

**СРПСКО ВЕТЕРИНАРСКО ДРУШТВО
ФАКУЛТЕТ ВЕТРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД
Департман за ветеринарску медицину**



ЗБОРНИК РАДОВА И КРАТКИХ САДРЖАЈА

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ



**Хотел "Палисад" - Златибор
13-16. септембра 2018. године**

ЗБОРНИК РАДОВА И КРАТКИХ САДРЖАЈА
29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ
Хотел "Палисад" - Златибор
13-16. септембра 2018. године

ИЗДАВАЧ
СРПСКО ВЕТЕРИНАРСКО ДРУШТВО

ГЛАВНИ И ОДГОВОРНИ УРЕДНИК
Проф. др Милорад Мириловић

ТЕХНИЧКИ УРЕДНИК
др вет. мед Катарина Вуловић

РЕЦЕНЗЕНТ
Проф. др Владимир Нешић

ШТАМПА
Научна КМД, Београд

ТИРАЖ
500 примерака

ОРГАНИЗАТОР:
СРПСКО ВЕТЕРИНАРСКО ДРУШТВО

СУОРГАНИЗАТОРИ:
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ, БЕОГРАД
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД,
ДЕПАРТАМАН ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

ПОКРОВИТЕЉ:
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ
УПРАВА ЗА ВЕТРИНУ

АДРЕСА ОРГАНИЗАТОРА:
Српско ветеринарско друштво
Булевар ослобођења бр. 18, Београд
тел/фах: 011/2685-187
www.svd.rs
svd1890@gmail.com

Председник СВД-а:
Проф. др Милорад Мириловић

ОРГАНИЗАЦИОНИ ОДБОР:

Председник: Милорад Мириловић
Потпредседници: Владимир Нешић и Миодраг Рајковић
Секретар: Десанка Тетковић
Технички секретар: Катарина Вуловић

ПРОГРАМСКИ ОДБОР:

Радмила Марковић, Данијела Кировски, Бојан Тохол, Слободанка Вакањац, Тамаш Петровић,
Саша Траиловић, Милан Малетић, Владимир Нешић.

ПОЧАСНИ ОДБОР:

Бранислав Недимовић, Владо Теодоровић, Емина Милакара, Недељко Тица, Иван Бошњак, Марко
Цинцовић, Давор Шашић, Саша Бошковић, Ненад Будимовић, Ратко Ралевић.

СЕКРЕТАРИЈАТ:

Слободан Станојевић, Мирослав Ћирковић, Иван Милош, Миодраг Бошковић, Маријана Вучинић,
Станко Бобош, Милутин Симовић, Зоран Рашић, Милан Ђорђевић, Предраг Масловарић, Зоран
Јевтић, Зоран Кнежевић, Војислав Арсенијевић, Љубинко Штерић, Драгутин Смољановић, Бојан
Блонд, Весна Ђорђевић, Добрила Јакић-Димић, Бранислава Белић, Мишо Коларевић, Милица
Лазич, Ласло Матковић, Дарко Бошњак, Петар Миловић, Миодраг Николић, Никола
Милутиновић, Владан Ђурковић, Милош Петровић, Гордана Жугић, Драго Недић, Јасна
Стевановић, Жељко Сладојевић.

САДРЖАЈ

	Страна
ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ I	5
СТАЊЕ И ПЕРСПЕКТИВЕ ВЕТЕРИНАРСКЕ СЛУЖБЕ СРБИЈЕ	
Будимир Плавшић, Емина Милакара: УЛОГА ВЕТЕРИНАРСКЕ СЛУЖБЕ У ОЧУВАЊУ ЕКОНОМСКЕ СТАБИЛНОСТИ ЗЕМЉЕ И ЗНАЧАЈ АКТИВНОГ УЧЕШЋА У РЕГИОНАЛНИМ И ГЛОБАЛНИМ ПРОГРАМИМА	7
Данијела Кировски, Будимир Плавшић: УНАПРЕЂЕЊЕ И ОБЕЗБЕЂЕЊЕ КВАЛИТЕТА У ВИСОКОМ И ЦЕЛОЖИВОТНОМ ОБРАЗОВАЊУ	9
Милан Ж. Балгић, Милка Б. Поповић, Радмила В. Марковић, Јелена С. Ћирић, Бранислав М. Балгић, Марија П. Старчевић, Јелена М. Јањић: ВОДА - ПРОШЛОСТ, САДАШЊОСТ, БУДУЋНОСТ	15
ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ II	31
АКТУЕЛНА ЕПИЗООТИОЛОШКА СИТУАЦИЈА У СРБИЈИ И РЕГИОНУ	
Будимир Плавшић, Бобан Ђурић, Саша Остојић, Јелица Узелац, Тамаш Петровић, Емина Милакара: ЕПИЗООТИОЛОШКА СИТУАЦИЈА У СРБИЈИ У 2017. И 2018. ГОДИНИ	33
Željko Cvetnić: BRUCELOZA U HRVATSKOJ S POSEBNIM OSVRTOM NA BRUCELOZU U MORSKIH SISARA	35
Драго Неђић, Јања Бојанић, Оливер Стевановић, Јелена Марић, Виолета Сантрач, Бојан Голић, Радмила Чојо, Кристина Шевић, Соња Николић, Зоран Бркић, Драган Касагић, Жељко Сладојевић: ЗООНОЗЕ У РЕПУБЛИЦИ СРПСКОЈ У 2017. ГОДИНИ У КОНЦЕПТУ „ЈЕДНО ЗДРАВЉЕ“	42
Тамаш Петровић, Миланко Шеклер, Душан Петрић, Дејан Видановић, Александар Поткоњак, Ивана Хрњаковић Цвјетковић, Госпава Лазић, Александра Игњатовић Ћупина, Диана Лупуловић, Весна Милошевић, Сава Лазић: ФЛАВИВИРУСИ НА ПОДРУЧЈУ СРБИЈЕ – ТРЕНУТНО СТАЊЕ И ИЗАЗОВИ	54
Соња Радојичић, Мирослав Валчић, Милена Живојиновић, Наташа Стевић, Милован Миловановић, Будимир Плавшић, Весна Милићевић: УЛОГА ДИЈАГНОСТИЧКИХ ЛАБОРАТОРИЈА У СУЗБИЈАЊУ ЗАРАЗНИХ БОЛЕСТИ ЖИВОТИЊА	65
Мирослав Валчић, Соња Радојичић, Зоран Дебељак, Наташа Стевић, Милован Миловановић: ЗНАЧАЈ ЕПИЗООТИОЛОШКЕ СЛУЖБЕ У СИСТЕМУ ПРИСМОТРЕ ЗАРАЗНИХ БОЛЕСТИ ЖИВОТИЊА	70
Милена Самојловић, Тамаш Петровић, Владимир Полачек, Љубица Цигурски, Диана Лупуловић, Госпава Лазић, Биљана Ђурђевић, Марко Пајић, Сава Лазић: НАЛАЗ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ КОД ВАКЦИНИСАНИХ КРАВА И ЊИХОВЕ ТЕЛАДИ	77
Николина Новаков, Драган Роган, Сава Лазић, Ненад Стојанац, Бојана Видовић, Милош Пелић, Мирослав Ћирковић: КОИ ХЕРПЕСВИРОЗА И ПРОЛЕЋНА ВИРЕМИЈА ШАРАНА – АКТУЕЛНИ ПРОБЛЕМ ШАРАНСКОГ РИБАРСТВА У СРБИЈИ	78

ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ III	83
РЕЗИСТЕНЦИЈА НА ЛЕКОВЕ, ГЛОБАЛНИ ПРОБЛЕМ У МЕДИЦИНИ	
Дејан Крњић, Гордана Жугић, Татјана Лабус: САВРЕМЕНИ АСПЕКТИ	85
МОНИТОРИНГА И КОНТРОЛЕ АНТИМИКРОБНЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ	
Alan P. Robertson: ANTHELMINTIC MODES OF ACTION AND DRUG	98
RESISTANCE	
МЕХАНИЗАМ ДЕЈСТВА И РЕЗИСТЕНЦИЈЕ АНТИХЕЛМИНТИКА	
Зоран Тодоровић: АНТИБИОТСКА РЕЗИСТЕНЦИЈА У БОЛНИЦАМА У СРБИЈИ	106
Саша М. Траиловић, Зоран Тодоровић: РЕЗИСТЕНЦИЈА НА АНТИКАНЦЕРСКЕ	110
ЛЕКОВЕ, ПОСЛЕДИЦЕ ПО ХЕМИОТЕРАПИЈУ	
ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ IV	123
НУТРИТИВНИ ИЗАЗОВИ У ОДРЖАВАЊУ ОПТИМАЛНОГ ЗДРАВЉА,	
ПОБОЉШАЊУ ПЕРФОРМАНСИ И ПОВЕЋАЊУ ПРОФИТА	
Радмила Марковић, Стамен Радловић, Милан Ж. Балтић, Цвијан Меквић,	125
Драган Шефер: НУТРИТИВНЕ СТРАТЕГИЈЕ У ПРЕВЕНЦИЈИ ТОПЛОТНОГ	
СТРЕСА У ИНТЕНЗИВНОМ СТОЧАРСТВУ	
Стамен Радловић, Радмила Марковић, Драган Шефер: ОПТИМАЛАН	134
БАЛАНС ЕЛЕКТРОЛИТА У УСЛОВИМА САВРЕМЕНЕ ЖИВИНАРСКЕ	
ПРОИЗВОДЊЕ	
Hrvoje Valpotić, Željko Mikulec, Silvijo Vince, Diana Brozić, Martina Đurić Jarić,	143
Marko Samardžija: SUBAKUTNA ACIDOZA BURAGA MLIJEČNIH KRAVA:	
UZROCI, POSLJEDICE I KONTROLA	
Shivani Katoch, Dragan Šefer: THE USE OF PROBIOTICS TO ENHANCE ANIMAL	151
PERFORMANCE	
УПОТРЕБА ПРОБИОТИКА У ПОВЕЋАЊУ ПРОДУКТИВНОСТИ У СТОЧАРСТВУ	
Талија Христовска, Марко Р. Цинцовић, Бранислава Белић, Мира Мајкић,	172
Ивана Лакић: УТИЦАЈ ДОДАВАЊА НИАЦИНА У ХРАНИ НА МЕТАБОЛИЧКО	
ЗДРАВЉЕ И ПРОДУКТИВНОСТ КРАВА У РАНОЈ ЛАКТАЦИЈИ	
ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ V	177
РЕПРОДУКЦИЈА И ЗДРАВСТВЕНА ЗАШТИТА ФАРМСКИХ ЖИВОТИЊА	
Toni Dovenski, Branko Atanasov, Igor Esmerov, Boris Stojanov, Besir Jašari, Milan	179
Maletić: ИНДУКЦИЈА И СИНХРОНИЗАЦИЈА ЕСТРУСА КРАВА - ПРАКТИЧНА	
PRIMENA U MENADŽMENTU REPRODUKCIJE NA MLEČNIM FARMAMA	
Nataša Šterbenc, Maja Zakošek Pipan, Janko Mrkun: COMPUTER ASSITED	188
SYSTEM ANALYSIS FOR OBJECTIVE ASSESMENT OF SPERMATOZOA	
QUALITY	
PROCENA KVALITETA SPERMATOZOIDA KOMPJUTERSKOM ANALIZOM	
SEMENA	
Маја Зakošek Pipan, Јанко Mrkun, Р. Zrimšek: NEW ASSAYS, BIOMARKERS	200
AND BIOTECHNOLOGICAL PROCESS FOR IMPROVED PRESERVATION AND	
PREDICTION OF LIQUID STORED BOAR SEMEN QUALITY	
NOVE METODE, BIOMARKERI I BIOTEHNOLOŠKI PROCES KOJIM SE	
ROBOVŠAVA PREZERVACIJA I PREDVIĐANJE KVALITETA SEMENA	
NERASTOVA ČUVANOG U TEČNOM MEDIJUMU	
Радиша Продановић, Иван Вујанац, Сретен Недић, Љубомир Јовановић,	215
Данијела Кировски: БИОЛОШКИ ЕФЕКТИ ТАНИНА У ОРГАНИЗМУ	
ПРЕЖИВАРА	

