm unutrašnji dijametar i 0,25 µm debljina filma). Primijenjen je sljedeći temperaturni program: početna temperatura od 70°C održavana je 4 minute, zatim zagrijavanje brzinom od 20°C u minuti do temperature od 160°C,

koja se održava 80 minuta, a potom zagrijavanje brzinom od 3°C u minuti do temperature od 220°C, koja se održava 28 minuta. Kao gas nosač korišten je vodik sa pritiskom od 314 kPa. Analiza masnih kiselina (C4:0-C22:6) provedena je autoinjektiranjem po 1 µl uzorka pri odnosu splita od 70:1, protokom vodika od 151 ml/min i temperturi od 280°C. Temperatura plameno-jonizacijskog detektora bila je 290°C uz brzinu protoka vodika od 40 ml/min, vazduha od 450 ml/min i azota (kao make-up gasa) od 45 ml/min. Frekvencija snimanja tačaka na hromatogramu iznosila je 10 Hz (očitanje 10 puta u sekundi), a vrijeme snimanja jednoga hromatograma 136 minuta. Dobiveni rezultati izraženi su u gramima pojedinačnih masnih kiselina na 100 g ukupnih masnih kiselina (g/100 g FA).

REZULTATI

U Tabeli 1. dat je prikaz utvrđenih vrijednosti masnih kiselina u mliječnoj masti Livanjskog sira, po periodima uzorkovanja. U klasi SFA najveće utvrđene vrijednosti su bile kod C16:0, C18:0 i C14:0 kiselina. Za C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 i C15:0 utvrđene su veće vrijednosti u III

periodu uzorkovanja u odnosu na I i II uzorkovanje (Tabela 1.). Iz klase MUFA najveća vrijednost utvrđena je za oleinsku kiselinu u II periodu uzorkovanja, dok je vrijednost VA bila najmanja u III periodu uzorkovanja. U klasi PUFA dominirale su C18:2 n-6 i C18:3 n-3.

Tabela 1. Sadržaj masnih kiselina u mliječnoj masti Livanjskog sira po periodima uzorkovanja

	I uzorkovanje	II uzorkovanje	III uzorkovanje
Masna kiselina (g/100g FA)	SFA		
Maslačna C4:0	0,96	0,85	1,0

Kaprinska C6:0	0,73	0,59	1,0
Kaprilna C8:0	0,67	0,52	1,0
Kaprinska C10:0	2,32	1,86	3,32
Laurinska C12:0	2,02	1,78	2,80
Miristinska C14:0	8,83	8,47	9,92
Pentadekanska C15:0	1,20	1,17	1,26
Palmitinska C16:0	24,97	25,02	24,43
Margarinska C17:0	1,04	1,03	0,08
Stearinska C18:0	12,19	11,78	11,24
Arahinska C20:0	0,51	0,53	0,43
	MUFA		
Miristoleinska C14:1 cis-9	0,26	0,34	0,49
Palmitoleinska C16:1 cis-9	0,93	1,18	1,13
Oleinska C18:1 cis-9	21,98	23,41	23,08
C18:1 cis-11	0,93	0,97	0,69
Elaidinska C18:1 trans-9	0,29	0,73	0,34
C18:1 trans-10	0,41	0,33	0,22
Vakcenska C18:1 trans-11	3,34	3,34	2,49
	PUFA		
Arahidonska C20:4 n-6	0,12	0,14	0,13
Eikosapentaenska C20:5 n-3 (EPA)	0,11	0,11	0,08
Dokosaheksaenska C22:6 n-3 (DHA)	0,07	0,06	0,08
Linolna C18:2 n-6	2,11	2,25	2,25
α - linolenska C18:3 n-3	1,48	1,07	1,25
Rumenska C18:2 cis-9, trans-11 (CLA)	0,59	0,58	0,60
Σ n-3	1,66	1,24	1,41
Σ n-6	2,23	2,39	2,38
Σ SFA	55,44	53,6	56,48
Σ MUFA	28,14	30,30	28,44
Σ PUFA	4,48	4,21	4,39
Σ UFA	32,62	34,51	32,83
Odnosi suma masnih kiselina			
n-6/n-3	1,34	1,92	1,68
SFA/MUFA	1,97	1,76	1,98
SFA/PUFA	12,37	12,73	12,85
MUFA/PUFA	6,28	7,19	6,47
SFA/UFA	1,69	1,55	1,72

UFA/MUFA	1,15	1,13	1,15
UFA/PUFA	7,28	8,19	7,47

SFA – zasićene masne kiseline; MUFA – mononezasićene masne kiseline; PUFA – polinezasićene masne kiseline; UFA – nezasićene masne kiseline. I, II, III – predstavljaju periode uzorkovanja: juli, august i septembar

DISKUSIJA

Hemijski sastav proizvoda animalnog porijekla, naročito sadržaj pojedinih sastojaka kao što su masne kiseline, godinama privlači veliku pažnju stručnjaka upravo zbog njihovog utjecaja na ljudsko zdravlje. Masno-kiselinski sastav sira je važan marker za određivanje karakterističnih osobina sira. Rezultati ovih istraživanja pokazuju evidentna variranja sadržaja pojedinih masnih kiselina u analiziranim uzorcima Livanjskog sira po periodima uzorkovanja (Tab. 1.). Sadržaj SFA u analiziranim uzorcima Livanjskog sira može biti direktna posljedica tehnološkog kvaliteta mlijeka, odnosno sadržaja masnih kiselina ustanovljenih u mlijeku. Dominantne SFA analiziranih uzoraka Livanjskog sira su C14:0, C16:0 i C18:0 (Tab. 1.).

U analiziranim uzorcima Livanjskog sira sadržaj C8:0, C12:0 i C15:0 je bio najveći u III periodu uzorkovanja. Kiseline SFA uključujući i C12:0, kada se uzmu iznad energetske potrebe, imaju hiperlipidemični i hiperholesterolemični efekat, ali ako je ishrana uravnotežena u pogledu unošenja SFA i UFA onda C12:0, kao i C16:0 i C18:0, većim dijelom mogu biti oksidirane i bez hiperlipidemičnog efekta. Organske kiseline doprinose aromi sira, koja je jedan od najvažnijih kva-

litativnih kriterija svježih i zrelih sireva. Sastav organskih kiselina u siru je važan za karakterizaciju sireva. Kiseline C4:0, C6:0 i C8:0 su glavni nosioci aroma sira, kiseline dužih lanaca su prisutne ali ne utječu na miris, dok su kiseline srednjih lanaca odgovorne za miris ovčijih masnoća. Tokom zrenja sireva dolazi do promjene i povećanja sastava organskih kiselina, te se sadržaj organskih kiselina može uzeti kao indeks zrenja sireva (Jerman, 2007). Iz grupe MUFA najveće koncentracije utvrđene su za C18:1 cis-9 i VA, a iz grupe PUFA dominantan sadržaj ustanovljen je za C18:2 n-6 i C18:3 n-3.

Masno-kiselinski sastav vjerovatno je posljedica uvjeta uzgoja, načina hranidbe i tehnologije proizvodnje. Sirevi proizvedeni od mlijeka dobivenog s planinske ispaše mogu sadržavati veći udjel UFA, što utječe na bolja reološka svojstva i povećanu primarnu proteolizu, u odnosu na sireve dobivene od mlijeka s ispaše iz doline (Matutinović i sar., 2007). Dominantan sadržaj C18:1 cis-9 u istraživanim sirevima se podudara sa literaturnim podacima (Vilušić i sar., 2008). Nudda i saradnici (2014) u svojim istraživanjima navode da sezonske varijacije utječu na sadržaj C18:1 trans-11 u siru. Sezonske promjene

se vjerovatno odnose na promjene u kvalitetu pašnjaka. Kiselina C18:2 n-6 kao esencijalna masna kiselina ne može se sintetizirati u ljudskom organizmu. Međutim, samo manji dio ove kiseline potječe iz neposredne resorpcije hrane, dok veći dio potječe iz zaliha organizma, čime se djelomično kompenziraju oscilacije u unosu hranom (Delaš i sar., 2005). Sir je značajan izvor C18:2 n-6 i njenih izomera, koji imaju potencijalnu ulogu u reduciranju rizika od karcinoma i kardiovaskularnih oboljenja (Vilušić i sar., 2008).

Odnosi SFA, MUFA i PUFA Livanjskog sira su obrnuto proporcionalni potrebama balansirane prehrane i utjecaju na ljudsko zdravlje. Σ SFA u uzorcima ispitivanog sira je bila veća u odnosu na Σ MUFA i Σ PUFA, što ovaj proizvod naizgled stavlja u nezavidan položaj sa nutricionističkog stajališta. Kiseline MUFA i PUFA pokazuju biološku aktivnost (oleinska i njeni izomeri, različiti izomeri linolne kiseline, EPA i DHA) (Marenjak i sar., 2006). PUFA pokazuju mnogobrojna pozitivna dejstva, ali je bitno napomenuti da su veoma sklone oksidaciji, kako u organizmu tako i van njega, uslijed čega dolazi do nastanka izuzetno reaktivnih

slobodnih radikala i preko njih drugih štetnih produkata oksidacije (Kravić, 2010). Proučava se antikarcinogeno djelovanje Livanjskog sira jer je dobar izvor potencijalno antikarcinogene komponente, konjugovane linolne kiseline. Kao značajan izvor linolne kiseline i njenih izomera, sir ima potencijalnu ulogu u reduciranju rizika od karcinoma i regulaciji tjelesne težine, odnosno raspodjeli masnih naslaga. Potencijalna je zaštita od srčanih bolesti i hipertenzije, a važna uloga mu se pripisuje u održavanju dobrog zdravlja kostiju, zbog visokog sadržaja kalcija. Već preko pola stoljeća koncept zdrave prehrane se temelji na izbjegavanju unosa masnoća i holesterola, pogotovo zasićenih masnih kiselina. U mnogim zemljama se još uvijek, kao dio terapije kod ljudi sa povišenim holesterolom u plazmi, preporučuje dijeta s niskim udjelom zasićenih masnih kiselina, zbog smanjenja rizika od pojave kardiovaskularnih bolesti. Povećanjem udjela polinezasićenih masnih kiselina u prehrani moguće je utjeći na smanjenje koncentracije holesterola u krvi, te smanjiti brzinu stvaranja masnih naslaga na krvnim žilama, čime se značajno smanjuje rizik od koronarnih bolesti, srčanog i moždanog udara.

ZAKLJUČAK

Odnosi SFA, MUFA i PUFA Livanjskog sira su obrnuto proporcionalni potrebama balansirane prehrane i utjecaju na ljudsko zdravlje. Σ SFA u uzorcima ispitivanog sira je bila veća u odnosu na Σ MUFA i Σ PUFA, što ovaj

proizvod naizgled stavlja u nezavidan položaj sa nutricionističkog stajališta. Kvaliteta sirovog mlijeka može se poboljšati određenom strategijom hranidbe i time povećati udio biološki aktivnih sastojaka u sirovom mlijeku,

pa u tehnološkom smislu takvo mlijeko i plasman mliječnih proizvoda visoke može biti izvrsna sirovina za preradu kvalitete kao što su sirevi.

LITERATURA

1. Delaš I., Kaćunko T., Beganović J., Delaš F. (2005): Sastav masnih kiselina majčinog mlijeka i pripravaka dječje hrane. *Млјекарство*, 55(2): 101-112.
2. Nudda A., Battacone G., Neto B.O., Dias Francesconi A.H., Cannas A., Atzori A.S., Pulina G. (2014): Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. *R. Bras. Zootec. vol.43 (8)* 1806-9290.
3. Jerman M.B. (2007): Slobodne masne kiseline u siru. Pregled tehničke kulture i dokumentacije. *Kem. Ind.*, 56(11): 621-626.
4. Matutinović S., Rako A., Kalit S., Havranek J. (2007): Značaj tradicijskih sireva s posebnim osvrtom na Lečevački sir. *Млјекарство*, 57(1): 49-65.
5. Vilušić M., Milanović S., Jukić-Grbavac M. (2008): Sastav masnih kiselina i sadržaj kolesterola u svježem siru tipa Quarg. *Preh.ind.*, 19(1-2): 28-31.
6. Luna P., Juarez M., De La Fuente M.A. (2005): Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 88(10): 3377-3381.
7. Savić Đ. (2010): Etiopatogeneza zamašćene jetre visokomliječnih krava. <http://www.Veterina.info>.
8. Falchero L., Lombardi G., Gorlier A., Lonati M., Odoardi M., Cavallero A. (2010): Variation in fatty acid composition of milk and chesse from cows. *Dairy Science of Technology* 90 (6), 657-672
9. Kravić S. (2010): Određivanje trans masnih kiselina prehrambenim proizvodima gasnom hromatografijom-masenom spektrofotometrijom. Doktorska disertacija Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
10. Marenjak T.S., Poljičak-Milas N., Delaš I. (2006): Biološki aktivne tvari u kravljem mlijeku i njihov učinak na zdravlje. *Млјекарство*, 56(2): 119-137

Rad primljen: 03.07.2018.

Rad prihvaćen: 10.10.2018.

DOI 10.7251/VETJEN1802446H

UDK 637.3:[637.12.054:543.635.3

*Original scientific paper***FATTY ACID COMPOSITION OF LIVNO CHEESE^{1*}**

**Amina HRKOVIĆ-POROBIJA^{1*}, Aida HODŽIĆ¹,
Mensur VEGARA², Lejla VELIĆ¹, Aida KAVAZOVIĆ¹,
Almira SOFTIĆ¹, Tarik MUTEVELIĆ¹, Ermin ŠALJIĆ¹**

¹ Veterinary Faculty Sarajevo, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

² Norwegian University of Life Sciences, Aas, Norway As, Norway

* Corresponding Author, Amina Hrković-Porobija: e-mail: amina.hrkovic@vfs.unsa.ba

Abstract: During its 132-year production, the characteristics of Livno cheese changed, first because of the transition from sheep to cow's milk, or their mixture. Livno cheese is specific primarily due to the presence of a specific plant cover in mountain area, climatic conditions and milk of autochthonous sheep. The purpose of this work is to determine the fatty acid composition of Livno cheese, with special reference to the content of bioactive components that have a positive effect on human health, and to tracking any changes in their content depending on the sampling or feeding period. For the production of Livno cheese, which was sampled after 90 days of ripening at ambient conditions, sheep's milk was used, mentioning that the cow's milk was added in proportion (80:20), which is commonly used in the traditional production of this cheese. Samples were analyzed by gas chromatography in As Vitas laboratory in Oslo Innovation Center, according to the procedure described in Luna and al. (2005). A total of 24 fatty acids were determined during the three sampling periods (July, August and September) In cheese samples, saturated fatty acid content (SFAs) was higher in relation to monounsaturated (MUFAs) and polyunsaturated (PUFAs) fatty acids. The fatty acid composition of the tested cheese samples is specific, because it contains fatty acids which have been proven to have an extremely beneficial effect on human health.

Key words: *sheep, milk, cheese, fatty acid, health*

^{1*} Presented at the 23rd Annual Consulting of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (B&H).
Teslic, June 6-9, 2018

INTRODUCTION

Much has been written about the beneficial ingredients of milk and dairy products, but some nutrition experts claim that dairy fat is harmful due to the high content of saturated fatty acids and trans fatty acids. Cheese, as a concentrated dairy product, has enormous popularity in nutrition, due to its taste, functionality and nutritional properties. Cheese is an important source of high-quality proteins, calcium and many other important nutrients, which give a valuable contribution to quality nutrition.

Cheese is a significant source of fat in human nutrition and contains a number of fatty acids. Fat in cheese currently has a negative image, mainly due to the perception of consumers about effects of saturated and trans fatty acids on cardiovascular system. Despite the presence of significant amounts of such fatty acids, there is no clear evidence that cheese consumption negatively affects any disease. Moreover, cheese also contains other fatty acids, e.g. conjugated linoleic acid and oleic acid, which have the potential to improve long-term health. The production of quality sheep cheese depends primarily on the quality of the milk for cheese making, or on its physical-chemical, and especially hygienic properties. Raw milk from sheep that are kept in extensive farming is used in the production of autochthonous cheeses. They produce less milk and its chemical composition is

characterized by a high share of certain ingredients (Matutinović et al., 2007). Raw milk cheeses mature faster and have a more intense taste than industrially produced cheeses (Savić, 2010). Bearing in mind the high quality of sheep's milk, characterized by low allergenic activity, high concentration of nutraceutical compounds and a relatively high price of sheep milk cheese, there is a significant potential for the world market when it comes to this industry. Because large quantities of sheep's milk are turned into cheese, milk quality is evaluated in terms of its technological and coagulative properties, which depend primarily on the fat and protein content. However, the increasing attention of consumers to the nutritional and health aspects of food, has directed dairy producers in the direction of achieving the appropriate composition of the milk lipids (Nuda et al., 2014). For a long time, consumer perception of animal fats was associated with an increased risk of cardiovascular disease, especially due to the large amount of SFAs. The fatty acid composition and concentration in milk depend on two main factors: animal health status, including breed, age, stage of lactation, environmental factors, and feeding of animals with particular emphasis on the type of feed mixture (Falchero et al., 2010). The main targeted changes in nutrition are the reduction of saturated-unsaturated fatty acid ratio and the increase in conjugated levels of linoleic acid and omega-3 polyunsaturated fatty

acids. Animal nutrition is a major factor regulating the composition of milk fat, and food manipulation with different types of fat is considered a key strategy for achieving a desirable fatty acid profile.

In this paper, we examined the fatty acid composition of Livno cheese, which is one of the most famous cheeses from the territory of the former Yugoslavia. It is a hard, full-fat cheese, which has a

moderately salty, spicy flavor typical for sheep cheeses. Livno cheese is specific primarily due to the presence of a specific plant cover in mountain area, climatic conditions and milk of autochthonous sheep. Today, especially in periods when there is no sheep's milk, Livno cheese is made in the same way, but in different sheep's and cow's milk ratios, sometimes only from cow's milk, which is indicated on the label.

MATERIAL AND METHODS

For the research, the determining factor was the traditional production technology. Tests were carried out on pramenka sheep. The animals were labeled with the appropriate number of ear tags and samples were taken from the same animals throughout different time periods. During the sampling, sheep feeding was based on grazing. The study involved taking fresh sheep's milk during manual milking in the morning and for the production of the Livno cheese, we used sheep's milk which had previously been sampled, noting that the cow's milk was added in proportion (80:20), which is commonly used in the traditional production of this cheese. Samples were taken after 90 days of ripening in original ambient conditions. Using the method of gas chromatography (GC), the fatty acid composition in the cheese samples was determined: butyric (C4: 0), hexanoic (C6: 0), caprylic (C8: 0), decanoic (C10: 0), lauric (C12: 0), myristic (C14: 0), pentadecanoic (C15: 0), palmitic (C16: 0), margaric (C17: 0), stearic (C18:

0), arachidic (C20: 0), myristoleic (C14:1 cis-9), palmitoleic (C16:1 cis-9), oleic (C18:1 cis-9), C18:1 cis-11, elaidic (C18:1 trans-9), C18:1 trans-10, vaccenic (C18:1 trans-11), arachidonic (C20:4c5,c8,c11,c14), eicosapentaenoic (C20:5c5,c8,c11,c14,c17), docosahexaenoic (C22:6c7,c10,c13,c16,c19), linoleic (C18:2 n-6), α linolenic (C18:3 n-3), rumenic (C18:2 cis-9 trans-11 CLA).

The samples were sent in frozen state on dry ice and analyzed in "As Vitas" laboratory, Oslo Innovation Center, Norway. Cheese samples were defrosted at room temperature and homogenized prior to analysis. The preparation of the samples was carried out according to the procedure described in Luna et al. (2005), which includes the separation of milk fat by centrifugation and methylation of fatty acids, resulting in methyl esters of fatty acids (FAME), which are analyzed by chromatography. A high resolution GC method has been applied, which provides a very good

separation of FAME. The Select FAME column was 200 mm long and the isothermal separation peak 18: 1 was used. The analysis was performed on the Agilent 689N GC instrument with a split / splitless inlet, a 7683B autosampler and a flame ionization detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Separation was performed using a fused silica capillary column (Varian Inc.) CP-SELECT CB FOR FAME (200 mm long, 0.25 mm inner diameter and 0.25 μ m film thickness). The following temperature program was applied: the initial temperature of 700C was maintained for 4 minutes, then heated at 200C / minute to 1600C, maintained for 80 minutes and then heated at 30C / min to 2200C, which was maintained for 28

minute. As a carrier gas, hydrogen was used at a pressure of 314 kPa. Fatty acid analysis (C4: 0-C22: 6) was carried out by autoinjection of 1 μ l of sample in a split ratio 70: 1, a hydrogen flow of 151 ml / min and a temperature of 2800C. The flame-ionization detector temperature was 2900C at a hydrogen flow rate of 40 ml / min, air flow rate 450 ml / min air and nitrogen flow rate (as a make-up gas) of 45 ml / min. The sampling frequency on the chromatogram was 10 Hz (reading 10 times per second), and the recording time of one chromatogram was 136 minutes. The results obtained are expressed in grams of individual fatty acids per 100 g of total fatty acids (g / 100 g FA).

RESULTS

Table 1 gives an overview of the established values of fatty acids in the milk fat of Livno cheese by the sampling periods. In the SFA class, the highest values determined were for C16: 0, C18: 0 and C14: 0 acids. For C4: 0, C6: 0, C8: 0, C10: 0, C12: 0, C14: 0 and C15: 0, higher values were found in the III sampling

period than in I and II sampling (Table 1). From the MUFAs class, the highest value was established for oleic acid in the II period of sampling, while the VA value was the smallest in the III sampling period. In the PUFAs class, C18: 2 n-6 and C18: 3 n-3 dominated.

Table 1. Content of fatty acids in milk fat of Livno cheese by sampling periods

	I sampling	II sampling	III sampling
Fatty acid (g/100g FA)	SFA		
Butyric C4:0	0,96	0,85	1,0
Hexanoic C6:0	0,73	0,59	1,0
Caprylic C8:0	0,67	0,52	1,0
Decanoic C10:0	2,32	1,86	3,32
Lauric C12:0	2,02	1,78	2,80
Myristic C14:0	8,83	8,47	9,92

Pentadecanoic C15:0	1,20	1,17	1,26
Palmitic C16:0	24,97	25,02	24,43
Margaric C17:0	1,04	1,03	0,08
Stearic C18:0	12,19	11,78	11,24
Arachidic C20:0	0,51	0,53	0,43
	MUFA		
Myristoleic C14:1 cis-9	0,26	0,34	0,49
Palmitoleic C16:1 cis-9	0,93	1,18	1,13
Oleic C18:1 cis-9	21,98	23,41	23,08
C18:1 cis-11	0,93	0,97	0,69
Elaidic C18:1 trans-9	0,29	0,73	0,34
C18:1 trans-10	0,41	0,33	0,22
Vaccenic C18:1 trans-11	3,34	3,34	2,49
	PUFA		
Arachidonic C20:4 n-6	0,12	0,14	0,13
Eicosapentaenoic C20:5 n-3 (EPA)	0,11	0,11	0,08
Docosahexaenoic C22:6 n-3 (DHA)	0,07	0,06	0,08
Linoleic C18:2 n-6	2,11	2,25	2,25
α -linolenic C18:3 n-3	1,48	1,07	1,25
Rumenic C18:2 cis-9, trans-11 (CLA)	0,59	0,58	0,60
Σ n-3	1,66	1,24	1,41
Σ n-6	2,23	2,39	2,38
Σ SFA	55,44	53,6	56,48
Σ MUFA	28,14	30,30	28,44
Σ PUFA	4,48	4,21	4,39
Σ UFA	32,62	34,51	32,83
The ratio of fatty acids			
n-6/n-3	1,34	1,92	1,68
SFA/MUFA	1,97	1,76	1,98
SFA/PUFA	12,37	12,73	12,85
MUFA/PUFA	6,28	7,19	6,47
SFA/UFA	1,69	1,55	1,72

UFA/MUFA	1,15	1,13	1,15
UFA/PUFA	7,28	8,19	7,47

SFAs - saturated fatty acids; MUFAs - monounsaturated fatty acids; PUFAs - polyunsaturated fatty acids; UFAs - unsaturated fatty acids. I, II, III-represent sampling periods: July, August and September

DISCUSSION

The chemical composition of products of animal origin, especially the content of certain ingredients such as fatty acids, has attracted the attention of experts for years because of their impact on human health. The fatty acid composition of the cheese is an important marker for determining the characteristic properties of the cheese. The results of these studies show an obvious variation in the content of individual fatty acids in the analyzed Livno cheese samples by sampling periods (Tab.1). The content of SFAs in the analyzed samples of Livno cheese can be a direct consequence of the technological quality of milk, or the content of fatty acids found in milk. The dominant SFA analyzed Liva cheese samples are C14: 0, C16: 0 and C18: 0 (Table 1).