Jan Plut, Peter Njegovec, Urška Jamnikar Ciglenečk, Marina Štukelj: PRELIMINARNI REZULTATI AKLIMATIZACIJE NAZIMICA SA HOMOLOGNIM SOJEM VIRUSA REPRODUKTIVNOG I RESPIRATORNOG SINDROMA SVINJA	222
Дејан Бугарски, Марко Кировски, Дубравка Миланов, Владимир Полачек, Александар Миловановић, Далибор Тодоровић, Биљана Божић: ИНФЕКЦИЈЕ МАЛИХ ПРЕЖИВАРА УЗРОКОВАНЕ БАКТЕРИЈОМ	231
Марко Р. Цинцовић, Радојица Ђоковић, Бранислава Белић, Милош Петровић, Ивана Лакић: КЕТОЗА И ИНСУЛИНСКА РЕЗИСТЕНЦИЈА КОД КРАВА	238
Миодраг Радиновић, Ивана Давидов, Зорана Ковачевић, Аннамариа Галфи, Михајло Ердељан, Милица Црногорац: АЛИМЕНТАРНИ ПРОЛИВИ ТЕЛАДИ	243
Иван Галић, Недим Захировић, Ивана Лакић, Марко Р. Цинцовић, Иван Станчић, Бојан Тохол: МЕТАБОЛИЧКИ АСПЕКТИ РЕПРОДУКТИВНЕ ЕФИКАСНОСТИ ЈУНИЦА	247
Бранислава Белић, Марко Р. Цинцовић, Ивана Лакић, Сандра Николић, Славиша Ђокић: УТИЦАЈ СТАРОСТИ, ХЕМОЛИЗЕ, СТРЕСА И ЗДРАВЉА НА ВРЕДНОСТ ХЕМАТОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА КРАВА	252
РАДИОНИЦЕ	257
РАДИОНИЦА I	259
Милан Малетић, Владимир Магаш, Милоје Ђурић: ПРАКТИЧНА ПРИМЕНА УЛТРАЗВУКА У РЕПРОДУКЦИЈИ МЛЕЧНИХ КРАВА	
РАДИОНИЦА II	261
Дарко Маринковић, Милан Аничић, Владимир Нешић: ТЕХНИКА ОБДУКЦИЈЕ ЖИВОТИЊА	
РАДИОНИЦА III	263
Иван Јевтић, Вања Крстић, Маја Васиљевић, Борис Перић: ЦИСТОСКОПИЈА КОД ПАСА	
РАДИОНИЦА IV	265
Неђељко Карабасил, Тамара Бошковић, Драган Василев, Мирјана Димитријевић: БЕЗБЕДНОСТ И КВАЛИТЕТ ТРАДИЦИОНАЛНИХ ПРОИЗВОДА ОД МЕСА	
РАДИОНИЦА V	267
Душан Мишић, Mainguet Jean-Michel, Татјана Лабус: ОТПОРНОСТ НА АНТИБИОТИКЕ ОПШТИ АСПЕКТИ, ПРАЋЕЊЕ И ОДГОВОРНОСТ ВЕТЕРИНАРА	
ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ VI	269
ЗДРАВСТВЕНА ЗАШТИТА КУЋНИХ ЉУБИМАЦА	
Никола Поповић: КОРТИКОСТЕРОИДИ У ДЕРМАТОЛОГИЈИ – КАДА, КАКО И КОЈИ	271
Mario Kreszinger, Bojan Toholj, Ozren Smolec: ZGLOBNI LOM	274
Marko Stejskal: BRANICEFALIČNI SINDROM	279
Marko Pećin, Mario Kreszinger, Marko Stejskal, Bojan Toholj, Ozren Smolec: LEŠENJE OTVORENIH PRELOMA U PASA I MAČAKA	281
Владимир Димитријевић, Ружица Траиловић, Мила Савић, Елмин Тарић, Жолт Бечкеи: ПРИМЕНА МОЛЕКУЛАРНО ГЕНЕТИЧКИХ МАРКЕРА У ИДЕНТИФИКАЦИЈИ ПАСА И КОНТРОЛИ СПОРНИХ РОДБИНСКИХ ОДНОСА КОД ПАСА	288
Дарко Дробњак, Миливоје Урошевић: ОСНОВНИ МОРФОМЕТРИЈСКИ ПАРАМЕТРИ ГЛАВЕ ТОРЊАКА	296

Биљана Ђурђевић, Радомир Ратајац, Бранкица Карталовић, Милена Самојловић, Марко Пајић, Милош Пелић, Слободан Кнежевић, Владимир Полачек : ТРОВАЊА ПАСА КАРБОФУРАНОМ – ПРИКАЗ СЛУЧАЈА	301
ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ VII СЛОБОДНЕ ТЕМЕ И ПРИЛОЗИ ИЗ ПРАКСЕ	303
Јелена Алексић, Милан Милијашевић, Александра Алексић Агелидис, Јелена Бабић, Славољуб Јовић, Радослава Савић Радовановић: ЕЛЕКТРОРИБОЛОВ – ВЕТЕРИНАРСКО-МЕДИЦИНСКИ, КРИВИЧНО-ПРАВНИ И ЕКОЛОШКИ АСПЕКТИ	305
Снежана Милосављевић, Иван Милош: УПОТРЕБА ЛЕКОВА У ПЧЕЛАРСТВУ СРБИЈЕ	314
Ивана Давидов, Миодраг Радиновић, Иван Галић, Михајло Ердељан, Зорана Ковачевић, Аннамариа Галфи: ОПСЕРВАЦИЈА ЛЕЗИЈА НА ПАПИЛАМА КРАВА	317
Мира Мајкић, Миодраг Радиновић, Марко Цинцовић, Бранислава Белић, Ивана Лакић, Нада Плавша: ЕМИСИЈА ШТЕТНИХ ГАСОВА НА ФАРМАМА ГОВЕДА	321
Весна Калаба, Бојан Голић, Тања Илић: МИКРОБИОЛОШКА ИСПРАВНОСТ ВОДЕ У ПРИМАРНОЈ ПРОИЗВОДЊИ	326
Драган Живанов, Михајло Вићентијевић, Славољуб Јовић, Драган Базић: БЕСПИЛОТНЕ ЛЕТЕЛИЦЕ (ДРОНОВИ) У ЗАШТИТИ И СПАСАВАЊУ ЖИВОТИЊА У ВАНРЕДНИМ СИТУАЦИЈАМА	327
Марко Пајић, Слободан Кнежевић, Далибор Тодоровић, Биљана Ђурђевић, Милена Самојловић, Милош Пелић, Владимир Полачек: ПРЕВАЛЕНЦИЈА САЛМОНЕЛА КАТЕГОРИЈЕ 1 НА ФАРМАМА КОКА НОСИЈА У ЈУЖНОБАЧКОМ И СРЕМСКОМ ОКРУГУ	332
Слободан Кнежевић, Марко Пајић, Сузана Видаковић, Јелена Бабић, Милена Самојловић, Биљана Ђурђевић, Милош Пелић, Владимир Полачек: ЗНАЧАЈ И КОНТРОЛА ЦРВЕНЕ КОКОШИЈЕ ГРИЊЕ (<i>Dermanyssus gallinae</i>)	333
Михајло Ердељан, Ивана Давидов, Миодраг Радиновић, Зорана Ковачевић, Бојана Видовић: НАЈЗНАЧАЈНИЈЕ РЕСПИРАТОРНЕ БОЛЕСТИ КОД КОПИТАРА ИЗАЗВАНЕ ВИРУСИМА	334
Ивана Лакић, Марко Р. Цинцовић, Бранислава Белић, Мира Мајкић, Данијел Ковачевић, Вања Ковачевић: ПАТОФИЗИОЛОШКИ ЗНАЧАЈ ЕНДОТОКСИНА У КРВИ ЖИВОТИЊА	341
ИНДЕКС АУТОРА	347

ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ I

**СТАЊЕ И ПЕРСПЕКТИВЕ
ВЕТЕРИНАРСКЕ СЛУЖБЕ
СРБИЈЕ**

**УЛОГА ВЕТЕРИНАРСКЕ СЛУЖБЕ У ОЧУВАЊУ ЕКОНОМСКЕ СТАБИЛНОСТИ
ЗЕМЉЕ И ЗНАЧАЈ АКТИВНОГ УЧЕШЋА У РЕГИОНАЛНИМ И ГЛОБАЛНИМ
ПРОГРАМИМА**

***ROLE OF VETERINARY SERVICES IN CONSERVATION OF ECONOMIC
STABILITY OF EARTH AND IMPORTANCE OF ACTIVE PARTICIPATION
IN REGIONAL AND GLOBAL PROGRAMS***

Будимир Плавишић, Емина Милакара¹

Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде, Управа за ветерину, Србија,

Кратак садржај

Ветеринарске службе су већ дуже време орјентисане ка очувању здравља животиња, људи и животне средине, као и подршци производње и промета безбедне хране, према принципима свеобухватног производног циклуса „од њиве до трпезе“. То укључује контролу ризика, праћење промена у производном циклусу, енормног повећања знања, као и промена у понашању потрошача, односно растућој промени орјентисаности производње ка укрушњавању, глобализацији и примени нових технологија.

Промене у производном циклусу, праћене су и променама у начину спровођења службених контрола, померајући се са циљаних провера ка контроли целокупног производног процеса и примени највиших стандарда, као и преузимању одговорности за безбедност хране, као и сам квалитет, од стране самих произвођача. То је довело и до успостављања другачијих међусобних односа између произвођача примарних производа, прерађивачке индустрије и администрације, односно ветеринарских служби. Сада је тежиште ветеринарске надлежности пренето на целокупан производни ланац, и укључује, поред узгајивача, и пољопривредно-прехрамбену индустрију. Координација, поред сталног јачања свесности ових индустрија и преношењу знања пружањем обука, од виталног је значаја за контролу многих ризика, почев од уношења инфективних агенаса у земљу, одређено подручје у земљи, односно појединачни објекат, па до спровођења специфичних мера контроле зараза или болести које се преносе путем хране. Ветеринарски сектор, уз адекватно управљање овим процесима, ресурсима и ризицима, преузима значајну улогу у очувању јавног здравља и сигурности једне земље, обезбеђујући и улогу од посебног значаја – улогу службе од јавног значаја како на националном и регионалном, тако и на глобалном нивоу.

Имајући у виду ове факторе, као и тенденције у развоју ветеринарских служби које одређује Светска организација за здравље животиња (ОИЕ) уз активно учешће 181 земље чланице, национална ветеринарска служба Србије, укључена је у рад већег броја јавних послова, професионалних иницијатива, научних окупљања, оперативних и радних тела, које омогућавају не само проактивност у приступу, већ и адекватну дистрибуцију информација и стандарда, односно преношење најновијих научних и стручних примењених знања у заштити домаће популације животиња од заразних болести, односно заштите домаће индустрије хране од штетних ефеката,

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

као и самих грађана од зооноза и патогених микроорганизама који могу представљати биолошко оружје.