In the analyzed samples of Livno cheese, the content of C8: 0, C12: 0 and C15: 0 was the highest in the III sampling period. SFAs including C12: 0, taken above energy needs, have hyperlipidemic and hypercholesterolemic effects, but if the diet is balanced in terms of SFA and UFA, then C12: 0, as well as C16: 0 and C18: 0, can mostly be oxidized and without a hyperlipidemic effect. Organic

acids contribute to cheese flavor, which is one of the most important qualitative criteria for fresh and mature cheeses. The composition of organic acids in cheese is important for the characterization of cheese. Acids C4: 0, C6: 0 and C8: 0 are the main carriers of the cheese aroma, long-chain acids are present but do not affect smell, while medium-chain acids are responsible for the smell of sheep fats. During the ripening of the cheese there is a change and increase in the composition of organic acids, and the content of organic acids can be taken as the index of cheese ripening (Jerman, 2007) From the MUFA group, the highest concentrations were determined for C18: 1 cis-9 and VA, and the dominant content from the PUFA group was established for C18: 2 n-6 and C18: 3 n-3.

The fatty acid composition is probably a consequence of the conditions of breeding, feeding and production technology. Cheese produced from milk obtained from mountain herds can contain a higher proportion of UFAs, which affects better rheological properties and increased primary proteolysis, compared to cheeses obtained from milk from herds grazing in valley pastures (Matutinović et al.,

2007). The dominant content of C18: 1 cis-9 in the examined cheeses coincides with the literature data (Vilušić et al., 2008). Nudda & Associates (2014) in their research state that seasonal variations affect C18: 1 trans-11 content in the cheese. Seasonal changes are probably related to changes in pasture quality. Acid C18: 2 n-6 as an essential fatty acid can not be synthesized in the human organism.

However, only a small part of this acid comes from immediate food absorption, while most of it originates from the body's reserves, partly compensating for oscillations in food intake (Delaš i sar., 2005). Cheese is a significant source of C18: 2 n-6 and its isomers, which have a potential role in reducing the risk of cancer and cardiovascular disease (Vilušić et al., 2008).

The relationship between SFA, MUFA and PUFA Livno cheese is inversely proportional to the needs of a balanced diet and the impact on human health. Σ SFA in the samples of the examined cheese was higher than Σ MUFA and Σ PUFA, which seems to place this product in a bad position from a nutritionist's point of view. The acids MUFA and PUFA show biological activity (oleinic and its isomers, different linoleic acid isomers, EPA and DHA) (Marenjak et al., 2006).

PUFAs show a number of positive effects, but it is important to note that they are very prone to oxidation both in and out of the body, resulting in the formation of highly reactive free radicals and other harmful oxidation products (Kravić, 2010). An anti-carcinogenic action of Livno cheese is studied because it is a good source of potentially anti-cancerous components, conjugated linoleic acid. As a significant source of linoleic acid and its isomers, cheese has a potential role in reducing cancer risk and regulating body weight, or distributing fat deposits. Potential protection against heart disease and hypertension is essential, and an important role is attributed to maintaining good bone health due to its high content of calcium. For over half a century, the concept of healthy eating is based on avoiding the intake of fat and cholesterol, especially saturated fatty acids. In many countries, a diet with low saturated fatty acids is recommended as a part of therapy in people with elevated plasma cholesterol due to a reduction in the risk of cardiovascular disease. By increasing the proportion of polyunsaturated fatty acids in the diet it is possible to reduce blood cholesterol concentration and reduce the buildup of fatty deposits in the arteries which significantly reduces the risk of coronary heart , heart attack and stroke.

CONCLUSION

Relationships of SFA, MUFA and PUFA in Livno cheese are inversely proportional to the needs of balanced nutrition and the impact on human health. Σ SFA in the samples of the examined cheese was higher than Σ MUFA and Σ PUFA, which seems to place this product in a bad position from a nutritionist's point of view. The

quality of raw milk can be improved by a particular nutrition strategy, thereby increasing the proportion of biologically active ingredients in raw milk, and in the technological sense, such milk can be an excellent raw material for the processing and marketing of high-quality dairy products such as cheeses.

LITERATURE

1. Delaš I., Kaćunko T., Beganović J., Delaš F. (2005): Sastav masnih kiselina majčinog mlijeka i pripravaka dječje hrane. *Mljekarstvo*, 55(2): 101-112.
2. Nudda A., Battacone G., Neto B.O., Dias Francesconi A.H., Cannas A., Atzori A.S., Pulina G. (2014): Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. *R. Bras. Zootec.* vol.43 (8) 1806-9290.
3. Jerman M.B. (2007): Slobodne masne kiseline u siru. *Pregled tehničke kulture i dokumentacije. Kem. Ind.*, 56(11): 621-626.
4. Matutinović S., Rako A., Kalit S., Havranek J. (2007): Značaj tradicijskih sireva s posebnim osvrtom na Lečevački sir. *Mljekarstvo*, 57(1): 49-65.
5. Vilušić M., Milanović S., Jukić-Grbavac M. (2008): Sastav masnih kiselina i sadržaj kolesterola u svježem siru tipa Quarg. *Preh.ind.*, 19(1-2): 28-31.
6. Luna P., Juarez M., De La Fuente M.A. (2005): Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 88(10): 3377-3381.
7. Savić Đ. (2010): Etiopatogeneza zamašćene jetre visokomliječnih krava. <http://www.Veterina.info>.
8. Falchero L., Lombardi G., Gorlier A., Lonati M., Odoardi M., Cavallero A. (2010): Variation in fatty acid composition of milk and chesse from cows. *Dairy Science of Technology* 90 (6), 657-672
9. Kravić S. (2010): Određivanje trans masnih kiselina prehrambenim proizvodima gasnom hromatografijom-masenom spektrofotometrijom. Doktorska disertacija Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.

10. Marenjak T.S., Poljičak-Milas N., Delaš I. (2006): Biološki aktivne tvari u kravljem mlijeku i njihov učinak na zdravlje. *Mljekarstvo*, 56(2): 119-137

Paper received: 03.07.2018.

Paper accepted: 10.10.2018.

DOI 10.7251/VETJ1802463B

UDK 636.4.083.312:636.2

Pregledni naučni rad

PROCENA BIOSIGURNOSNIH MERA NA KOMERCIJALNIM FARMAMA SVINJA^{1*2*}

**Jovan BOJKOVSKI^{1*}, Branislav STANKOVIĆ²,
Jasna Prodanov - RADULOVIĆ³, Milan MALETIĆ¹,
Slobodanka VAKANJAC¹, Nemanja ZDRAVKOVIĆ⁴**

1 Dr Jovan Bojkovski, redovni profesor, Dr Milan Maletić docent, Dr Slobodanka Vakanjac, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

2 Dr Branislav Stanković, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Zemun, Srbija

3 Dr Jasna Prodanov- Radulović, naučni saradnik,

Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, Novi Sad, Srbija

4 Dr Nemanja Zdravković, istraživač, Naučni institut za Veterinarstvo Srbije, Beograd, Srbija

* Korespondentni autor, e-mail: Dr Jovan Bojkovski: bojkovski@vet.bg.ac.rs

Referat je namenjen uzgajivačima svinja

Kratak sadržaj: Biosigurnost, dobrobit, dobra proizvođačka praksa i analiza rizika u kritično kontrolnim tačkama su veoma značajni elementi za intenzivnu proizvodnju svinja. Planska primena biosigurnosnih mera presudna je u zaštiti zdravlja svinja i uspeha proizvodnje. Preporuka je da se utiče na svest zaposlenih o stvarnoj potrebi zaštite proizvodnje u celini. Kako bi imao stalno prisutan aktivan odnos prema postojećim pretnjama. Ključna stvar u postizanju ovih ciljeva treba da budu pripremljeni planovi biosigurnosti za svaku konkretnu situaciju odnosno konkretnu farmu svinja.

Ključne reči: svinje, komercijalna farma, procena, biosigurnost

^{1*} **Zahvalnica:** Ovaj rad je deo projekta TR 31071, kojeg finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije

^{2*} Презентован на 23. Годишњем савјетовању доктора ветеринарске медицине Републике Српске (БиХ). Теслић, 6-9- јуна 2018.

UVOD

Pri razmatranju stanja biosigurnosti na farmskom nivou, treba istovremeno imati u vidu srodne, ali u izvesnoj meri različite koncepte: planove biosigurnosti, procenu rizika na kritičnim kontrolnim tačkama i planove za urgentne situacije. Biosigurnosni planovi su ključni za prevenciju bolesti i sprečavanje neželjenih situacija i unapređenje poslovanja (Stanković i sar. 2007, 2008, 2009, Valčić, 2007, Hristov i sar, 2011).

Intenzivna proizvodnja svinja podrazumeva veliku koncentraciju životinja na relativno malom prostoru, zbog čega je potrebno primeniti određene mere u cilju očuvanja zdravlja zapata, sprečavanja unošenja i širenja bolesti u zapatu i očuvanja proizvodnje (Hristov i sar. 2008, 2009). Rad na formulisanju i primeni biosigurnosnih planova podrazumeva stalnu aktivnost na stvaranju i očuvanju zadovoljavajućeg okruženja za život životinja i njihovu proizvodnju, pre svega u pogledu sprečavanja unošenja i širenja uzročnika infektivnih bolesti, a dobija na značaju kako tržište svinjskog mesa sve više

poprima internacionalni karakter (Uhlenhoop, 2007a, b).

Mnoga rešenja koja se primenjuju na industrijskim farmama u cilju poboljšanja profitabilnosti, povećanja efikasnosti i bezbednosti proizvodnje često uzrokuju diskomfor, bol i stres odnosno distress životinja, dok sprečavaju njihova prirodna instinktivna ponašanja, što se u najvećoj meri ogleda u ekonomskim rezultatima proizvodnje. Pored toga, treba imati na umu da se u najvećem broju slučajeva radi o svinjama različitih starosnih kategorija, često različitog geografskog i zdravstvenog porekla sakupljenim na ograničenom prostoru, kao i da su ranostasne rase svinja visoko osetljive na stres, što neminovno dovodi do stvaranja uslova za nastanak infektivnih bolesti (Uzelac i Vasiljević 2011, Vidović i sar. 2011, Bojkovski i sar. 2014). Previdi, propusti i greške u održavanju potrebnog nivoa biosigurnosti obično dovode do pojave oboljenja, smanjenja obima proizvodnje, uginuća i gubitka zarade ugrožavajući na taj način opstanak čitavih zapata (Bojkovski i sar, 2005, 2015).

POJAM BIOSIGURNOSTI PODRAZUMEVA TRI GLAVNA ČINIOCA.

1. izolaciju, kojom se sprečava dodir jedinki iz kontrolisanog okruženja i okoline, a odnosi se na novonabavljene životinje, kontakte između postojećih grupa svinja-podeljenih prema uzrastu i/ili na proizvodne grupe, kao proizvodne

operacije koje se ponavljaju kod više grupa životinja, poput hranjenja, utovara i sl.;

2. kontrolu prometa, koja podrazumeva nadzor nad kretanjem vozila, ljudi i svih životinja sa farme i

prema farmi i mora biti osmišljena tako da spreči ili minimalizuje kontaminaciju zapata, hrane i opreme;

3. sanitaciju, koja se odnosi na dezinfekciju materijala i opreme koja ulazi na farmu i higijenu ljudi i opreme na farmi.

PROCENA NIVOA BIOSIGURNOSTI NA FARMI

Ne postoji jedinstven plan biosigurnosti za sve farme. Postizanje potrebnog nivoa biosigurnosti na farmi svinja podrazumeva plan koji predstavlja rezultat planiranja i pravovremeno preduzetih aktivnosti u konkretnom okruženju i epidemiološkoj situaciji.

Brojniograničavajućifaktoriotežavaju dostizanje potrebnog nivoa zaštite zdravlja zapata i uspeha proizvodnje. Veličina zapata i obim proizvodnje

razumljivo u velikoj meri ograničavaju obim i kvalitet preduzetih mera, što se može reći i za intenzitet proizvodnje. To praktično znači da ekonomska isplativost mora imati presudnu ulogu u pogledu određivanja ciljeva koje je potrebno ostvariti primenom nekog vida plana biosigurnosti, ili bar pojedinih biosigurnosnih mera, iskazanih u vidu dobre odgajivačke prakse, dobre veterinarske prakse (Radojičić i sar, 2002 Bojkovski i sar, 2009).

IZOLACIJA KAO ELEMENT BIOSIGURNOSTI NA FARMI

Lokacija farme predstavlja ključni element održivog biosigurnosnog plana. Izdvojenost objekata za odgoj u odnosu na potencijalne izvore patogenih mikroorganizama predstavlja važnu meru zaštite, naročito kada su u pitanju aerogene infekcije. Ipak, treba imati u vidu da virusi slinavke i šapa, Aujeckijeve bolesti, enzootske pneumonije, kao i reproduktivnog i respiratornog sindroma (PRRS) mogu biti preneti na velike udaljenosti. Klasična kuga svinja (KKS), afrička kuga svinja (AKS), transmisivni gastroenteritis (TGE), atrofični rinitis (AR), dizenterija, pleuropneumonija ili leptospiroza se unutar farme mogu ustanoviti do 100 m od prvobitnog žarišta (Šamanc, 2009; Lipej 2015). Ukazano je na značaj lokacije farme i

njene udaljenosti od drugih potencijalnih pretnji. Posebno je istaknut: rizik od blizine susednih farmi, gustinu naseljenosti, udaljenost saobraćajnica, blizina drugih životinjskih vrsta tip farmi koje se nalaze u blizini i druge moguće izvore zagađenja kao što su klanice, deponije, postrojenja za preradu otpadnih voda, i sl. (Uzelac i Vasiljević, 2011; Bojkovski, 2015).

Ovo znači da lokaciju određuje niz povezanih faktora, od kojih se udaljenost može najlakše izmeriti, ali ona uključuje i tip i veličinu farme, dominantne vetrove, vlažnost vazduha i dr. Gotovo redovno se zanemaruje značaj zelenog zaštitnog pojasa, koji na farmama ima samo dekorativni karakter (Uzelac i Vasiljević 2011).

Novonabavljene svinje se moraju smestiti u izolaciju u cilju potvrđivanja njihovog bezbednog zdravstvenog statusa, kao i aklimatizacije na nove smeštajne uslove, pri čemu se mora voditi računa o lokaciji odgovarajuće staje i dužini trajanja izolacije. Dužina

trajanja izolacije je obrnuto srazmerna zdravstvenom statusu domaćeg zapata, što znači da ako je on viši i kontrola mora biti strožija i traje obično četiri sedmice, ali je preporučljivije da traje šest nedelja (Bojkovski, 2015).

ZDRAVSTVENI STATUS ZAPATA

Održiva zaštita zdravstvenog stanja i uspešna proizvodnja su mogući samo ako u zapatu nema uzročnika infektivnih bolesti i činilaca koji dovode do pojave tehnopatija. Način upotrebe, čuvanja, održavanja i rukovanja terapijskim sredstvima, instrumentima, semenom, kao i upotreba sredstava za jednokratnu upotrebu svakako utiču na postizanje zadovoljavajućeg zdravstvenog stanja svih kategorija svinja.

Zdravlje nije sinonim za zdravstveni status. Termin zdravstveni status je mnogo širi i on podrazumeva i zdravlje, odnosno da li su životinje klinički zdrave ili nisu, da li je zapat čist ili slobodan od nekih zaraznih bolesti, ali i primenu niza biotehnoških mera u cilju održavanja proizvodnje. Moguće je da životinje budu sa niskim zdravstvenim statusom (prisustvo nekih latentnih infekcija) a da su klinički zdrave i produktivne. To se dešava u uslovima dobrog menadžmenta kada je i imunitet u balansu sa mogućim ozbiljnim patogenima koji mogu biti i prisutni, bez ispoljavanja bolesti, odnosno onda kada su prisutni subklinički oblici bolesti ili latentne infekcije (Plonait i Bickhardt, 1988; Taylor, 1999; Straw, 1999).

Suprotno tome, moguće je da su životinje u visokom zdravstvenom statusu ali da su uslovi menadžmenta, način držanja, nega i ishrana životinja neadekvatni i da se u takvim uslovima ispolje klinički oblici nekih bolesti (Gagrčin i sar, 2002). U takvim uslovima može da dođe i do pada proizvodnje. Bez obzira na njihovu različitu patogenost, pa prema tome i na različit procenat morbiditeta i mortaliteta mnoge od tih bolesti se mogu suprimirati ili čak eliminisati iz objekta primenom adekvatnih mera zdravstvene zaštite.

Bolest je u suštini odsustvo zdravlja, odnosno odstupanje od skladnog funkcionisanja nekih organa ili organizma koji se onda mogu preko određenih simptoma ili znakova uglavnom jasno ispoljiti, što se i naziva klinička forma bolesti. Međutim, vrlo često neke bolesti su prisutne u subkliničkom ili latentnom obliku, kada ih je jedino moguće otkriti nekim od metoda serodijagnostike, a najbolje i najsigurnije je identifikacijom uzročnika ili sagledavanjem nekih parametara koji upućuju na pad proizvodnje. Broj takvih bolesti nije zanemarljiv (pneumonija, intestinalna adenomatoza, leptospiroza,

parvoviroza, PRRS, (Ivetić i sar., 2000; Gagrčin i sar., 2002; Bojkovski i sar., 2008, 2015; Štukelj, 2017). Postoje značajne razlike između subkliničkih oblika bolesti od latentnih infekcija. Primer za ovo navođenje je PRRS koji može latentno da bude prisutan duže vreme u zapatu, što se jedino primeti po padu proizvodnje i/ili bolest leptospiroza koja može više meseci da bude endemski prisutna a da se klinički ne ispolji (Radojičić i sar., 2002; Štukelj, 2017). Prema tome, u zapatu treba da se zadovolje svi dogovoreni i propisani uslovi (ishrana, držanje i nega) kao i da se promoviše dobar zdravstveni status životinja što uglavnom podrazumeva odsustvo nekih zaraznih bolesti, a to se postiže pojačanom kontrolom zdravlja životinja. Takođe, mora se isključiti mogućnost latentne infekcije koja se iskazuje preko pada proizvodnje (povećan broj mrtvorođene prasadi, mumificirani plodovi i povećan mortalitet prasadi na sisi u prva dva dana bez vidljivih kliničkih simptoma). To je moguće sprovesti primenom mera serodijagnostike (Šamanc, 2009).

Visoki zdravstveni status podrazumeva precizno uspostavljanje posebnih kriterijuma koje jasno definiše veterinarska služba, koja se sve više bazira na preventivnoj zdravstvenoj zaštiti svinja u intenzivnom uzgoju (Avakumović, 2006, Valčić 2007).

U zemljama sa razvijenim menandžmentom i prema tome razvijenom proizvodnjom svinja, mora biti zadovoljen visoki zdravstveni status

u zapatu. To u suštini znači, »slobodu« od nekih zaraznih virusnih i/ili bakterijskih bolesti kao što je na primer klasična kuga svinja, Aujeszky bolest, leptospiroza i neke druge zarazne bolesti. U nekim zapatima svinja ne postiže se uvek visok zdravstveni status. On je u korelaciji sa visokom proizvodnjom samo onda ukoliko su uslovi menandžmenta ispunjeni u potpunosti po preporuci trenutno važećih biotehnoloških koncepata u procesu uspostavljanja i održavanja elitnih reproduktivnih i proizvodnih zapata (Tzika i sar, 2015). Međutim, moguće je da se u uslovima lošijeg menandžmenta, ali bez prisustva određenih virulentnih mikoorganizama, odnosno kada je mali procenat morbiditeta i mortaliteta naročito prasadi na sisi, održati proizvodnju po traženom konceptu. Obrnuto, ukoliko su uslovi biotehnoloških zahteva na visokom nivou, moguće je proizvodnju održavati i uz prisustvo nekih patogena, zbog skladnog odnosa (dobrog balansa) između imuniteta i virulence patogena, te da ne dođe do ispoljavanja infekcije ili nekih drugih poremećaja, a samim tim da ne bude ni znatnijeg pada proizvodnje (Radojičić i sar., 2002).

Sprovođenje »stamping out« metode kao radikalne, se može primeniti u zemljama sa visokom proizvodnjom, gde su regulisane i druge mere kao na primer nadoknade ekonomskih šteta nastalih nakon takvih mera eradikacije. (Radojičić i sar, 2002).

Naime, poznato je da se neke bolesti javljaju samo u određenom uzrastu,

odnosno pri prelasku iz jedne proizvodne kategorije u drugu. Naročito osetljivi, ili kritičan period je samo prašenje i prvih 24-48 sati nakon prašenja, prvih 7 do 10 dana posle prašenja, kao 10 do 14 dana posle odbijanja prasadi (Radojičić, 2002).

Posebno osetljiv ili kritičan period u proizvodnji svinja je samo prašenje, rani puerperijum i prva dva dana po prašenju kako za samu prasilju tako i za prasad. Krmače, prasilje, naročito prvopraskinje mogu da budu kliconoše za mnoge bolesti koje se kod njih samih i ne ispolje, ali da bolest bude preneti na prasad koja se u prvih nekoliko sati po dolasku na svet nedovoljno otporna na uslove koja ih zatiču u ranom neonatalnom periodu. Zato sama priprema krmača za prašenje i preduzimanje niza mera (praćenje samog akta prašenja, ako je potrebno izvršiti indukciju porođaja, prihvatanje i posebna briga oko svakog praseta, razmeštanje prvopraskinja tako da budu između dve multipare) mora biti izvršena blagovremeno. Razmeštanje prvopraskinja između dve multipare je potvrđeno dobar način postavljanja barijere, odnosno preveniranja kolibaciloze, koja je češća kod prasadi prvopraskinja. Prasad od višepriskinja putem kolostruma dobijaju solidnu zaštitu dok to nije slučaj sa prasadima od prvopraskinja. Ishrana krmača u prasilištu zahteva kvalitetnu ishranu i napajanje (Avakumović, 2006).