Кључне речи: ОИЕ, квалитет ветеринарских служби, одржив развој.

УНАПРЕЂЕЊЕ И ОБЕЗБЕЂЕЊЕ КВАЛИТЕТА У ВИСОКОМ
И ЦЕЛОЖИВОТНОМ ОБРАЗОВАЊУ

QUALITY ASSURANCE IN HIGHER AND LIFE LONG LEARNING EDUCATION

Данијела Кировски¹, Будимир Плавшић²

¹Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

²Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде, Управа за ветерину

Кратак садржај

Унапређење и обезбеђење квалитета је најпре уведено у различите области индустрије, а затим и у јавни сектор, укључујући и високо образовање. У основи, обезбеђење квалитета подразумева формирање квалитетног производа за потрошача, што се на ниво образовања може свести на извођење квалитетног дипломца спремног за потребе тржишта. Пошто је област пословања лидер по питању обезбеђења квалитета, образовне установе могу искористити искуства која су стекли послодавци у индустрији. Квалитет у високом образовању, одређен чланом 11 Светске декларације о високом образовању, објављене од стране Уједињених нација, представља мултидимензионални концепт који треба да обухвати све активности и учеснике у високом образовању, а које подразумевају квалитет академских програма, истраживања и стипендије, особља високошколске установе, студената, наставника, инфраструктуре, опреме, као и академског окружења. Обезбеђење квалитета је услов за акредитацију и није исто што и акредитација. Наиме, акредитација је везана за одређен термин када се спроводи а контрола квалитета обезбеђује гаранцију да ће се стандарди коришћени при акредитацији спроводити дужи временски период након саме акредитације.

Кључне речи: образовање, квалитет, акредитација

УВОД

Унапређење и обезбеђење квалитета је најпре уведено у различите области индустрије, а затим и у јавни сектор, укључујући и високо образовање (1). У основи, обезбеђење квалитета подразумева формирање квалитетног производа за потрошача, што се на ниво образовања може свести на извођење квалитетног дипломца спремног за потребе тржишта. Пошто је област пословања лидер по питању обезбеђења квалитета, образовне установе могу искористити искуства која су стекли послодавци у индустрији. При томе је од изузетног значаја да се стандарди за обезбеђење квалитета који се примењују у индустрији прилагоде специфичностима процеса образовања.

С обзиром на чињеницу да је Међународна организација за стандардизацију (*ISO-International Organisation for Standardisation*) успоставила ISO 9001 као генерички стандард управљања системима, он се може применити на било коју активност и на било коју организацију, малу или велику, без обзира на производ или услугу, у било ком сектору и без обзира да ли је организација приватна или државна. ISO 9001 садржи сет генеричких захтева за импементаацију система управљања квалитетом и као такав се може применити у образовним установама у сврху успостављања квалитета у управљању (2).

У циљу потпуног разумевања појма унапређења и обезбеђења квалитета који се примењује у систему високог образовања, односно специфичности који су везани за њега, потребно је разумети значење и разлике између најчешће коришћених термина у овој области

деловања. Тако, **квалитет** у процесу образовања значи да текући образовни процес осигурава спровођење договорених стандарда, који су гаранција да ће образовна институција у којој је квалитет обезбеђен имати сав потребан потенцијал да досегне висок квалитет образовних садржаја и резултата. **Обезбеђење квалитета** значи да институција може да гарантује са потпуном поузданошћу и сигурношћу да се стандарди и квалитет у образовању могу одржавати и побољшавати. **Контрола квалитета** се односи на верификацију процедура (формалних и неформалних) које институција користи у циљу праћења квалитета и стандарда до задовољавајућег и предвиђеног нивоа. **Унапређење квалитета** је успостављање активности које воде ка позитивним промена да би се обезбедило континуирано побољшање квалитета свих поступака који се спроводе унутар институције. **Процена квалитета** је процес екстерне евалуације које спроводи екстерно тело које процењује квалитет едукативних програма у институцији, а посебно кроз искуства студената, као корисника тих програма. **Аудити квалитета** су процедуре у којима се испитују институционалне процедуре за обезбеђење квалитета и стандарда, односно испитује се да ли су процедуре имплементиране ефектно и да ли су досегле задате циљеве. Континуирани аудит има за циљ да утврди степен до кога институције спроводе процедуре за успостављање стандарда а који су гарантовани кроз назив институције и који обезбеђују студентима постизање задатих исхода. **Стандарди** описују нивое достигнућа у одређеним сегментима рада институције, а које су јасно мерљиви. Испуњавање стандарда обично подразумева мерење оспособљености за одређену активност. **Култура квалитета** је обезбеђење високог нивоа интерног институционалног квалитета, који је успостављен поузданим механизмима процене квалитета. Култура квалитета се може посматрати и као способност институције да развије применљивост обезбеђења квалитета у свакодневном раду институције и тиме оствари помак од периодичне процене ка интегрисаном обезбеђу квалитета. **Акредитација** је резултат рецензије образовног програма или институције која је праћена одређеним, претходно прихваћеним, стандардима квалитета. Тиме се гарантује да програм или институција испуњава одређене стандарде. Према томе, обезбеђење квалитета је услов за акредитацију и није исто што и акредитација јер је акредитација везана за одређен временски оквир када се спроводи а контрола квалитета би требала да обезбеди гаранцију да ће се стандарди коришћени при акредитацији спроводити дужи временски период, односно и након саме акредитације.

ЗНАЧАЈ ИМПЛЕМЕНТАЦИЈЕ ISO 9001 У СИСТЕМ ВИСОКОШКОЛСКОГ И ЦЕЛОЖИВОТНОГ ОБРАЗОВАЊА

ISO 9001 утврђује основне захтеве за систем управљања квалитетом, које организација мора да испуни како би показала своју способност да своје производе (који укључују и услуге) доследно производи, чиме повећавају задовољство корисника и испуњавају важећу законску регулативу. Овај стандард је нашао изузетну примену у раду великог броја производних организација али и институција које се баве пружањем услуга на захтев корисника. Образовање у целини, а посебно целоживотно образовање, поред тога што омогућава учење у циљу преноса знања, води рачуна, поготово последњих година, и о учењу које је усклађено са екстерним захтевима која могу да потичу од државних институција, студената и запослених. С обзиром да је рад у складу са захтевима корисника основа рада производних организација и институција које прижају услуге, пошло се од претпоставке да би имплементација ISO 9001, које ове институције већ примењују за подизање квалитета услуге, био логичан корак у постизању високог нивоа квалитета и у раду образовне институције. Међутим, у почетку је постојао велики отпор ка овој имплементацији, а вероватни разлог је био тај што имплементација стандарда која не узима у обзир специфичности образовног система може пре да угрози него да побољша рад институције. Тога су били свесни и експерти одговорни за примену ISO 9001, због чега је формирана посебна група која је усавршавала стандарде, али управо у складу са специфичностима образовања.

Као резултат оваквих промена у оквиру постојећих стандарда, све већи број образовних институција је имплементирало ISO 9001 у свој рад (3). Препознајући значај адаптације стандарда потребама образовног система објављен је ISO 9001 приручник за образовне институције, као и препоруке радних група (као што је IWA 2- *International Workgroup Agreements*) које омогућавају лакшу имплементацију ових стандарда (4, 5).

Високошколске образовне институције се баве високим образовањем али и целоживотним учењем који, као програми односно услуге које се дају корисницима, морају такође да задовоље стандарде који гарантују квалитет (6).

КВАЛИТЕТ У ВИСОКОМ И ЦЕЛОЖИВОТНОМ ОБРАЗОВАЊУ

Квалитет у високом образовању, одређен чланом 11 Светске декларације о високом образовању, објављене од стране Уједињених нација, представља мултидимензионални концепт који треба да обухвати све активности и учеснике у високом образовању, а које подразумевају квалитет академских програма, истраживања и стипендије, особља високошколске установе, студената, наставника, инфраструктуре, опреме, као и академског окружења.

Да би се обезбедио квалитет у високом образовању треба комбиновати два приступа а то су унутрашње и спољашње осигурање квалитета (7).

Унутрашње осигурање квалитета високошколске институције се односи на основна начела и идеје, а то је безгранична потрага за истином и знањем. Она је усмерена на познавање успостављања процеса и учења студента. Иако данас квалитет у високом образовању обухвата много више од наведеног, одржавање унутрашњег квалитета је основа академског образовања. У том смислу академска заједница мора бити чувар унутрашњег квалитета. Унутрашње осигурање квалитета подразумева постојање **политике рада и процедура за осигурање квалитета, као и стандарда за програме** које нуди и дипломе које издаје. Да би се ово остварило у свом раду високошколске институције треба да посвете посебну пажњу развоју културе препознавања важности квалитета и осигурања квалитета. Институције треба да развију стратегију за стално унапређење квалитета. Стратегија, политика рада и процедуре треба да имају формални статус и треба да су јавно доступне, уз значајно учешће улоге студената. Унутрашње обезбеђење квалитета се остварује и усвајањем, праћењем и периодичном **евалуацијом програма и диплома**. **Оцењивање студената** је посебно значајно и треба га спроводити по објављеним критеријумима, прописима и процедурама. **Осигурање квалитета наставног особља** је могуће једино уколико институција поседује методе, доступне онима који врше спољашњу евалуацију, којима се утврђује да је наставно особље квалификовано и компетентно за извођење наставе. **Ресурси за учење и подршка за студенте** треба да су адекватни уз стално прикупљање, анализу и коришћење релевантних информација кроз савремене **информационе системе**. **Информације за јавност** су од кључног значаја због чега високошколске институције треба стално да објављују ажуриране, непристрасне и објективне информације, како квалитативне тако и квантитативне, о програмима које изводе и дипломама које додељују.

Спољашње осигурање квалитета се односи на капацитете високошколске установе да одговори на промене захтеве друштва са којим је у сталној интеракцији. Ова контрола обухвата нове захтеве друштва у односу на високо образовање. Ови захтеви се мењају у складу са променама у друштву које се дешава током времена. Узимајући у обзир да су економски и државни захтеви основни стубови промена у друштву, може се дискутовати о томе који од ових захтева ће заузети приоритет у спољашњој контроли. Такође се мора имати на уму аутономија високошколских установа као основа одржавања њеног квалитета. Спољашње осигурање квалитета подразумева пре свега **проверу примене процедура за унутрашње осигурање квалитета**. Сврхе и циљеве процеса обезбеђења квалитета треба да одреде сви они који су за њих одговорни, кроз **развој процеса спољашњег обезбеђења квалитета**, и треба да се објаве заједно са описом процедура које ће се користити. Такође, свака формална одлука донесена као резултат спољашњег обезбеђења квалитета треба да се темељи на експлицитним, претходно објављеним **критеријумима**, који се доследно примењују. Сви процеси у спољашњој контроли квалитета треба да су осмишљени тако да су **примерени за остваривање сврхе** и циљева који се за њих одреде. **Извештаји** треба да су јавно доступни. Такође је неопходно јасно дефинисати **процедуре за даљи рад** уколико процеси садрже препоруке за деловање или акциони план. Периодична вредновања су неопходна и морају бити јасно дефинисана и унапред објављена. **Анализа целог система** се остварује кроз израду сажетих извештаја, који описују и анализирају генералне закључке прегледа, евалуација, односно провера.

У оквиру Европских стандарда прописани су јасни стандарди и за **агенције које врше спољашње осигурање квалитета у високом образовању**. То су пре свега коришћење јасних **процедура** за спољашње осигурање квалитета у високом образовању. Све агенције морају имати **службени статус**, односно поштовати све захтеве правних система унутар којих делују. Агенције треба редовно да спроводе **активности**, на нивоу установа и програма, спољашњег осигурања квалитета и да поседују примерене и пропорционалне **ресурсе**, како људске тако и финансијске. Агенције морају имати јасну сврху и циљеве свог рада у виду **изјава о мисији** која је јавно доступна. Морају бити **независне** у смислу да самостално носе одговорност за свој рад и да закључци и препоруке не подлежу утицају треће стране, у смислу високошколских установа, министарства или других интересних група. **Критеријуми** које агенције користе морају бити унапред дефинисане и доступне јавности. То подразумева самоевалуацију, спољашњу оцену групе стручњака уз укључивање студената, обилазак терена, објављивање извештаја и даље процедуре за преглед активности. Агенције треба да имају успостављене **процедуре за утврђивање властите одговорности**.

Транспарентност у раду високошколске установе је гарант квалитета али исто тако значајан фактор који омогућава мобилност студената између појединих институција.

Последњих година се све више поклања пажња успостављању, одржавању и унапређењу квалитета у целоживотном образовању, као делу успостављања квалитета унутар високошколског образовања (8). Наиме, успостављање темина универзитетско целоживотно учење (ULLL-*University life long learning*) управо указује да се у овом делу образовања на најбољи начин сусрећу наука и пракса кроз пружање целоживотног образовања од стране високошколских установа које већ имају успостављене стандарде обезбеђења квалитета. Обезбеђење квалитета у поступку имплементације целоживотног учења у високошколске установе је тренутно главни фокус Европске асоцијације за обезбеђење квалитета у високом образовању (ENQA – *European Association for Quality Ensurance in Higher Education*).

ЕВРОПСКЕ ИНСТИТУЦИЈЕ ОДГОВОРНЕ ЗА ОБЕЗБЕЂЕЊЕ КВАЛИТЕТА У ВИСОКОМ И ЦЕЛОЖИВОТНОМ ОБРАЗОВАЊУ

Европска асоцијација за обезбеђење квалитета у високом образовању (ENQA-*European Association for Quality Ensurance in Higher Education*) основана је 2000. године са циљем унапређења европске сарадње у подручју обезбеђења квалитета. Мисија је да представља своје чланове на европском нивоу посебно у политичким одлучивањима, да даје идејне основе за даљи развој процеса обезбеђења квалитета и да служи као платформа за комуникацију у стручним расправама. ENQA је асоцијација која окупља чланице, институције за обезбеђење квалитета у високом образовању из земаља чланица Европског простора високог образовања (EHEA-*The European Higher Education Area*). У тесној је сарадњи са осталим европским институцијама везаним за обезбеђење квалитета.

Асоцијација европских универзитета (EUA-*European University Asscoiation*) представља и пружа подршку високошколским институцијама кроз праћење најновијих трендова у високом образовању и у политикама истраживачког рада.

Европска студентска унија (ESU-*European Students' Union*) је кровна организација која окупља националне студентске уније. Она представља и промовише образовне, социјалне, економске и културне интересе студената у Европи према свим релевантним европским институцијама. Такође, информише представнике студената о развоју политике у високом образовању на европском нивоу.

Европско удружење институција високог образовања (EURASHE-*European Association of Institutions in Higher Education*) је међународно удружење европских високошколских установа посвећено стручном високом образовању и истраживању у оквиру првог и другог степена студија. Мисија ове организације је да заговара интересе стручног високог образовања у европским земљама. Дакле, ово удружење штити интересе високошколских установа оријентисаних на стручно образовање, те континуирано унапређује важност квалитета стручног високог образовања у Европи.

Европски регистар за осигурање квалитета (EQAR-*The European Quality Assurance Register for Higher Education*) су основале европске агенције за осигурање квалитета (ENQUA, ESU, EUA и EURASHE), студенти и универзитети у циљу повећања транспарентности осигурања квалитета у високом образовању Европе. Ова организација води и објављује регистар агенција за осигурање квалитета које у свом раду поштују европске стандарде и смернице за осигурање квалитета а све у циљу пружања поузданих информација јавности о агенцијама за осигурање квалитета које делују у Европи. Приступ регистру, који се налази на интернет страници, је бесплатан.

Међународна мрежа агенција за осигурање квалитета у високом образовању (INQAANE-*International Network for Quality Assurance Agencies in Higher Education*) је непрофитна организација основана 1991. године. Окупља приближно 200 организација које се баве теоријом и праксом осигурања квалитета у високом образовању. Ова организација доставља информације и резултате истраживања својим члановима кроз семинаре, радионице, конференције и публикације.

Европски конзорцијум за акредитацију у високом образовању (ECA-*European consortium for Accreditation*) је основан 2003. године са циљем узајамног признавања одлука о акредитацији, што је неопходно да би се спречила потреба за вишеструком акредитацијом.

Европски форум за осигурање квалитета (EQAF-*The European Quality Assurance Forum*) основан је да би се успоставила конструктивна дискусија, размена искустава и добре праксе у осигурању квалитета високог образовања. Форум који се одржава сваке године окупља високошколске установе, агенције за осигурање квалитета и студенте и на њему се могу добити различите нове информације, упознати различити приступи и праксе у националним системима високог образовања и проценити предности које би донеле промене, измене и унапређења у односу на задржавање тренутног стања.

Мрежа агенција за осигурање квалитета у високом образовању централне и источне Европе (CEENQA-*Central and Eastern Network of Quality Assurance Agencies in Higher Education*) основана је 2001. године и бави се претежно усаглашавањем активности у осигурању квалитета како би агенције за осигурање квалитета могле учествовати у европској мрежи високог образовања у којој би треба да имају и проактивну улогу. Такође помаже агенцијама у апликацијама за европске фондове.

Нордијска мрежа агенција за осигурање квалитета у високом образовању (NOQA-*Nordic Quality Assurance*) је основало пет нордијских земаља и представља мрежу за дисеминацију информација, размену искустава и спровођење протокола од узајамне користи.

НАЦИОНАЛНЕ ИНСТИТУЦИЈЕ ОДГОВОРНЕ ЗА ОБЕЗБЕЂЕЊЕ КВАЛИТЕТА У ВИСОКОМ И ЦЕЛОЖИВОТНОМ ОБРАЗОВАЊУ

Национално тело за акредитацију и проверу квалитета у високом образовању (НАТ) је основано ове године и преузело је права, обавезе, предмете, опрему, средства и архивску грађу Комисије за акредитацију и проверу квалитета (КАПК). Обавља послове акредитације, провере квалитета високошколских установа и вредновање квалитета студијских програма. Поред тога, ово тело предлаже стандарде и поступке за акредитацију високошколске установе и студијских програма.

Унутар Универзитета у Београду формиран је **Центар за обезбеђење квалитета** као организациона јединица основана ради обезбеђивања система осигурања квалитета на Универзитету и факултетима у његовом саставу. Велики број Факултета је основао сопствене Центре за обезбеђење и унапређење квалитета са циљем обезбеђивања рада по највишим националним и међународним стандардима. Један од факултета који су међу првима утврдили овакав центар је Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду а са циљем да се студентима обезбеди настава по највишим стандардима, као и да се успостави руковођење квалитетом унутар саме институције.

Закључак

Неопходно је да се високошколске установе и институције које пружају целоживотно образовање придржавају стандарда који обезбеђују висок квалитет како у наставном процесу тако и у руковођењу квалитетом. Стога је потребно да институције којима се баве овом делатношћу израде правилнике о осигурању квалитета и стратегију како ће се тај квалитет остварити али и одржати. Једино на тај начин подићи ће се квалитет образовања на националном нивоу и обезбедити стручњаци спремни за све изазове који их очекују у пословању.

Литература

1. Ryan P, 2015, Quality Assurance in Higher Education: A Review of Literature, Higher Learning Research Communications, 5, 4, 1-12; 2. ISO, 2015, Quality management systems – Requirements, Fifth Edition; 3. Kasperavičiūtė R, 2012, Giraudo A, Calzolari A, Rampone H, 2007, Approach of Higher Education Institutions to ISO 9001 standard: Motives, Issues and Benefits of Implementation, Public policy and administration 11,4,672-89; 4. El Abbadi E, Aboubakr B, Lamrini M, 2017, ISO 9001 and the Field of Higher Education: Proposal for an Update of the IWA 2 Guidelines Laila, Quality Approaches in Higher Education 4, 2, 14-9; 5. ISO, 2009, Handbook for educational organizations — What to do: Advice from IWA 2 working group (2nd ed.); 6. Kirovski D, Plavšić B, 2017, Obrazovanje – ključ uspeha veterinarske profesije, Zbornik radova i kratkih sadržaja 28. Savetovanja veterinarara Srbije, Zlatibor 7. do 10. septembar 2017, str 10-13; 7. ESG, 2015, Standards and Guidelines for Quality Assurance in the European Higher Education Area, EURASHE, Brussels, Belgium; 8. ENQUA, 2011, Quality Assurance in Lifelong Learning, Brussels, Belgium

НАПОМЕНА: У припреми материјала коришћеног за писање и презентовање овог рада учествовала је Јелена Јездимировић, ДВМ, запослена на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду

ВОДА - ПРОШЛОСТ, САДАШЊОСТ, БУДУЊНОСТ

WATER - PAST, PRESENT, FUTURE

*Милан Ж. Балтић^{1,5}, Милка Б. Поповић², Радмила В. Марковић¹, Јелена С. Ђурић¹,
Бранислав М. Балтић³, Марија П. Старчевић⁴, Јелена М. Јањић¹*

¹Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду; ²Медицински факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду; ³Институт за хигијену и технологију меса, Београд; ⁴Војска Србије; ⁵Матица Српска, Нови Сад

Кратак садржај

Порекло воде на земљи од античких времена, па и данас, је предмет бројних итересовања, мислиоца и истраживача из различитих области науке, још увек није у потпуности разјашњено. Са друге стране, о распрострањености воде на земљи и њеним ресурсима, нарочито о води коју човек користи за пиће зна се много више. Распрострањеност воде и водни ресурси слатке воде су неравномерно распоређени на земљи, па отуда и сигурност (доступност) воде свим становницима света је неравномерна. Пораст броја становника и климатске промене (глобално загревање) прете све већој оскудици воде у појединим деловима света, нарочито оним најмногољуднијим. Вода се од давнина не користи само за пиће и одржавање личне хигијене. Она је и материјално добро са широком применом (наводњавање, енергетски извор, транспорт, лечење, туризам, рекреација). Један од највећих проблема, са којим се у епохи антропоцена суочава човечанство, је загађење животне средине и у њој посебно загађење вода. Ово захтева одговорност и бригу, како друштва, тако и сваког појединца према заштити животне средине, употреби и поступцима са водом.

Кључне речи: порекло, распрострањеност, сигурност, употреба, загађење

1. Увод

Значај воде за живи свет је немерљив. Довољно је рећи да без воде не би било ни живота на земљи. Човек, сакупљач плодова и ловац, воду је користио само за пиће, ако се изузме риболов. Вода је била доступна свим становницима земље, није било оскудице воде и вода је, углавном, била безбедна за употребу. Са почетком пољопривреде и формирањем првих цивилизација, воду је човек почео да користи и у друге сврхе (наводњавање, пловидба, извор енергије). Тек са појавом већих насеља, а нарочито у време индустријализације, долази до загађења воде и тешкоћа у снабдевању становништва водом. У данашње време, време антропоцена, суочавамо се због пораста броја становништва ("популациона бомба"), неопходним интензивирањем пољопривреде, глобалног загревања, све веће урбанизације, са тешкоћама, не само у снабдевању становништва водом за пиће, него и за друге потребе (нпр. наводњавање). Загађењу воде, као резултату небриге о заштити животне средине, неопходно је посветити много више пажње како би сачували живи свет на земљи.