Samo zdrava krmača je sposobna da konzumira dovoljne količine hrane potrebne za visoku produkciju mleka,

od koje zavisi i broj odgojene prasadi u leglu. Međutim, i pored svih ovih mera predostrožnosti moguće je da se kod krmača ispolje neke bolesti i poremećaji koji su uglavnom vezani sa genitalni aparat i funkciju mlečne žlezde. To su pre svega hipo i agalaksije, endometritisi, mastitisi, ali neretko i sam sindrom mastitis, metritis, agalaksija (SMMAK). SMMAK sindrom se ispoljava u različitom procentu, 1-37% na različitim farmama, ali ga je moguće određenim merama (preventivnim sprečiti i terapijskim lečiti), u čemu je uloga veterinara-specijaliste prvorazredna (Šamanc i sar, 2002; Lipej, 2015). Brojna su iskustva u vezi sa navedenim poremećajem puerperijuma i uglavnom se svode na nekoliko postupaka kao što su redovno i obavezno termometriranje krmača (kritična temperatura je 39,2 °C) uskraćivanje obroka dan pred partus, davanje laksancija dva do tri dana pre i dva do tri dana posle prašenja stavljanje penušavih tableta u matericu nakon prašenja uz obaveznu kontrolu porođajnog kanala, uspešno rešavaju pojavu SMMAK i na taj način se obezbeđuje laktacija odnosno uzimanje kolostruma od svojih majki što je od posebne važnosti za vitalnost prasadi na sisi i dalji tok perioda uzgoja same prasadi, i konačno, sam uspeh u proizvodnji. Što se tiče bolesti same prasadi i razloga smrtnosti u prva dva dana po rođenju a koja su ipak vezana za stanje krmača na prvom mestu su nagnječenja, hipoglikemija, te perakutni tok kolidijareje.

Anemije prasadi se preventivnim davanjem preparata gvožđa dekstrana u prva dva do tri dana prasadima nakon rođenja, onemogućava. Poslednje preporuke su davanje preparata gvožđa majkama u graviditetu peroralnim putem (Šamanc, 2009).

Pored nagnječenja, hipoglikemije, raskrećenosti i anemije prasadi, najčešće se u prvi 7-10 dana kod prasadi na sisi javlja tzv. *neonatalni scour* (eng). koji je u suštini pojava dijareja različite etiologije (Waters i Sellwood, 1982).

Jasno izražena dijareja i posledična dehidracija, odnosno gubitak telesne mase i sporije napredovanje prasadi zahtevaju da se odmah krene sa rehidracijom, koju je moguće izvesti ili peroralnim i/ili intraperitonealnim putem, i primenu antimikrobnih sredstava, najbolje prema antibiogramu (Straw, 1999; Tzika i sar, 2015). U ovom periodu, mogu da se pojave i neke druge bolesti u različitom procentu morbiditeta i mortaliteta, koje se onda u zavisnosti od toga, mogu više ili manje uspešno medikamentozno lečiti.

U ovom osetljivom periodu, zvanom period zalučenja krmača ili odlučanja prasadi, koji je vremenski različit (u našim uslovima držanja svinja u intenzivnom uzgoju on je 28 dana po prašenju, je u suštini vrlo osetljiv period sa aspekta uticaja stresnih faktora (odvajanje od majke, nov objekat, kohabitacija sa

drugim životinjama, intenzivaran režim ishrane) tako da najčešće nastaju bolesti kao što je kanibalizam, edemska bolest, kokcidioza dizenterija, aktinobaciloza, proliferativne eneteropatije (Radojičić i sar., 2002).

U prvih 10 dana po zalučenju prasad treba sortirati po uzrastu i telesnoj masi, smestiti ih po 7-10 prasadi po boksu i uvesti sistem restriktivne hrane po kojoj prvi dan i ne dobijaju hranu već samo vodu, a ostalih nekoliko dana obrok se postepeno povećava da bi desetog dana ishrana bila po volji iz automatskih hranilica i voda iz pojilica. Takođe je važno da tih prvih deset dana po odbijanju prasad jedu hranu koja su uzimala u prasilištu kao prihranjivanje, a nakon boravka od 30 dana u odgajalištu da treba krenuti sa davanjem startera sa 20 posto svarljivih proteina. Na ovaj način se najefikasnije izbegne pojava edemske bolesti (enterotoksemija) od koje po pravilu uglavnom obole i uginu najbolja, odnosno prasad koja su sposobna da pojedju više hrane (Avakumović, 2006; Uzelac, Vasiljević, 2011).

Dizenterija ili krvavi proliv čije je uzročnik *Brachyspira hyodysenterae*, je uporno oboljenje svih kategorija svinja, koja znatno može da ugrozi proizvodnju svinja. Ipak od dizenterije, najčešće obole prasad u odgoju i tovu između 25 do 60 kg telesne mase Farme komercijalnog tipa moraju da rade na iskorenjivanju dizenterije (Šamanc, 2009).

ODNOS OSOBLJA PREMA OPREMI

Uzročnici infektivnih oboljenja se mogu prenositi i posredno putem opreme. U cilju redukcije širenja agenasa opremom preduzima se sledeće: pranje ruku pre svakog ulaska u segment farme i nakon rada sa bolesnim životinjama, nošenje zaštitnih rukavica pri pomaganju

kod prašenja, odvojena upotreba opreme za rad sa hranom i stajnjakom, upotreba igala za jednokratnu upotrebu, sterilizacija sopstvenih instrumenata za kastraciju i markiranje i pranje radne odeće deterdžentima i hipohloritima (Bojkovski i sar, 2013).

KONTROLA KRETANJA I PROMETA

Kontrola kretanja vozila, ljudi i životinja sa farme i prema njoj mora biti sastavni deo tehnologije proizvodnje i mora biti osmišljena tako da spreči ili smanji na najmanju moguću meru kontaminaciju zapata, hrane i opreme. U praksi se vrlo često zanemaruju neki važni elementi kontrole kretanja, koji se odnose na stanje ograde i dezobarijera i proceduru pri ulasku na farmu vozila i stranih lica, iako je sve to predviđeno projektom farme. Dezobarijere su redovno nenatkrivene, izložene atmosferskim i površinskim vodama, a rastvor se ne menja dovoljno često koliko to zahteva frekvencija saobraćaja (Relić i sar., 2002; Gagarčin i sar., 2002).

U cilju smanjenja mogućnosti rasejavanja kontaminanata preduzima se informisanje posetilaca i vozača o metodama zaštite i insistiranje na njihovoj saradnji u minimiziranju mogućnosti kontaminacije, sprečavanju

ulaska posetilaca u prostore za smeštaj i ishranu, postavljanje znakova "ZABRANJEN ULAZ" sa telefonskim brojem za kontakt na ulaz farme. Sprečavanje kontakta svinja i posetilaca, nezaobilazna je upotreba čiste odeće i gumenih čizama ili PVC navlaka za obuću (Hristov i sar., 2009).

Kontrola hrane i opreme za hranjenje

Pravilnim skladištenjem hrana se štiti od kontaminacije i onemogućava se razvoj mikotoksina. Hranu za različite kategorije i sisteme treba označiti i razvrstati u cilju izbegavanja grešaka. Takođe, treba pratiti kvalitet vode i obezbediti odgovarajući sistem za napajanje. Ukoliko se hrana nabavlja sa strane, najbolje je kupovati je od proizvođača sa kontrolisanim režimom proizvodnje, kvaliteta i biološke bezbednosti (Avakumović, 2006).

IZĐUBRAVANJE

Položaj deponije za stajnjak u okviru farme i ocena organizacije izđubravanja pružaju veliki broj informacija o nivou biosigurnosti na farmi i svesti zaposlenih. Za sada kod nas ne postoji striktna

zakonska obaveza o tretiranju stajnjaka, ali digestija i svaki drugi prihvatljiv vid biološke degradacije, se smatra poželjnim i podiže nivo biosigurnosti na farmi (Stanković i sar. 2007).

UKLANJANJE LEŠEVA UGINULIH ŽIVOTINJA

Veoma je važno da svi leševi uginulih životinja što pre i na odgovarajući način

uklone (Uzelac i Vasiljević, 2011).

ODNOS PREMA DRUGIM ŽIVOTINJAMA NA FARMI

Iako to nije poželjno, nekada se ne može zanemariti želja stočara da na farmi imaju pse, mačke ili konje. U tom smislu, treba im uskratiti pristup u neke

delove farme i kontakt sa svinjama, dehelmintisati ih i vakcinisati protiv besnila i bolesti uobičajenih u okruženju farme (Stanković i sar., 2008).

KONTROLA PTICA

Ptice (golubovi, vrapci, čvorci i laste) mogu biti nosioci infektivnog materijala na nogama ili u sistemu za varenje. Stoga se preporučuje zatvaranje rupa pogodnih za pravljenje gnezda; postavljanje mreža na prozore i otvore za ventilaciju, zatvaranje otvora na silosima i pokrivanje rubova ispod krovšta i streha pogodnih za gnezda i ležanje (Uzelac i Vasiljević, 2011).

Kontrola populacija glodara je obavezan deo svakog plana biosigurnosti, pa se u tom cilju preduzima sledeće: izgradnja objekata u koje glodari ne mogu da prodru, zatvaranje bezbednih mesta za skrivanje, eliminisanje mogućnosti ishrane i napajanja i uništavanje postojećih populacija trovanjem, zadimljavanjem i zamkama (Đedović isar, 2015).

SANITACIJA

Pojam sanitacije se odnosi na održavanje higijene, čišćenje i dezinfekciju materijala, ljudi i opreme koja ulazi na farmu i higijenu ljudi i opreme na farmi. Način i sredstva namenjena sanitaciji na farmama.

Povremena zamena preparata je bila opravdana dok su se u sanitaciji koristila jednostavna sredstva koji ne uništavaju celokupnu mikrobnu populaciju s pojavom posledične rezistencije preostalih vrsta, dok se savremena

pažljivo komponovana sredstva su zbog prisustva pufera i sa dužim sinergetski kombinovanih sastojaka ne rezidualnim dejstvom (Zdravković i sar. moraju dugo vremena menjati jer imaju 2013). širok germicidni spektar, postojana

ZAKLJUČAK

Potrebno je imati u vidu da: Svest zaposlenih o stvarnoj potrebi zaštite proizvodnje u celini i stalan rad na uklanjanju pretnji po biosigurnost predstavlja ključ uspeha u osmišljavanju i primeni planova biosigurnosti za svaku konkretnu situaciju i farmu svinja.

Odgajivači svinja imaju najveću odgovornost u zaštiti sopstvenih zapata

po pitanju unošenja bolesti, kontrolom kretanja, pravilnim postupkom i smeštajem grupa životinja i sanitacijom.

Posetioci moraju poštovati protokole predviđene planom biosigurnosti farme.

Zaposleni na farmi i posetioci moraju biti svesni svoje uloge u očuvanju bezbednog zdravstvenog statusa farme

LITERATURA

1. Avakumović Đ. (2006): *Primena savremenih naičnih i praktičnih dostignuća u zdravstvenoj zaštiti i reprodukciji svinja*, Beoknjiga, 6. izdanje, Beograd.
2. Bojkovski J., Savić B., Rogožarski D., Stojanović D., Vasiljević T., Apić I., Pavlović I. (2013): *An outline of clinical cases of disease in pigs at commercial farms. In: Proceedings of 23th International symposium "New Technologies in Contemporary Animal Production"*, Novi Sad (Serbia) 19-21 jun, str. 163-66.
3. Bojkovski J. (2015): *Biosecurity on pig farms*, monografija izdavač Lambert Academic Publishing, Nemačka
4. Bojkovski J., Stanković, B., Petrujkić, T., Radojičić, B. (2009): *Uzgojne bolesti, telesna kondicija i biosigurnosne mere na farmama svinja industrijskog tipa*. Veterinarski Žurnal Republike Srpske, 9(1): 43
5. Bojkovski J., Radojičić Biljana, Petrujkić B. (2005): *Savremeni aspekti u dijagnostici i terapiji uzgojnih bolesti svinja*. Proceedings of workshop: „Clinica Veterinaria“, Ohrid 3-7.09., str. 251-57.
6. Bojkovski J., Savić B., Rogožarski D. (2011): *Pregled uzročnika oboljenja svinja na farmama industrijskog tipa. U: Deveti simpozijum zdravstvene zaštite selekcija i reprodukcije svinja, Srebrno jezero, Zbornik radova*, str. 62-5

7. Bojkovski J , Vasiljević T., Stojanović D, Rogožarski D. (2014) : *Health control of pig herds on commercial farms*, Arhiv veterinarske medicine, Vol. 7, No. 1, 59-9
8. Đedović S.,Bojkovski,J.,Vukša M.,Jokić G.,Šćepović T. (2015): *Prequiste programmmes and rodent control in livestock production* Proceedings of the 4th International Congress New Perspectives and Challenges of Sustinable Livestock Production October 7-9, Belgrade str.767- 79
9. Gagrčin M., Milijana Simić, Došen R., Ivetić V. (2002): *Aktuelni zdravstveni problemi u industrijskoj proizvodnji svinja i mogućnosti njihovog rešavanja*. Veterinarski glasnik, vol.56, br 1-2, str.str. 1-11
10. Hristov S., Stanković B., Relić Renata, Todorović-Joksimović Mirjana: Dobrobit i biosigurnost na farmama. Biotechnology in animal husbandry, 24 (spec.issue), 39-49., 2008
11. Hristov, S., Stanković, B. (2009): *Najznačajniji propusti u obezbeđenju dobrobiti životinja na farmama goveda i svinja*. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik, vol. 15, br. 3-4, str. 95-102
12. Plonait, H. Bickhardt K. (1988) *Lerbuch der Swinekrankheitn*,Verlag Paul, Prey
13. Lipej Z.(2015) *Bolesti svinja*, Medicinska naklada, Zagreb
14. Radojičić Biljana Bojkovski, J., Janković,D. (2002) *Aktuelni pristup u promnociji dobrog zdravlja svinja u intenzivnom uzgoju*,Uvodni referat, Savetovanje veterinarara Srbije Srbije, Zlatibor
15. Relić, Renata, Hristov, S., Stanković, B., (2002) *Dezinfekcija objekata za svinje*. Zbornik radova XIII Savetovanja DDD u zaštiti životne sredine sa međunarodnim učešćem, Kikinda, 85-91;
16. Stanković B., Hristov S., Petrujkić T., Todorović-Joksimović Mirjana, Davidović Vesna, Bojkovski J. (2008): *Biosigurnost na farmama svinja u svakodnevnoj praksi*. Biotechnology in animal husbandry, 24, 601-08,
17. Stanković, B., Hristov, S., Joksimović, T.M., Davidović, V., Božić, A. (2007): *Biosigurnost na farmama svinja. u: Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama*, Zemun: Poljoprivredni fakultet, 299-10
18. Stanković B., Hristov S. (2009).: *Najčešći propusti u obezbeđenju biosigurnosti na farmama goveda i svinja*. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik, 15, 3-4,103- 10,
19. Straw E. Barbara *Disease of swine* (1999) Michigan, State University,USA
20. Taylor J.D. (1999): *Swine dysentery control complicated by resistance*. Pig. Progress Enteric Diseases, 24-25,.

21. Tzika E.D., Bojkovski J., P.D: Tassis Epidemijska dijareja svinja (2015): Potencijalna opasnost svijarskoj indusriji Evrope Zbornik radova trinaestog simpozijuma „Zdravstvena zaštita, selekcija i reprodukcija svinja sa medjunarodnim učešćem, Srebrno jezero-Veliko Gradište str.28-32.
22. Valčić, M. (2007): Osnovni kriterijumi i principi pripreme nacionalnij planova u kontroli, suzbijanju i iskorenjivanju zaraznih bolesti životinja. u: Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama, Zemun: Poljoprivredni fakultet, monografija, 239-50
23. Waters J.R.Sellwod,R (1982): Aspects of genetic resisstence to K88 E.coli in pigs.In Prpoceedigs of the 2nd World Congress on Genetic aplied to Livestock Production Madrid Internationasl commette for world Congress on genetics Aplied in Livestock Production (vol.4.No.8).
24. Uhlenhoop, E. (2007a) *Biosecurity planing for livestock farms*. Doborbit životinja i biosigurnost na farmama, monografija Poljoprivredni fakultet Zemnun, 227-237.
25. Uhlenhoop, E. (2007b) Torremorel,M., Pijoan, C., Janni,K., Walker, R., Joo,H.S.(1997) *Airborne transmission of A. pleuropneumoniae and PRRSV in nursery pigs*. Am. J. Vet. Res. 58, 828-32;
26. Uzelac Z., Vasiljević T. (2011): *Osnove modernog svinjarstva*. Petrovaradin,
27. Futura V., Šubara V., Višnjić V, Punoš D. (2011): *Savremeno gajenje svinja*, Novi Sad, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu., 2011.
28. Šamanc (2009) *Bolesti svinja*, Naučna, Beograd
29. Štukelj M. (2017) *Šta smo sve naučili o reproduktivnom-respiratornom sindromu svinja(PRRS) nakon 30 godina*, II medjunariodni simpozijum “Zdravstvena zaštita i reprodukckija papkara” Udruženje veterinara velike prakse, Beograd
30. Zdravković N, Bojkovski J (2013): Ispitivanje rezistencije na antibiotike na primeru meticilin rezostentnih stafilokoka (MRS) I - laktamskih antibiotika proširenog spektra(ESBL) na bakterijama familije *Enterobacteriaceae* uzorkovanih iz krmača u intenzivnom uzgoju Zdravstvena zaštita, selekcija i repordukcija svinja , Srebrno jezero, 31.maj-2 juni str.58

Rad primljen: 05.09.2018.

Rad prihvaćen: 12.10.2018.

DOI 10.7251/VETJEN1802463B

UDK 636.4.083.312:636.2

*Review scientific paper***ASSESSMENT OF BIOSECURITY MEASURES
ON COMMERCIAL PIG FARMS^{1*2*}****Jovan BOJKOVSKI^{1*}, Branislav STANKOVIĆ², Jasna PRODANOV-RADULOVIĆ³,
Milan MALETIĆ¹, Slobodanka VAKANJAC¹, Nemanja ZDRAVKOVIĆ⁴**

1 Jovan Bojkovski, PhD full professor, Milan Maletić, PhD, assistant professor, Slobodanka Vakanjac, PhD full professor, University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine,

2 Branislav Stanković, PhD, associate professor, Agricultural Faculty, University of Belgrade,

3 Jasna Prodanov-Radulović, PhD, researcher, Scientific Veterinary Institute Novi Sad, Novi Sad,

4 Nemanja Zdravković, PhD, research, Scientific veterinary institute, Serbia, Belgrade.

* Corresponding Author: Dr Jovan Bojkovski, e-mail: bojkovski@vet.bg.ac.rs

The report is intended for pig breeders

Abstract: Biosecurity, welfare, good manufacturing practice and risk analysis at critical control points are very important elements for intensive pig production. Planned application of biosecurity measures is crucial for the protection of pig health and production success. In order to have an ongoing active relationship with the existing threats it is recommended to influence the employees' awareness of the real need to protect production as a whole. The key to achieving these goals are prepared biosecurity plans for each specific situation, or a specific pig farm.

Key words: pigs, commercial farm, assessment, biosecurity

^{1*} **Acknowledgments:** This work is part of the project TR 31071, financed by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia

^{2*} Presented at the 23rd Annual Consulting of Doctors of Veterinary Medicine of Republic of Srpska (B&H).
Teslic, June 6-9, 2018

INTRODUCTION

When considering the state of the biosecurity at the farm level, at the same time, we need to bear in mind the related, but to some extent different, concepts: biosecurity plans, risk assessment at critical control points and plans for emergency situations. Biosecurity plans are key to disease prevention, the prevention of unwanted situations and the improvement of business (Stanković et al. 2007, 2008, 2009, Valčić, 2007, Hristov i sar, 2011). Intensive pig production involves a large concentration of animals in a relatively small area, which requires certain measures to be taken in order to preserve the health of herd, prevent the introduction and spread of diseases in and preserve production (Hristov et al., 2008). The work on formulating and implementing biosecurity plans implies ongoing activity on the creation and preservation of a satisfactory environment for the life of animals and their production, above all in terms of preventing the introduction and spread of infectious pathogens, and it gets more important as the pig meat

market increasingly gains international character (Uhlenhoop, 2007a, b).

Many solutions applied to industrial farms in order to improve profitability, increase efficiency and production safety often cause discomfort, pain and stress or distress of animals while preventing their natural instinctive behavior, which is largely reflected in the economic output of production. In addition, it should be kept in mind that in most cases it is about pigs of different age categories, often of different geographical and health backgrounds, collected in a limited area, and early maturing pigs highly sensitive to stress, which inevitably leads to the creation of conditions for the emergence of infectious diseases (Uzelac and Vasiljević 2011, Vidović et al. 2011, Bojkovski et al. 2014). Omissions and mistakes in maintaining the required level of biosecurity usually lead to the onset of disease, reduction in production volume, death, and loss of earnings, thus endangering the survival of the herd (Bojkovski i sar, 2005, 2015).

THE CONCEPT OF BIOSECURITY IMPLIES THREE MAIN FACTORS.

1. isolation, which prevents the contact of individuals from a controlled environment and environment, and relates to newly-acquired animals, contacts between existing groups of pigs-divided by age and / or production groups, as production operations that are repeated in several groups of animals,

such as feeding, loading and so on;

2. control of traffic, which implies the control of the movement of vehicles, people and all animals from and to a farm in order to prevent or minimize contamination of food, herd and equipment;

3. sanitation, which refers to the disinfection of materials and equipment

entering the farm and the hygiene of people and equipment on the farm.

ASSESSMENT OF BIOSECURITY LEVEL ON FARMS

There is no single biosecurity plan for all farms. Achieving the necessary level of biosecurity on pig farms is a plan that is the result of planning and timely action in a specific environment and epidemiological situation. Numerous limiting factors make it difficult to reach the required level of health protection and production success. The size of the herd and the volume of production understandably largely limits the scope and quality of the measures taken, which can also be said for the intensity of production. This practically means that economic viability must play a decisive role in determining the goals to be achieved by applying a vision of a biosecurity plan, or at least some biosecurity measures expressed in the form of good breeding practice, good veterinary practice (Radojicic i sar, 2002 Bojkovski i sar, 2009).

Isolation as an element of biosecurity on the farm

The farm's location is a key element of a sustainable biosafety plan. Isolation of growing facilities in relation to potential sources of pathogenic microorganisms is an important measure of protection, especially when it comes to aerogenic infections. However, it should be kept in mind that viruses of foot- and -mouth disease, aujeszky's disease, enzootic pneumonia, and reproductive and respiratory syndrome (PRRS) can be

transmitted over long distances. Classical swine fever (KKS), African swine fever (AKS), transmissible gastroenteritis (TGE), atrophic rhinitis (AR), dysentery, pleuropneumonia or leptospirosis can be found within the farm up to 100 m from the original disease hotspot (Šamanc, 2009, Lipej 2015) . The significance of the location of the farm and its distance from other potential threats has been highlighted. The following risks are particularly prominent: the risk of nearby neighborhood farms, the density of population, the distance of the roads, the proximity of other animal species, the type of farms that are nearby and other possible sources of pollution such as slaughterhouses, landfills, wastewater treatment plants (Uzelac and Vasiljevic, 2011; Boykovski, 2015).

This means that the location is determined by a set of related factors, the distance can be most easily measured, but it also includes the type and size of the farm, dominant winds, air humidity, etc. The significance of the green belt, which has only decorative character on the farms (Uzelac and Vasiljević 2011), is regularly neglected. New pigs must be placed in isolation because of their health status confirmation and acclimatization to new accommodation conditions, taking into account the location of the appropriate stable and the length of the isolation period. The duration of

isolation is inversely proportional to the health status of the domestic herd, which means that if it's higher then the control

has to be more stringent, it usually lasts for four weeks, but it is more advisable to take six weeks (Bojkovski, 2015).