2. Вода на Земљи

Вода на Земљи се појавила пре 4,25-4,3 милијарди година, дакле после 300-350 година од појаве планете Земље. У води је настао живот и она је основни услов опстанка свих живих бића на Земљи. Структура природе је стални интерес човека. Стари филозофи Кине, Индије, Грчке су структуру природе објашњавали на концепту основних елемената (најчешће четири елемента), код

којих је у свим филозофијама један од основних елемената била вода. У индијској и грчкој филозофији основни елементи су земља, вода, ваздух и ватра, а у хиндуизму и будизму, поред ова четири елемента, је и ветар. У кинеској филозофији основни елементи су ватра, земља, вода, дрво и метал. Теорију основних елемената Буда је преузео из индијске филозофије и сваком од елемената дао посебно значење. У грчкој филозофији концепт основних елемената датира од предсократских филозофа (тзв. јонске школе), односно од Емпедокла (495-444 године п.н.е.) који је описао сва четири елемента и назвао их "коренима". Класичан дијаграм који приказује ове елементе и њихове особине представљен је са два квадрата, од којих је мањи смештен у већи, а приказан је тако да углови већег квадрата представљају основне елементе, а углове мањег квадрата њихове квалитете. Тако је ватра топла и сува, земља хладна и сува, ваздух топао и влажан, а вода хладна и влажна. Неки латински космолози су овим елементима додали и пети елемент који су назвали етар. Крајем 19. века филозофи су термин етар користили да би њиме означили нешто што није видљиво и што прожима универзум (1).

За концепт кружења водом у природи интересовали су се филозофи и научници у античким временима. Тако Талес (624-547. године п.н.е) закључује да је вода почетак свега на Земљи. Анахимандер (610-545. године п.н.е), Талесов ученик описује процес евапорације, као једну од главних компонената у кружењу воде. Хенопханес (570-475. године п.н.е), Анахимандров ученик, описује, такође, евапорацију као процес испаравања морске воде која се кроз кишу враћа на Земљу и формира речне токове и језера. Анахагарос (500-428. године п.н.е) саопштава да је кружење воде природан процес и да је то затворен циклус. О изворима и кружењу воде говоре и Платон (427-347. године п.н.е) и Аристотел (384-322. године п.н.е). У средњем веку о кружењу воде у природи говоре Bartholomeus (1209-1272. године), Leonardo Da Vinči (1452-1599. године), Kircher (1602-1680. године), Palissy (1510-1590. године), Perrault (1608-1640. године), Mariotte (1630-1684. године), Vallisnieri (1661-1730. године), Dalton (1766-1844. године) (2).

Маса воде на Земљи је само мањи део укупне масе планете (0,02%). Постојање океана је довољно да даје најупечатљивији опис планети ("плава планета") Земљи и тако је одваја од осталих планета сунчевог система. Ипак, питање порекла воде на Земљи, односно зашто на Земљи постоји много више воде него на другим планетама није разјашњено. Основна питања порекла воде на Земљи су: Када су формиран океани? и Откуд се појавила толика количина воде? Геолошки докази говоре да стене на западном делу Гренланда (датиране на 3,8 милијарди година) поседују седименте чије присуство указује на значајне количине воде (океана) на Земљи у време њиховог формирања. Могуће присуство воде на Земљи неки приписују леденим плантезималима (кометама) из астероидног појаса који, такође, садржи воду (3,4,5,6).

Међутим, утврђено је да у дубини Земље, њеном језгру 525-660 km од површине (полупречник Земље је 6.371 km), има воде која је "заробљена" у минералу рингвудиту који је упија као сунђер. Ово би могло да значи да је већа количина воде на Земљу дошла изнутра, из средишта Земље, геолошким активностима, тектонским поремећајима (земљотреси, вулкани). Количина воде заробљене у дубини Земље процењена је на количину која је три пута већа од количине воде која се налази на површини Земље. До овог открића сматрало се да се подводне воде налазе најдубље на 80 km испод површине (7,8).

Да ли је вода само привилегија Земље и живог света на њој је питање које ће вероватно још за дуго остати отворено. Воде у облику водене паре има у мањим или већим количинама у атмосфери других планета и њихових сателита. Верује се да воде има Сатурнов сателит, Енкелад (испод површине) затим на Титану (такође испод површине), на Јупитеровом сателиту, Ганимеду (притиснута између леда и стена). Залеђена вода налази се на Марсу, Јупитеровим и Сатурновим сателитима, на Плутону, а можда и другим планетама. Огромна количина водене паре откривена је 2011. године (140 трилиона пута више него воде на Земљи) око кавазара (небеска тела којих има на хиљаде милијарди) удаљеног 12 милијарди светлосних година од Земље (9,10,11).

3. Распрострањеност воде на Земљи

Водене површине чине 71% од површине земље. Од укупне количине воде на земљи, која износи 1.338.000.000 км³, 96,5% се налази у океанима и морима, 1,78% у подземним водама, колико се налази у ледницима северног и јужног пола. Од остале количине воде, само је 2,5%

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

слатка вода, а 98,8% ове воде је залеђено или се налази под земљом. Мање од 0,3% воде је у рекама и језерима и атмосфери, а само 0,003% у живом свету и индустријским производима (табела 1).

Табела 1. Распрострањеност водена Земљи (12)

Извори воде	Запремина воде у km ³	% укупне воде	% слане воде	% слатке воде	% текуће површ воде
Океани	1.338.000.000	96,5	99,0		
Пацифички океан	669.880.000	48,3	49,6		
Атлантски океан	310.410.900	22,4	23,0		
Индијски океан	264.000.000	19,0	19,5		
Јужни океан	71.800.000	5,18	5,31		
Арктички океан	18.750.000	1,35	1,39		
Лед и снег	24.364.000	1,76		69,6	
Глечер	24.064.000	1,74		68,7	
Антарктик ледени покривач	21.600.000	1,56		61,7	
Гренланд ледени покривач	2.340.000	0,17		6,68	
Арктичка острва	83.500	0,006		0,24	
Планински венци под ледом	4.600	0,003		0,12	
Подземни лед и пермафрост	300.000	0,022		0,86	
Подземне воде	23.400.000	1,69			
Слане подземне воде	12.870.000	0,93	0,95		
Слатке подземне воде	10.530.000	0,76		30,1	
Влажност земљишта	16.500	0,0012		0,047	
Језера	176.400	0,013			
Слана језера	85.400	0,0062	0,0063		
Каспијско море	78.200	0,0056	0,0058		
Друга слана језера	7.200	0,00052	0,00053		
Слатка језера	91.000	0,0066		0,26	87,0
Афричка велика језера	30.070	0,0022		0,086	28,8
Бајкалско језеро	23.615	0,0017		0,067	22,6
Северноам. велика језера	22.115	0,0016		0,063	21,1
Друга слатка језера	15.200	0,0011		0,043	14,5
Атмосфера	12.900	0,00093		0,037	
Мочваре	11.470	0,00083		0,033	11,0
Реке	2.120	0,00015		0,0061	2,03
Биолошка вода	1.120	0,000081		0,0032	

Количина воде на земљи је, практично, непромењива и у сталном је циклусу евапорације, кондензације, преципитације и отицања, углавном у мора. Кружење воде у природи, односно глобални хидролошки циклус има значајни утицај на климу. Вода на земљи може да се подели на различите начине, а један од најједноставнијих је подела на слану и слатку воду. Слана морска вода садржи најчешће 3,5% соли, а слатка вода у природи није никад чиста вода, будући да у циклусу кружења долази у контакт са различитим материјама које се у њој растварају, тако да

атмосферска вода (киша, снег, лед) садржи кисеоник, CO₂, честице прашине и чађи, понекад песка (жуте сахарске кише код нас), а ако су у близини мора, и незнатну количину соли. Атмосферске воде настају испаравањем воде, углавном из мора и враћају се на земљу као падавине, а слатке воде на површини земље потичу од подземних вода из земље и воде из атмосфере. Резерве подземних вода се обнављају од површинских вода које продиру до непропусних слојева унутар земље, односно стена са малом порозношћу. Подземне воде су далеко чистије од атмосферских и површинских вода и често се без додатних поступака обраде могу користити за пиће (9,12,13).

Највише воде у атмосфери долази из вода мора и океана, а само 2,5% од слатке воде. Слатка вода је веома неравномерно распоређена на Земљи. Само је 0,3% воде у течном стању на површини Земље, од чега је 87% у језерима, 11% у мочварама, а само 2% у рекама. Веома мали проценат воде је у атмосфери и живим организмима. Од извора слатке воде, углавном највећи значај имају језера и речни токови. У сушним подручјима далеко већи значај имају подземне воде. Количина подземних вода је тешко мерљива, али ни ти ресурси нису неисцрпни и количина подземних вода зависи од односа воде која се узима из подземних резервоара и количине воде која се у њих враћа са површине земље (9,12,13).

4. Водни ресурси

Водни ресурси слатке воде нису подједнако распоређени у свим деловима света. Укупна количина водних ресурса, према FAO подацима из 2003. године, је 43.750 km³ годишње, од чега се највећа количина налази у Азији (28,5%), Јужној Америци (28,3%), Северној Америци (17%), Европи (15,2%), Африци (9%) и Океанији и Пацифику (2,1%). Највише воде по становнику годишње је у Азији, приближно иста количина по становнику је у Океанији са Пацификом и Јужној Америци, затим Северној Америци, Европи, а најмања количина је у Африци и Блиском истоку. Просечна количина у свету воде по становнику је 7.243 m³. Са најмање воде по становнику располаже Кувајт (10 m³ годишње), а највише Канада и Исланд (преко 100.000 m³ годишње). Минимум воде потребне по становнику годишње процењен је на 1.000 m³. У свету је 19 земаља које располажу са мање од 500 m³ воде по становнику годишње, а у 29 земаља је расположивост воде мања од 1000 m³(14,15).

Распоред падавина у свету је такав да 3/4 годишње падавина је у Јужној Америци у којој живи 1/3 светског становништва. Око 20% просечних годишњих падавина се везује за подручје Амазоније, где живи свега 10 милиона становника, а око 30% падавина у Африци је у подручју реке Конго, где живи, такође 10 милиона становника. И речни токови нису подједнако распоређени. У Азији је од укупних речних токова 31%, а око 25% у Јужној Америци. Количина питке воде се значајно не повећава са годинама, као што је то случај са производњом хране. Због тога су оправдана страховања да ће се расположива количина воде по становнику, која је крајем 20. и почетком 21. века била приближно 9.000 л годишње смањити на 5.100 л 2025. године, а још значајније смањити до 2050. године када се очекује да ће у свету бити 9 милијарди становника. Поред броја становника и смањени извори воде ће највише угрозити Азију и Африку, а затим и Аустралију и Океанију. До 2025. године 1/5 глобалне популације ће живети са апсолутном оскудицом, а 2/3 у условима "воденог стреса" (бриге за довољном количином воде) (15,16).

Већина високо образованих људи, политичара, индустријалаца, а у ствари свако ко се брине за здравље људи и живот на планети Земљи забринут је за сигурност воде (довољне количине), како у овом времену, тако и у будућности. Пораст популације, економски развој и урбанизација врше непримерен притисак на водне ресурсе. Климатске промене узорковане деловањем људи су додатно оптерећење за водне ресурсе. Оне су и узрок повећаног испаравања воде са отворених површина (океани, мора, језера, реке), а и из самог земљишта, што се све одражава на климатске промене на Земљи (12,16,17).

5. Снадбевање водом

Снадбевање становништва водом био је један од услова у развоју великих градова, како у Старом, тако и у Новом веку. Претеча система снадбевања градова водом био је водовод у Месопотамији са својим каналима за наводњавање (18). Отвореним аквадуктима своје градове су водом снадбевали Сумерци и Вавилонци. То су радили и Египћани. Феничански аквадукти

познати су у Либану, Сирији и на Кипру. Хелени су били познати по својим аквадуктима, а међу најпознатијим је био онај на острву Самосу, дугачак мање од 2 km, али по начину изградње и савладавању низа препрека представља "осмо светско чудо" и узор за будуће градитеље водовода. Римске архитекте су у изградњи водовода користили сва дотадашња искуства и сјединили их у јединствену стратегију градње. Данас је у свету сачувано мало аквадуката, а који су ремек дела античке архитектуре, а данас су самим тим и туристичка атракција. Антички аквадукти сачувани су у Италији (Рим, Помпеја, Кампања). Међу старе сачуване аквадукте спадају и они у Француској, Немачкој, Швајцарској, Шпанији, у неким земљама Азије и Африке. Римљани су на територији Горње Мезије (данас на територији Србије јужно од Саве и Дунава) изградили аквадукте који, нажалост, нису сачувани, али о њима постоје материјални докази. Материјални докази о постојању аквадуката на територији Србије сачувани су у Сремској Митровици, Доњем Петровцу код Руме, Београду, Дубравици (Пожаревац), Виминацијуму (Стари Костолац), Великом Градцу (код Доњег Милановца), Ћуприји, Нишу, Брзом Броду (Ниш), Гамзиграду, Царичином граду и Скопљу (данас Македонија) (19).

Римски водовод у Београду је изграђен средином првог века нове ере за потребе војске која се налазила на простору Малог Мокрог Луга, да би касније са истог места водовод био продужен до насеља Сингидунама (17). У средњем веку Београд је био под турском влашћу, а кратко (између 1717. и 1930. године) под аустријском влашћу. Евлија Челебија, турски државник и путописац боравио је у Београду 1660. године и записује да у Београду има око 98.000 становника и 11.000 бунара. Поред бунара, водом за пиће становништво се снабдевало и са чесама (Делијска, Чукур, Тоскина, Теразијска, Сака итд.), а воду су разносили и продавали сакације (вода из чесама и из река Саве и дунава. У Београду и данас постоји чесма Мехмед паше Соколовића, великог везира, јединог који је био у служби три турска султана (Сулејман Величанствени, Селим II и Мурат II) где је било записано "Дођи беже... ако желиш да пијеш са рајског врела" (20). За чесме у Београду везан је и један немио историјски догађај. Саву Петковића, дечака шегрта у Београду, убили су Турци 1862. године у сукобу око воде. То је у крајњем имало за последицу да су Турци 1867. године предали кључеве града кнезу Михаилу Обреновићу. На месту овог догађаја подигнута је спомен чесма на којој је скулптура "дечак са разбијеним крчагом" (аутор Симеон Роксандић). Турци су у 17. веку изградили булбударски водовод. Овај водовод снабдевао је водом ужи центар града (тврђава, управне зграде, пашин конак, богатији грађани). У 18. веку (1724-1737. године) изграђен је варошки водовод, за време аустроугарске власти, и имао је знатно већи капацитет од турског водовода. Савремени водовод у Београду изграђен је 1892. године, а за снабдевање града данас, користе се подземне воде, као и воде Саве и Дунава на више локација ван града (21).

6. Вода за пиће

Снабдевање водом сваког становника Земље мора да буде континуирано за пиће, личну хигијену и потребе у домаћинству (припрема хране). Према WHO, дневне потребе човека су између 50 и 100 литара и њима могу да се задовоље основне потребе како би човек сачувао здравље. Код великог броја људи су свету потрошња воде је 5 л на дан, што је једна десетина воде коју троше становници у богатим земљама само у купатилу. Основне потребе за водом за пиће код жена које доје децу, а да су притом умерено физички активне, је 7,5 л воде дневно. Ово су препоруке које је донео WHO и друге светске организације (22,23).

Поред директног узимања воде, човек узима и воду и на друге начине. Један од њих је храна. Вода се у производњи хране користи да би се инкорпорисала у њу (нпр. производња барених кобасица) или је храну потребно рехидрисати (млеко у праху). Вода је, поред тога, неопходна и у производњи напитака (сокова). За све ове поступке мора да се користи вода квалитета воде за пиће. Такође у производњи воде, као и хране треба се придржавати принципа добре произвођачке и добре хигијенске праксе. За припрему неких врста хране (нпр. свежа салата) неопходне су знатне количине воде, јер се поступак прања обавља сталним протоком и одвођењем воде (2,23).

Вода за пиће се добија од површинских и подземних вода. Подземне воде, у највећем броју случајева, имају квалитет воде за пиће. За добијање воде за пиће користе се површинске

воде прве класе (у њој се могу наћи пастрмке и може да се пије) и површинске воде друге класе (у њима нема племенитих риба) и мора се пречишћавати. Трећа класа воде није ни за купање и то је заправо технолошка вода, која се не користи у прехранбеној и фармацеутској индустрији. Четврта класа воде користи се само за пловидбу и хидроелектране. За подземне воде нема класификације као за површинску воду. Здравствено безбедна вода добија се низом поступака (седиментација, филтрација, хлорисање), чији циљ је одстрањивање биолошких и хемијских опасности (испод границе дозвољених нивоа) и добијање безбедне воде за пиће. Вода у водоводној мрежи садржи резидуални хлор (количина резидуалног хлора у води треба да буде 5 mg/l 30 минута после контакта са водом) који омогућава да вода буде бактериолошки исправна (12).

Време од 2005-2015. године било је означено као светска декада воде, а названо је "вода за живот". Основни циљеви ове иницијативе били су испитивање значаја ресурса воде за пиће на планети Земљи, њен значај за здравље људи, привредни значај и значај за цивилизацију, уопште, како би се спречиле хуманитарне катастрофе због недостатка довољних количина воде и воде која неће бити узрок обољења људи. Коначно, ова иницијатива имала је за крајњи циљ спречавање ратова због воде. Иницијативу су организовале Уједињене нације са идејом да се преполови број људи који немају приступ води за пиће и за одржавање основних хигијенских потреба. Међутим, касније је ово време када би требало да буде довољно воде за највећи део становништва померено на 2025, односно на 2030. годину (22,23).

Према неким прогнозама, до средине 21. века 7 од 9 милијарди људи могло би да буде суочено са несташицом воде. Аналогно "зеленој револуцији" у пољопривреди, у свету из прошлог века, има мишљења у научним и стручним круговима који заговарају "плаву револуцију", чиме би се искључила могућност ратова због воде, као што их је већ било (22,24).

Данас се сматра да се најмањи антропогени утицај на квалитет воде односи на воду добијену топљењем глечера. Ово су прво уочили Јапанци и последњих 30 година флаширају ову воду као "стару воду", односно воду која није од момента замрзавања била у контакту са атмосфером, нити са било којим загађењем антропогеног порекла. Глечери су огромни природни резервоар воде за пиће, али им прети отапање, као последица глобалног загревања. Уколико би се на Земљи сва замрзнута вода отопила, ниво вода би порастао за 80 метара, што би за човечанство било катастрофално. Сматра се да најквалитетнију воду има Финска, затим Канада, Нови Зеланд, Велика Британија, Јапан, Русија, Јужна Кореја, Шведска и Француска, а најмање квалитетну земље подсахарске Африке и неке земље Азије (2,25).

За снабдевање становништва водом, поред површинских и подземних вода, користи се и десалинизована морска вода. У неким земљама се највише користи подземна вода (у Данској и Аустрији 99%, Италији 90%, Финској 84%, Србији око 80%). Неки градови, готово у потпуности, користе подземну воду (Беч и Хамбург 99%, Рим 98%, Будимпешта 84%) (25).

Неправилна искоришћавања и загађења воде угрожавају залихе воде у свету. У наредних 20 година резерве воде за пиће биће смањене за 30%. Потребне становништва за водом могу да се задовоље уз услов да вода буде што уједначеније распоређена у свим деловима света, што је практично неизводљиво. Већ сада 40% популације у свету нема довољно количине воде. У САД по становнику се дневно троши 600 l воде, у Европи 200-400 l воде, а у Африци има земаља у којима становништво троши само 2 l воде. До озбиљне кризе у свету у снабдевању водом долази ако је годишња потрошња воде мања од 1.700 m³. Све то може да доведе до нестабилности унутар држава и регионалних тензија, па и ратова. Први међународни сукоб у свету због воде био је 1967. године између Израела и Јордана, због реке Јордан чији ток је Израел преусмерио изградњом бране (14,16).

7. Употреба воде

За развој људских цивилизација вода је имала огроман значај. Као што је познато, прве цивилизације настале су тамо где је почела организована пољопривредна производња (производња пшенице, кукуруза, пиринча), односно у долинама великих река. И неолитске цивилизације Балкана (Лепенски вир, Старчево, Винча) настале су уз обале реке (Дунав). Велике светске метрополе, такође су настале у близини вода (реке, мора), а Београд се налази чак на две велике реке (18,26,27).

У морским водама света излови се годишње око 95 милиона тона рибе. Улов је ограничен за свако ловно подручје, како не би дошло до прекомерног излова, нарочито најчешће ловљених врста риба (ослићи, плава риба) и како то не би пореметило равнотежу фауне мора и океана. Потребне за рибом, као намирницом, због све веће тражње, подмирују се рибом гајеном у аквакултури (слатке и слане воде, бочатне воде). За неколико година производња риба у аквакултури ће се изједначити са количином изловљене рибе у морима и океанима (28,29). Вода као енергент је прво кориштена за механичку енергију, односно за млевење жита, али и за дробљење камена, угља и других чврстих материјала. Млинови се помињу у записима Антипатера (друга половина првог века п.н.е.-прва половина првог века) (30). У средњовековној Србији млинови су били власништво владара, манастира и властеле, а касније, најчешће, заједничко власништво села, имућнијих породица. Услуга млевења кукуруза (ујам, ушур) била је за кукуруз 5%, пшеницу 6%, за јечам или зоб 1%. Жито се мелело у млиновима чији власници су били владари, властела, манастири, градови, али и обичан свет. Цар Душан је у Светоарханђеловској хрисовуљи манастиру у Призрену одредио: "и нико да не постави млина на црквеној земљи, ко постави да плати 500 перпера и млин да му се одузме" (31). Многи млинови нису припадали једном власнику, већ су били заједнички. Манастиру Трескавици цар Душан је дао половину млина, а краљ Милутин Липљанској епископији „половину сваке воденице које су биле на изводу Родимском“. Из турских пописа из 1455. године у области Бранковића на 14.486 кућа било је 388 млинова (на 37 кућа један млин). Из истих извора сазнаје се да је у Браничеву 1476. године на 4.619 кућа било 98 млинова (на 47 кућа један млин) (32). Према попису материјалних добара Србије из 1867. године (годину дана пре убиства Михаила Обреновића) у Србији је било 7.125 воденица. Воденице нису имале само економски значај, већ су то била места где су се људи састајали, договарали, доносили одлуке (33). Данас су млинови (воденице) на водотоковима у Србији реткост, више туристичка атракција него што им је то сама употребна вредност.