HERD HEALTH STATUS

Sustainable health protection and successful production are only possible if there are no causative agents of infectious diseases and factors that lead to the emergence of technopathy in a herd. The manner of use, storage, maintenance and handling of therapeutic agents, instruments, seeds, and the use of disposable products certainly influence the achievement of a satisfactory health status of all categories of pigs.

Health is not synonymous with health status. The term health status is much wider and it implies health, whether the animals are clinically healthy or not, whether herd is clear or free of some contagious diseases, but also the application of a series of biotechnological measures in order to maintain production. It is possible that animals are of low health status (the presence of some latent infections) and that they are clinically healthy and productive. This occurs under conditions of good management when the immunity is in balance with possible serious pathogens that may be present without manifesting the disease, that is, when there are subclinical forms of illness or latent infection (Plonait and Bickhardt, 1988; Taylor, 1999; Straw, 1999). On the other hand, it is possible that the animals are in a high health status, but that the conditions of management, the

way of keeping, care and nutrition of animals are inadequate and that clinical manifestations of some diseases are found in such conditions (Gagrčin i sar, 2002). Such conditions may lead to a drop in production. Regardless of their different pathogenicity, and therefore a different morbidity and mortality rate, many of these diseases can be suppressed or even eliminated from the facility by applying adequate measures of health care.

The disease is essentially the absence of health, ie the deviation from the harmonious functioning of some organs or organisms that can then be clearly manifested by certain symptoms or signs, which is also termed the clinical form of the disease. However, very often, some diseases are present in subclinical or latent form, when they can be detected only by one of the serodiagnosis methods, and the best and safest way is to identify the causative agent or to observe some parameters indicating a decline in production. The number of such diseases is not negligible (pneumonia, intestinal adenomatosis, leptospirosis, parvovirus, PRRS, (Ivetić et al., 2000; Gagrčin et al., 2002; Bojkovski et al., 2008, 2015, Štukelj, 2017.) There are significant differences between subclinical form of a disease and latent infections. An example of this

is the PRRS that can be latently present for a long time in the herd and observed only after a decline in production and / or a disease of leptospirosis, which may be endemic for several months without clinical manifestation. (Radojičić i sar., 2002; Štukelj, 2017). Accordingly, all agreed and prescribed conditions (nutrition, keeping and care) must be met in a herd and good animal health status must be promoted. This generally implies the absence of some contagious diseases, which is achieved by enhanced control of animal health. Also, the possibility of latent infection that is expressed through the fall in production (increased number of stillbirths, fetal mummification and increased mortality of breastfeeding piglets in the first two days without apparent clinical symptoms) must be excluded. This can be carried out using serodiagnostic tests (Šamanc, 2009).

The high health status implies the precise establishment of specific criteria clearly defined by the veterinary service, which is increasingly based on the preventive health protection of pigs in intensive breeding (Avakumović, 2006, Valčić 2007).

In countries with developed management and therefore developed pig production, high health status must be met in the herd. This essentially means “freedom” from some infectious viral and / or bacterial diseases such as, for example, classical swine fever, Aujeszky’s disease, leptospirosis and some other contagious diseases. In

some herds of pigs, a high health status is not always achieved. It is in correlation with high production only if the conditions of management are fully met by the recommendation of current biotechnological concepts in the process of establishing and maintaining elite reproductive and productive herds (Tzika et al., 2015). However, it is possible to maintain production according to the desired concept. in conditions of poorer management, but without the presence of certain virulent microorganisms, or with a small percentage of morbidity and mortality, especially of breastfeeding piglets. Conversely, if the conditions of biotechnological requirements are at a high level, it is possible to maintain production in the presence of some pathogens, due to a harmonious relationship (good balance) between the immunity and virulence of a pathogen, with no manifestation of the infection or some other disorders, and therefore without a significant decline in production (Radojičić et al., 2002).

Implementing the “stamping out” method as radical can be applied in high production countries, where other measures have been regulated, for example, compensation for economic damage resulting from such eradication measures (Radojičić and sar, 2002). It is known that some diseases occur only at a certain age, that is, when moving from one product category to another. Particularly sensitive or critical period is the first 24-48 hours after farrowing, the first 7 to 10 days after it, and 10

to 14 days after a sow rejected piglets (Radojičić, 2002).

Farrowing, as well as early puerperium and the first two days after farrowing are particularly sensitive or critical periods in pig production, for both the pig and piglets. Sows, especially those farrowing for the first time can be germ carriers for many diseases that do not occur in themselves, but that the disease is transferred to the piglets that are insufficiently resistant to the conditions that they encounter in the early neonatal period. Therefore, the preparation of sows for a farrowing and taking a series of measures (monitoring of farrowing, inducing labor if necessary, acceptance and special care of each piglet, placing a primipara between two multipara sows) must be done in a timely manner. Placing primipara sow between two multipara sows confirmed to be a good way of setting the barrier, ie preventing colibacillosis, which is more common in piglets delivered by primipara sows. Piglets delivered by multipara sows receive solid protection through colostrum while this is not the case with piglets delivered by primipara sows. Sow feeding requires good nutrition and water supply (Avakumović, 2006).

Only healthy sows are able to consume sufficient amounts of food needed for high milk production, which depends on the number of raised piglets in the litter. However, despite all these precautionary measures, some diseases and disorders that are mainly related to the genital apparatus and the function of the

mammary gland may still occur. These are primarily sow hypo and agalactia, endometritis, mastitis, but often also mastitis-metritis-agalactia syndrom (MMA). MMA syndrome is expressed in a varying percentage, 1-37% on different farms, but it can be prevented by certain preventive measures and therapeutic treatments, where the role of a veterinarian-specialist is the most important (Šamanc i sar, 2002; Lipej, 2015). There are numerous experiences regarding the mentioned puerperium disorder and are usually reduced to several procedures such as regular and mandatory thermometry (critical temperature is 39.2 oC) deprivation of meals the day before partus, giving laxative two to three days before and two to three days after farrowing, placing foaming tablets into the uterus after with the mandatory control of the birth canal, they successfully resolve the occurrence of MMA and thus provide lactation; that is taking of colostrum from their mothers, which is of special importance for the vitality of breastfeeding pigs and the further course of the growing period, and finally, for the success of production. Regarding the disease and the causes of mortality in the first two days after birth which are linked to the condition of the sows, there are contusions, hypoglycaemia, and peracute course of coli diarrhea.

Anemia in piglets is avoided by preventive administration of iron dextran preparations in the first two to three days after the birth. The

latest recommendations is an oral administration of iron preparations to pregnant mothers (Šamanc, 2009). In addition to contusions, hypoglycaemia, and anemia of piglets, neonatal scour (eng). which is essentially the appearance of diarrhea of different etiology is most common (Waters and Sellwood, 1982). Clearly expressed diarrhea and subsequent dehydration, i.e. loss of body weight and slower growth of piglets, require immediate rehydration, either via oral and / or intraperitoneal route, and application of antimicrobial agents, using antibiogram (Straw, 1999, Tzika

and sar, 2015). During this period, some other illnesses may appear in a different percentage of morbidity and mortality, which may then be more or less successfully treated with medication.

Dysentery or bloody diarrhoea caused by *Brachyspira hyodysenteriae* is a persistent illness of all categories of pigs, which can seriously endanger the production of pigs. However, dysentery is the most common in piglets between 25 to 60 kg body weight. Commercial-type farms must work on the eradication of dysentery (Šamanc, 2009).

ATTITUDES OF STAFF TOWARDS EQUIPMENT

Causes of infectious diseases can also be transmitted indirectly through equipment. In order to reduce the spread of agents by equipment, the following must be done: washing hands before each entry into the farm and after working with diseased animals,

wearing protective gloves for assisting in farrowing, separate use of food and manure equipment, use of disposable needles, sterilization of the instruments for castration and marking and washing working clothes with detergents and hypochlorites (Bojkovski i sar, 2013).

MOVEMENT AND TRAFFIC CONTROL

Control of the movement of vehicles, people and animals from the farm and towards it must be an integral part of the production technology and must be designed in such a way as to prevent or minimize the contamination of herd, food and equipment. In practice, some important elements of movement control are often ignored, such as; the condition of the fence and disinfection barriers and the procedure for the entry of vehicles and other people on the farm, although all this is foreseen by the farm

project. Barrier washers are regularly uncovered, exposed to atmospheric and surface waters, and the solution does not change as often as required by traffic frequencies (Relić et al., 2002; Gagarcin et al., 2002). In order to reduce the possibility of contamination spreading, visitors and drivers are informed about the methods of protection and asked to cooperate in minimizing the possibility of contamination. The entry of visitors into breeding and feeding facilities is not allowed, "No entry" sign with the

telephone contact number is placed at the farm entrance. Contact between pigs and visitors should be avoided and the

use of clean clothes and rubber boots or PVC footwear for shoes is indispensable (Hristov et al., 2009).

FOOD AND FEEDING EQUIPMENT CONTROL

By proper storage, food is protected from contamination and the development of mycotoxins is prevented. Foods for different categories and systems should be labeled and sorted in order

to avoid mistakes. If food is supplied from elsewhere, it is best to buy it from producers with a controlled production, quality and biological safety regime (Avakumović, 2006).

MANURE MANAGEMENT

The location of manure within the farm and the assessment of manure management provide a great deal of information on the level of biosecurity on the farm and the awareness of employees. For now, there is no strict

legal obligation to treat manure, but digestion and any other acceptable form of biological degradation is considered desirable and raises the level of biosecurity on the farm (Stanković et al., 2007).

REMOVAL OF ANIMALS REMAINS

It is very important for all corpses of dead animals to be removed as soon as

possible (Uzelac and Vasiljevic, 2011).

RELATIONSHIP WITH OTHER ANIMALS ON THE FARM

Although it is not desirable, sometimes cattlemen have a desire to have dogs, cats or horses on the farm. In that sense, they should be denied access to some parts of the farm and contact with pigs,

pigs should be dehelminthised vaccinated against rabies and illnesses common in the farm environment (Stanković et al., 2008).

BIRD CONTROL

Birds (pigeons, sparrows, squirrels and possessions) may be carriers of infectious material on the feet or in the digestive system. Therefore, it is recommended to close holes suitable for making nests; laying grids on windows

and ventilation openings, closing the openings on the silos and covering the edges under the roof and roofs suitable for nesting and laying (Uzelac and Vasiljević, 2011).

The control of rodent populations is a compulsory part of every biosecurity plan, so the following is undertaken for this purpose: construction of facilities in which rodents can not penetrate,

closure of safe hiding places, elimination of feeding possibilities and destruction of existing populations by poisoning, smuggling and traps (Đedović isar, 2015).

SANITATION

The term sanitation refers to the maintenance of hygiene, cleaning and disinfection of materials, people and equipment that enters the farm and the hygiene of people and equipment on the farm.

The occasional replacement of the preparations was justified while simple sanitation ,which did not destroy the entire microbial population with the

appearance of consequent resistance of the remaining species ,was used. Contemporary carefully composed preparations of the synergistically combined ingredients do not have to be changed for a long time because they have a broad germicidal spectrum, they are stable due to the presence of buffers and with a longer residual effect (Zdravković et al., 2013).

CONCLUSION

The following points should be kept in mind: Employees' awareness on the real need to protect the production as a whole and the constant work on

removing the threats to biosecurity is a key to the success of designing and implementing biosecurity plans for each particular situation and the pig farm.