Од изградње електране на Нијагариним водопадима, вода се користи за производњу електричне енергије. Коришћење воде за производњу електроенергије је, са становишта заштите животне средине, најприхватљивији начин производње електричне енергије, будући да се ради о обновљивом извору енергије. За производњу електричне енергије могу да се користе плина и осека. Прва електрана која је користила плиму и осеку изграђена је у Француској (La Rance, 1966. године). У свету их данас има осам, а највећа по снази је она у јужној Кореји. Изградња оваквих хидроцентрала је веома скупа, а поред тога и мало је погодних локација за њихову изградњу. Електране на морске струје су још у фази испитивања и нису комерцијализоване. За производњу електричне енергије, користи се и енергија таласа, и огледна електрана овог типа постављена је у водама Аустралије (34).

Употребна вредност воде огледа се и у могућности транспорта терета водотоковима, односно морима и океанима. За транспорт роба на копну су грађени вештачки канали. Они нису кориштени само као водени путеви, већ су кориштени и за снабдевање водом, како за становништво, тако и за наводњавање. Понекад су канали грађени са наменом обликовања простора (паркови). Најпознатији канали за транспорт роба бродовима су Панамски и Суецки канал. Суецки канал је један од два највећа грађевинска подухвата који су везани за море. Овај канал има дужину од 163 km (са прилазним каналима 193 km), спаја Средоземно и Црвено море и раздваја Африку од Азије. Пловидба овим каналом почела је 1869. године. Његовом изградњом скраћен је пут између Атланског и Индијског океана за 7.000 km. Радови на проширењу канала од пре неколико година (2014-2016. године) допринели су повећању капацитета пролазности са 47 на 97 бродова дневно. Идеја повезивања Црвеног мора изградњом канала до Нила и тако повезивањем са Средоземним морем, иде уназад скоро 2.000 година п.н.е. о чему говоре материјални налази канала, који су нађени између Нила и Црвеног мора, што говори о томе да то није била само идеја.

Панамски канал раздваја Северну и Јужну Америку, а ископан је у периоду од 1883. до 1914. године. Повезује Атлански и Тихи океан. На најужем месту је широк 91,5 m, а најширем 350 m. Дубок је 13,7 m, а његовом изградњом пут од Њујорка до Сан Франциска скраћен је са 22.500 km на 9.500 km. Дневном каналом прође 40 бродова (35).

Канали су били познати још у античко доба и користили су се пре око 4000 године п.н.е. у Месопотамији (данас Ирак и Сирија), долини Инда (око 2600. године п.н.е), Египту (2332-2283. године п.н.е), Кини (481-221. године п.н.е.). Најдужи канал је велики канал Кине (1794 km), који је и данас најдужи канал у свету, а грађен је од 605-609. године. За његову изградњу коришћен је део већ постојећег канала из 486. године п.н.е. У најужим деловима овај канал је широк 30 метара. Канали су грађени јер је транспорт водом био много јефтинији него транспорт копненим путем. То је и данас најјефтинији начин превоза терета. У средњем веку, односно у постримском периоду, први канал је изграђен у Великој Британији (Гластонберски канал), који је изграђен средином 10. века, а чија дужина је била свега 1,75 km. Овај канал користио се до 14. а по неким подацима и до половине 16. века. У Италији је од 1127. до 1257. године изграђен канал који је повезивао Милано са реком Тичино и то је данас најстарији функционални канал у Европи. Од познатијих канала средњег века је онај који повезује Лоару и Сену (1642. године), а затим канал Муди (1683. године), који повезује Атлански океан са Медитераном, а који једним делом пролази кроз тунел дужине 157 метара. У 17. и 18. веку у Немачкој су повезане каналима три велике реке (Јаба, Одра и Везер). У средњовековне канале убраја се и Ексетерски канал у Великој Британији (1566. године). У САД канал Мастербрук повезује Бостон (река Чарлс и ушће Непосент реке) са морем, а конструисан је 1639. године за потребе воде за млинове. У Русији је најпознатији Волго-Балтички канал који преко реде Неве и Волге повезује Балтичко море са Каспијским језером (морем). Отворен је 1718. године. У 18. и 19. веку у време индустријске револуције порасла је још већа потреба за изградњом канала, што је било нарочито изражено у Великој Британији, која је изградила већи број канала од 1770. до 1830. године. Ово време је познато и као "златно доба британских канала". То је време када се у целој Европи граде канали, па и у Аустроугарској. Део аустроугарских канала из тог доба изграђен је и у Војводини (35,36,37).

8. Вода у наводњавању

Наводњавање пољопривредног земљишта није оновремена појава, већ је то потреба за коју су знале и старе цивилизације, у Месопотамији, Египту, подсахарској Африци, у долинама Анда у Перуу, долини Инда (данашњи Пактистан), Кини, Северној Америци. Старе цивилизације су наводњавање користиле највећим делом због усева, али је вода из канала за наводњавање коришћена и за снабдевање водом и урбаних насеља. Почетком овог века 2.738.000 km² плодног земљишта било је опремљено са системима за наводњавање. Највише површина за наводњавање је у Азији (68%), Северној и Јужној Америци (17%), Европи (9%), Африци (5%) и Океанији (1%) (рачунато на укупно наводњаване површине). Наводњаване површине 2008. године биле су 3.245.566 km², што одговара укупној површини Индије. Значај наводњавања највидљивији је на примерима "зелене револуције" у Мексику, Филипинима и другим зељама у прошлом веку, чији успех се у великој мери може приписати наводњавању. И Србија има услове да у најплоднијем делу земље (Војводина), у којој постоји изграђен систем канала, наводњава знатно веће површине него до сада. Разуме се да повећање наводњаваних површина у Србији захтева знатна улагања у систем наводњавања (чишћење канала, опрема за наводњавање, енергија) (24,38).

Вода се често користи за наводњавање (нарочито у производњи поврћа, али и житарица). У производњи поврћа је посебно значајно да се користи вода која не садржи контаминенте, а међу њима и патогене бактерије. Присуство *E.coli* O157 у поврћу у Немачкој и Великој Британији последица је наводњавања башти бактериолошки неисправном водом (отпадне воде из сточарства). Ако се ова вода и користи, не сме се наводњавање обављати прскањем, већ дубинском употребом (кроз земљу), без контакта са поврћем. Узрок контаминације поврћа, па чак и производних објеката могу да буду и поплаве. Разуме се да у таквим случајевима треба применити низ мера како би се становништво заштитило од биолошких и хемијских опасности које поплаве доносе са собом (38,39).

Биљке (усеви) троше воду за фотосинтезу, раст, репродукцију. Вода коју користе биљке је делимично неповратна јер се део везује за састојке биљака, а део испарава у атмосферу. Биљке троше различите количине воде, као што је то случај и код животиња. Минималне количине воде у земљишту за раст биљке зависи од врсте. Тако је за парадајз (у САД) потребна количина воде у земљи 25-50%, луцерку 30-50%, а кукуруз од 50-70%. Количина воде у земљи потребна усевама

зависи од режима падавина, температуре, вегетацијског периода, нивоа органских материја. У САД за хектар кукуруза са прирастом од 9.000 кг потребно је око 6 милиона литара воде у сезони, при чему 1-2,5 милиона литара испари у атмосферу, што значи да је кукурузу потребно око 8 милиона литара воде по хектару, или 800 mm падавина. Како је у САД просечна количина падавина од 800-1.000 mm годишње, то се у сезони гајења кукуруза не могу да обезбеде довољне количине воде за кукуруз. Количина воде у земљишту под усевима пиринча треба да је најмање 80%, а за један хектар са приносом од 7 тона потребно је 11 милиона литара воде. За хектар соје потребно је 6 милиона литара ако је принос 3 t/ha. У условима без наводњавања кукуруз би имао принос од 1-2,5 t/ha, и поред свих примењених агротехничких мера (16).

Пољопривреда троши близу 70% свеже воде. Само 17% светске производње жита се наводњава, али се на овим површинама добије чак 40% од укупне производње жита. Пораст површина које се наводњавају почео је знатно да расте због наглог пораста броја становника у свету. Тај пораст био је нарочито изражен у последњој декади 20. века. Трошкови наводњавања нису занемарљиви, а они се односе на изградњу система, његово одржавање, утршак енергије, губитак воде током транспорта. Негативни ефекти током наводњавања су салинизација земљишта, при чему у поступку десалинизације огромне количине соли заврше у рекама. Један од негативних ефеката наводњавања може да буде плављење делова земљишта као последица конфигурације делова земљишта и накупљања воде у нижим деловима терена (16,38).

Производња протеина меса захтева знатно више воде него производња биљних протеина. Гајене животиње, као и животиње у природи, напајају се *ad libitum*. Сточарска производња троши у свету сам 2% од укупне воде која се користи у пољопривреди. Истина, стока знатне количине воде уноси преко хране. Сваке године у САД 253 милиона тона жита потроши се за исхрану стоке, а за производњу ове количине жита утроши се 25x1013 литара воде.

Количина воде потребна за производњу једног килограма биљних култура и меса различитих животињских врста приказана је у табели 2. Од биљних култура највише воде се троши у производњи соје (2.000 литара за 1 kg, а најмањи за килограм проса-272 l). Потрошња воде по килограму меса зависи од животињске врсте, извора хранива, услова држања, климе, расе итд. У САД ће производња хране у следећих 50 до 70 година и даље расти, што ће значајно утицати на повећање потрошње воде, нарочито у подручјима са малом количином падавина.

Табела 2. Просечна количина воде потребна за приносе у пољопривреди (16)

Параметар	Вода (l/kg)
Соја	2.000
Пиринч	1.600
Сирак	1.300
Луцерка	1.100
Пшеница	900
Кукуруз	650
Парадајз	630
Просо	272
Бројлери	3.500
Свиње	6.000
Говеда	43.000
Овце	51.000

9. Воде Србије

Србија је од 180 земаља света, 47. земља по количини интерно доступне воде по становнику годишње, а 35. ако се рачунају укупне воде Србије (воде које не протичу само кроз Србију). Распоживост воде годишње по становнику у Србији је 4.170 m³. Највећу

расположивост воде годишње по становнику има Гренланд (преко 10 милиона m^3). Од земаља у окружењу, са знатном количином воде по становнику је БиХ (36.443 m^3 годишње, Албанија (8.583 m^3 годишње), Хрватска (8.101 m^3 годишње), Грчка (5.467 m^3 годишње), Македонија (2.655 m^3 годишње), Словенија (9.391 m^3 годишње), Мађарска (602 m^3 годишње) (рачуната само вода са сопствене територије, не и међународне воде). Испод просечне потребне количине воде по становнику (1.700 m^3 годишње) је 57 земаља у свету, а 39 ако се рачунају и међународне воде. Са најмањом количином воде по становнику су Кувајт (10 m^3 годишње, и без сопствених извора воде), УАЕ (58 m^3 годишње), Катар (99 m^3 годишње), Бахами (66 m^3 годишње) (22).

Просечан укупан захват воде у Србији (2011-2016) био је 4090 милиона m^3 , од чега је захват површински вода био 3644 милиона m^3 (89,09%), а подземних вода и извора 446 милиона m^3 (10,91%). Од укупне захваћене воде, искоришћено је 3868 милиона m^3 (94,57%), а губици су били 222 милиона m^3 (5,42%). За сакупљање, пречишћавање и санитацију, пољопривреду, шумарство и рибарство, као и за прерађивачку индустрију, од укупно захваћене воде кориштено је 807 m^3 (19,73%), што значи да је највећи део воде кориштен као енергетски извор (електричне енергије). Од површинских вода користи се 385 милиона m^3 (12,26%), а од подземних вода 440,6 милиона m^3 (98,88%). Вода за ове намене користи се у домаћинствима, пољопривреди, шумарству, рибарству и прерађивачку индустрију у количини од 501 милион m^3 (7,29% од укупно коришћене воде). Од 501 милиона m^3 коришћене воде, у домаћинствима се потроши 311 милиона m^3 (62,07%), пољопривреди и рибарству 88 милиона m^3 (17,56%), од чега за наводњавање 59 милиона m^3 (11,77%), а за сточарство 29 милиона m^3 (5,78%) (40).