LITERATURA

1. Avakumović Đ. (2006): *Primena savremenih naučnih i praktičnih dostignuća u zdravstvenoj zaštiti i reprodukciji svinja*, Beoknjiga, 6. izdanje, Beograd.
2. Bojkovski J., Savić B., Rogožarski D., Stojanović D., Vasiljević T., Apić I., Pavlović I. (2013): *An outline of clinical cases of disease in pigs at commercial farms*. In: *Proceedings of 23th International symposium "New Technologies in Contemporary Animal Production"*, Novi Sad (Serbia) 19-21 jun, str. 163-66.
3. Bojkovski J. (2015): *Biosecurity on pig farms*, monografija izdavač Lambert Academic Publishing, Nemačka
4. Bojkovski J., Stanković, B., Petrujkić, T., Radojičić, B. (2009): *Uzgojne bolesti, telesna kondicija i biosigurnosne mere na farmama svinja industrijskog tipa*. Veterinarski Žurnal Republike Srpske, 9(1): 43

5. Bojkovski J., Radojičić Biljana, Petrujkić B. (2005): *Savremeni aspekti u dijagnostici i terapiji uzgojnih bolesti svinja*. Proceedings of workshop: „Clinica Veterinaria“, Ohrid 3-7.09., str. 251-57.
6. Bojkovski J., Savić B., Rogožarski D. (2011): *Pregled uzročnika oboljenja svinja na farmama industrijskog tipa*. U: Deveti simpozijum zdravstvene zaštite selekcija i reprodukcije svinja, Srebrno jezero, Zbornik radova, str. 62-5
7. Bojkovski J., Vasiljević T., Stojanović D., Rogožarski D. (2014) : *Health control of pig herds on commercial farms*, Arhiv veterinarske medicine, Vol. 7, No. 1, 59-9
8. Đedović S., Bojkovski J., Vukša M., Jokić G., Šćepović T. (2015): *Prequiste programmes and rodent control in livestock production* Proceedings of the 4th International Congress New Perspectives and Challenges of Sustainable Livestock Production October 7-9, Belgrade str.767- 79
9. Gagrčin M., Milijana Simić, Došen R., Ivetić V. (2002): *Aktuelni zdravstveni problemi u industrijskoj proizvodnji svinja i mogućnosti njihovog rešavanja*. Veterinarski glasnik, vol.56, br 1-2, str.str. 1-11
10. Hristov S., Stanković B., Relić Renata, Todorović-Joksimović Mirjana: *Dobrobit i biosigurnost na farmama*. Biotechnology in animal husbandry, 24 (spec.issue), 39-49., 2008
11. Hristov, S., Stanković, B. (2009): *Najznačajniji propusti u obezbeđenju dobrobiti životinja na farmama goveda i svinja*. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik, vol. 15, br. 3-4, str. 95-102
12. Plonait, H. Bickhardt K. (1988) *Lerbuch der Swinekrankheitn*, Verlag Paul, Prey
13. Lipej Z.(2015) *Bolesti svinja*, Medicinska naklada, Zagreb
14. Radojičić Biljana Bojkovski, J., Janković, D. (2002) *Aktuelni pristup u promociji dobrog zdravlja svinja u intenzivnom uzgoju*, Uvodni referat, Savetovanje veterinara Srbije Srbije, Zlatibor
15. Relić, Renata, Hristov, S., Stanković, B., (2002) *Dezinfekcija objekata za svinje*. Zbornik radova XIII Savetovanja DDD u zaštiti životne sredine sa međunarodnim učešćem, Kikinda, 85-91;
16. Stanković B., Hristov S., Petrujkić T., Todorović-Joksimović Mirjana, Davidović Vesna, Bojkovski J. (2008): *Biosigurnost na farmama svinja u svakodnevnoj praksi*. Biotechnology in animal husbandry, 24, 601-08,
17. Stanković, B., Hristov, S., Joksimović, T.M., Davidović, V., Božić, A. (2007): *Biosigurnost na farmama svinja. u: Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama*, Zemun: Poljoprivredni fakultet, 299-10

18. Stanković B., Hristov S. (2009).: Najčešći propusti u obezbeđenju biosigurnosti na farmama goveda i svinja. Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik, 15, 3-4,103- 10,
19. Straw E. Barbara *Disease of swine* (1999) Michigan, State University,USA
20. Taylor J.D. (1999): *Swine dysentery control complicated by resistance*. Pig. Progress Enteric Diseases, 24-25,.
21. Tzika E.D., Bojkovski J., P.D: Tassis Epidemijska dijareja svinja (2015): Potencijalna opasnost svjetskoj industriji Evrope Zbornik radova trinaestog simpozijuma „Zdravstvena zaštita, selekcija i reprodukcija svinja sa međunarodnim učešćem, Srebrno jezero-Veliko Gradište str.28-32.
22. Valčić, M. (2007): Osnovni kriterijumi i principi pripreme nacionalnij planova u kontroli, suzbijanju i iskorenjivanju zaraznih bolesti životinja. u: Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama, Zemun: Poljoprivredni fakultet, monografija, 239-50
23. Waters J.R.Sellwod,R (1982): Aspects of genetic resistance to K88 E.coli in pigs.In Proceedings of the 2nd World Congress on Genetic applied to Livestock Production Madrid International commettee for world Congress on genetics Applied in Livestock Production (vol.4.No.8).
24. Uhlenhoop, E. (2007a) *Biosecurity planing for livestock farms*. Dobrobit životinja i biosigurnost na farmama, monografija Poljoprivredni fakultet Zemnun, 227-237.
25. Uhlenhoop, E. (2007b) Torremorel,M., Pijoan, C., Janni,K., Walker, R., Joo,H.S.(1997) *Airborne transmission of A. pleuropneumoniae and PRRSV in nursery pigs*. Am. J. Vet. Res. 58, 828-32;
26. Uzelac Z., Vasiljević T. (2011): *Osnove modernog svinjarstva*. Petrovaradin,
27. Futura V., Šubara V., Višnjić V, Punoš D. (2011): *Savremeno gajenje svinja*, Novi Sad, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu., 2011.
28. Šamanc (2009) *Bolesti svinja*, Naučna, Beograd
29. Štukelj M. (2017) *Šta smo sve naučili o reproduktivnom-respiratornom sindromu svinja(PRRS) nakon 30 godina*, II međunarodni simpozijum “Zdravstvena zaštita i reprodukcija papkara” Udruženje veterinara velike prakse, Beograd
30. Zdravković N, Bojkovski J (2013): Ispitivanje rezistencije na antibiotike na primeru meticilin rezistentnih stafilokoka (MRS) I - laktamskih antibiotika

proširenog spektra(ESBL) na bakterijama familije *Enterobacteriaceae* uzorkovanih iz krmača u intenzivnom uzgoju Zdravstvena zaštita, selekcija i repordukcija svinja , Srebrno jezero, 31.maj-2 juni str.58

Paper received: 05.09.2018.

Paper accepted: 12.10.2018.

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 *on line* на интернет страници Института: www.virs-vb.com. Часопис објављује радове на српском књижевном 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 других области од значаја за основну област. У Ветеринарском журналу Републике Српске се могу наћи рубрике у форми научно-популаризујућих текстова и информативних чланака из области ветеринарске медицине у Републици Српској и региону.

Сви приспјели рукописи на адресу часописа се прослеђују на стручну рецензију. Овисно од теме рукописа главни и одговорни уредник бира најмање двочлану рецензију, а по потреби и више рецензената. Рецензија је анонимна. Уколико рецензенти процијене и предложе корекције, уредник враћа рад са наглашеним сугестијама рецензената за исправке. Коначна рецензија може бити: позитивна, негативна и условно пози-

тивна. Дефинитивну одлуку о публикацији рукописа доноси главни и одговорни уредник са редакционим одбором.

Ваше рукописе можете слати путем *on line* поште на адресу главног и одговорног уредника: drago.nedici@virs-vb.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 подесити на *2,54 mm*, а величине странице на *A4* са обостраним поравнавањем са увлачењем сваког пасуса. Текст рада не треба да буде дужи од 15 страница са прилозима.

У тексту избјегавати скраћенице и непотребне симболе. Избјегавати стране ријечи, а ако је нужно треба их превести на српски језик. Латинске називе писати у *иџалику*, а за називе лијекова користити генеричка имена. Апарати и уређаји се наводе под оригиналним трговачким именима и са именом произвођача. Бројеве треба писати са зарезом и са минимално двије децимале. Користити мјерне јединице Међународног система јединица – *SI* систем. Фотографије, графиконе и табеле треба уврстити у рад, али због квалитета штампе је повољно слати их и у посебном фолдеру уз рад. Пожељно је да илустрације имају

висок квалитет.

Уз рад треба доставити декларацију аутора која се може преузети са сајта часописа.

Структура рада

Ветеринарски журнал Републике 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 са пројекта.

Насловна страна

На насловној страни написати:

- назив чланка - треба бити кратак и информативан; Пише се искључиво великим словима. Величина слова 12 (pt). У наслову не наводити скраћенице.
- имена аутора - написати испод наслова. Обавезно нагласити пуна имена и презимена аутора. У суперскрипту нагласити бројеве који означавају у фусноти институцију у којима су аутори запослени.
- име и презиме коресподентног аутора – навести на дну странице са контактом (e-mail и/или телефон) и институцијом гдје је аутор запослен;

Кратак садржај

Кратак садржај куцати на посебној

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

Увод

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

Материјал и методе

Материјал и методе морају да јасно и концизно опишу оглед, материјал и животиње на којима су експерименти изведени, као и методе које су коришћене у огледу.

Резултати

Резултати се требају приказати у виду текста, табела, графикана 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 извршити компарацију сопствених резултата са резултатима страних и домаћих аутора који су обрађивали проблем и тематику истих или сличних тема.

Закључак

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

Литература

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

У списку литературе референце нумерисати арапским бројевима и сложити их по азбучном (ћирилица) или абecedном (латиница) реду.

Наводе се на следећи начин:

Научни чланак:

Недић Д., Тешић М., Балтић М., Плавшић Б., Тајдић Н., Мириловић М. (2011): *Management and control program for suppression and 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 рада:

Alderson GLH (1991): *A system to maximize the maintenance of genetic variability in small populations*. In: Alderson L. (Eds.) *Genetic Conservation of Domestic*

Livestock, CAB International, Wallingford, str.18-29

Монографија:

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

Рад или кратак садржај из Зборника радова:

Ћупић 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 Радичевић 18, 78000 Бања Лука

Телефон/факс: +387 229-210

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

Web: www.virs-vb.com

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

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

The text should avoid unnecessary abbreviations and symbols. Also, authors should avoid foreign words, and if necessary, they should be translated into the Serbian language. Latin names must be written in *Italic*, and the for names of the drugs must be used generic names. Appliances and devices are listed under the original trade name and the product name.

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

STRUCTURE OF THE PAPER

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

and Technology of the Republic of Srpska.

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

First page:

On the front page should be written:

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

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

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

Abstract

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

Introduction

In the introduction of the paper must be described the topic that is been devoted to investigation. Emphasize the latest facts and scientific problems with the

explanation of aim and their own testing. Introduction may not be too extensive. It is recommended that in the introduction are highlighted latest literature data. Introduction must justify the research.

Materials and Methods

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

Results

The results should be presented in the form of text, tables, graphs and illustrations. Tables should be simple and clear, with a legend in which the explanation of abbreviations and symbols are noted. Each contribution should have a title (above the table, and below the chart and figure), which should be clearly stated what contribution shows.

Discussion

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

Conclusion

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

References

Authors must use the Harvard method of citation. References must be current and topical. Because reducing the possibility of mistakes, the names of foreign authors are written in Latin and Italic. In the text,

refer to the author's name and year of publication (Nedić, 2012). If there are two authors, it should be written the surnames of both authors and the year of publication (Spells and Morgan, 1998), and in the case of more than two authors, to the name of first author must added abbreviation " et al." (Nedić et al., 2011).

The list of references should be numbered in Arabic numerals and arranged alphabetically (Cyrillic and Latin).

Use the following system for arranging the references:

Journal article:

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

Book:

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

Chapter in the book:

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

Monograph:

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

Abstracts and short summaries from the proceedings:

Ćupić V., Trailovic D., Dobrić S., Velevar (2005): The importance of rational use of drugs in veterinary medicine. Proceedings of Workshop Clinica Veterinaria Ohrid, Macedonia, 3-7. September, 207-9.

Thank you for your cooperation!

Editor- in-Chief: Prof.dr. Drago N. Nedic (E-mail: drago.nedic@virs-vb.com)