Просечна количина испуштене воде била је у периоду 2014-2016. године 3.746 милиона m^3 , од чега је највећи део воде за хлађење (3.260 милиона m^3 или 87,3%). Просечна количина отпадних вода из индустрије била је 86 милиона m^3 (2,29%), јавне канализације 291 милиона m^3 (7,77%), отпадних вода без јавне канализације 108 милиона m^3 (2,88%). Пречишћава се, просечно, 142 милиона m^3 (3,79%) од испуштених вода. На водовод је прикључено 84,8% домаћинстава, а на канализациону мрежу 60,1%. Само 12,5% отпадне воде из домаћинстава се пречишћава. Београд има укупно 29 одвода отпадних вода из домаћинстава које се уливају у Саву и Дунав и ни један од ових одвода није пречишћен (40).

Прва хидроелектрана у Србији пуштена је у рад 1900. године, а изграђена је на реци Градац код Ваљева. Исте године пуштена је и електроцентрала у Ужицу на Ђетињи, прва са Теслиним саставом трофазне струје. То је била и прва хидроцентрала у Европи, а друга у свету, изграђена само четири године после прве и најчувенија хидроцентрала на Нијаганириним водопадима. До Првог светског рата изграђене су електране на Вучјанки (Вучје 1903. године), на Нишави (1908. године), на Црном тимоку (1909. године) и Моравици (Ивањица 2011. године). Свих пет ових електрана су део електросистема Србије и раде и данас. Највећа хидроелектрана у Србији је Ђердап I на Дунаву (1970. године). На Дунаву је и хидроелектрана Ђердап II. Хидроелектране се данас у Србији налазе још на Дрини (три), Лиму (две), Увцу (две), Западној Морави (две), у Пироту (једна) и у хидросистему Власине (четири). Укупна снага свих генератора у овим електранама је 2.777,3 MW. Србија има водне ресурсе за изградњу нових хидроелектрана већих капацитета, али и 856 локација за изградњу малих хидроелектрана, снаге до 10 MW. Такође, ревитализацијом постојећих хидроцентрала повећала би се и њихова снага. Сада хидроелектране Србије произведу 9180 GWh електричне енергије, што је око 1/4 укупне електричне енергије (41).

Реке Србије припадају црноморском (92% територије Србије), егејском (3% територије Србије) и јадранском сливу (5% територије Србије). У Србији је 76 река, чија дужина је већа од 60 km и 50 река чија дужина је мања од 60 km. Најдужа река, која протиче само кроз Србију је Велика Морава (493 km), а најкраћа Врело (365 m) или река "годину дана" (42).

Канали Војводине исушили су тло и мочварно земљиште обрасло трском и шашом претворили у једно од најплоднијих земљишта у Европи. Визионар модерних канала био је Леонардо Да Винчи, који је урадио план изградње канала од престонице Ломбардије (Милано) до средње Европе и мора преко река Тичино и Аде. Поред трасе, дао је скицу машине за копање, скице преводница и капија, какве се и данас користе и још увек нису застареле. Изградња канала у Војводини почиње радовима у Бачкој 1785. године и, због добрих резултата, 1783. године почиње изградња Великог бачког канала од Куле до Врбаса. У 19. веку изградња канала у Војводини се

наставља, а завршава се у 20. веку, када је од 1957. до 1977. године реализована изградња канала и њихово повезивање у један систем, познат као ДТД (Дунав-Тиса-Дунав). Укупна дужина канала 929 km, од чега је у Бачкој 420,8 km, а у Банату 508,2 km. Пловно је, укупно, 664 km, а на пловном путу је 14 лука. Изградњом канала исушено је 700 хиљада хектара земље и омогућено наводњавање још 50 хиљада хектара. Сама брана на Тиси код Новог Бечеја има капацитет наводњавања од 300 хиљада хектара земљишта у Банату. Поред мреже канала, изграђен је још 51 објекат (капије, преводнице, пумпе), као и 180 мостова (43).

Сразмерно својој површини (88.361 km²), Србија је земља са највише бања у Европи, а по неким анализама, вероватно и у свету. На територији Србије је преко 300 извора термоминералних вода, а испитано је око 250. Данас су у Србији уређене као лечилишта 53 бање. Трагови најстаријих купатила на територији Србије датирају од пре 4000 година у Вичкој бањи (Топлички кисељак) и сматра се да је то најстарије минерално каптажно врело на свету. Трагови материјалне културе везане за бање најбројнији су из доба Римљана који су имали култ према лековитим водама (бањама). Остаци ових култура нађени су у Нишкој, Врањској, Гамзиградској, Јошаничкој, Сијеринској, Врањској, Звоначкој, Соко бањи и др. Бање су биле цењене и у турско време, о чему говоре, не само материјални докази, већ и путописи и историчари (Евлија Челеби, Константин Лиричек) (20,44). У 19. веку за бање Србије постоји све већи интерес научника, а када се Србија ослободила од Турака, почело се и са испитивањем минералних вода. Кнез Милош Обреновић је у Беч послао на анализу узорке воде из седам бања у Србији. Вода из Врњачке бање била је по својим особинама најсличнија води из Карлових Вари (Карлс Бад), једне од најчувенијих бања у свету.

Воде у земљи потичу од површинских вода и путују у њену дубину веома споро, па су отуда подземне воде које сада користимо веома старе. Изотопским испитивањима утврђено је да је старост Пролом воде 1.350 година, а воде у Буковичкој бањи 40.000 година. Максимална дубина на којима се налазе подземне воде је око 3.000 метара. Запремина воде у подземним налазиштима варира од неколико стотина хиљада до неколико стотина милиона m³. С обзиром на чињеницу да су подземне воде и термалне воде, време експлоатације геотермалне енергије је пред нама. Србија спада у групу земаља са значајним геотермалним потенцијалом. Из тих извора у наредних 30 година могло би да се експлоатише 16.000 MW за топлофикацију и око 15.000 MW за производњу електричне енергије.

Подземне воде често садрже различите минералне материје, што зависи од састава стена са којима вода долази у контакт. Наша најпознатија минерална вода (налази се на дубини од 500 m испод површине земље) је специфичног минералног састава захваљујући томе што пролази кроз буковачки гранит вулканског порекла. Старост тих гранита је од 18 до 25 милиона година. Од више хиљада минералних вода у свету, вода Књаз Милош се издваја међу педесетак вода чији минерални састав се везује за магматске стене (45,46).

Минералне воде Србије од српских научника највише су испитивали Сима Лозанић (први ректор Универзитета у Београду) и Марко Лeko. Највећи број бања у Србији припада групи хипотермних (температура воде од 20 до 34 °C) бања, а двадесетак групи хомеотермних (температура воде 34-38 °C) бања, док неке бање припадају групи хипертермних (температура воде преко 38 °C). Највиша температура воде је у Врањској бањи (96 °C), Јошаничкој (78 °C) и Сијеринској (75 °C). Бање Србије користе се за лечење болести срца и крвних судова, локомоторног система, респираторних болести, реуматизма, неуролошких обољења, гастроинтестиналног тракта, гинеколошких обољења, болести метаболизма, лечење уринарног тракта, незаразних болести коже итд. Данас бање Србије нису само лечилишта, већ се у њима организују различите туристичке манифестације (дечији и омладински туризам, рекреативни турзам, одржавање конгреса) (46,47).

Минерална или, може се рећи, лековита вода, је вода која у једном литру садржи више од грама минералних материја. Постоји више начина подела минералних вода, а једна од најстаријих је још из 19. века (Т. Мирковић), према којој воде могу да буду сулфатне, бикарбонатне, гвожђевите и недефинисаног карактера. Понекад се у лековите воде сврставају и оне које садрже мање од једног грама растворених минералних материја. Воде могу да се поделе на: природно врло слабе минералне воде (суви остатак мањи од 50 mg/l), природно слабо минералне воде (у

којој је минерални суви остатак мањи од 500 mg/l), природно минералну воду (којој је минерални суви остатак између 500 и 1.500 mg/l) и природно минералну воду богату минералним солима (где је садржај соли већи од 1.500 mg/l). Природне воде, воде из подземних извора, без обзира на садржај минерала могу да буду газирани (природно газирани или газирани у току прераде) и негазирани. Минералне воде се у промет стављају, углавном, паковане, у стаклене, чешће у пластичне боце (тзв. флаширана вода). За разлику од воде за јавно снабдевање становништва (вода из чесме), флаширана вода није дезинфикована. Према пореклу, односно начину на који долази до потрошача, вода може да се подели на воду из чесме и воду из боце (флаше). Флаширане воде могу да се нађу под следећим називима: стоне воде за пиће, пречишћене воде, изворске воде, олигоминералне и минералне воде. У свету су прецизно дефинисани стандарди воде за сваку флаширану воду. У Србији постоји дуга традиција конзумирања минералних вода, али не и обичне флаширане воде, па због тога и постоји разноврсност термина који се користе за ову врсту воде. Флаширане обичне воде (воде које нису минералне) су по количини сувог остатка једнаке води из чесме (48). Минералне воде се међусобно разликују по садржају макроелемената (Na, Ca, K, Mg) и микроелемената (Fe, Cu, Co, Mn, Ni, Zn, Se, F), као и по садржају јона сулфата и бикарбоната, рН вредности, електропроводљивости. Садржај појединих елемената (не свих) који могу да се нађу у води и осталих показатеља квалитета воде која се користи за пиће дефинисани су прописима, односно одговарајућим правилницима (49,50,51,52).

Потрошња флашираних вода у Србији је 75-80 l годишње по становнику, што у укупној количини захваћених подземних вода (6 милиона m³ годишње) чини мање од 0,1%. У структури продаје природне минералне воде доминира потрошња газираних вода која износи око 75% (50).

10. Загађење воде

Вода спада у "обновљиве" природне ресурсе, за разлику од других природних (енергетских) ресурса, нафте и угља, који су необновљиви. Вода у природи је у сталном кружењу, има циклусе и оно што се у току тих циклуса дешава је њена промена, најчешће неповољна, јер се вода оптерећује загађивачима биолошке и хемијске природе, загађивачима радиолошког порекла, као и физичког порекла (пластика, дрво). Спровођење мера спречавања загађења вода је данас један од основних задатака људског друштва када је у питању снабдевање водом (53).

Отпадне воде су најчешћи загађивачи животне средине, а деле се на анорганске и органске. У обе групе налазе се загађивачи који немају или који имају токсичне особине. У групи анорганских загађивача са специфичним особинама су амонијак и његове соли, сумпор водоник, тешки метали и арсен, цијаниди. Органски загађивачи са специфичним токсичним особинама су фекалије, мокраћа, средства за прање, нафта и њени производи, органске киселине, алкохоли, кетони, феноли, органске боје, пестициди, инхибитори раста биљака, фармацеутски производи (лекови) итд. (54).

Загађење воде настаје када нежељене материје контаминирају воду и тако утичу на њен квалитет, а штетно делују на животну средину и здравље људи. Вода је најважнији природни ресурс и, поред тога што се користи за пиће, користи се и у бројне друге сврхе. Безбедна вода је неопходна за здравље људи у свету. Вода је, међутим, често узрок обољења људи и према FAO подацима 80% болести људи узроковано је небезбедном водом. Вода за пиће у различитим земљама не задовољава WHO стандарде. У свету је загађена вода узрок смрти 3,2% од укупних узрока смрти. Отпадне воде из домаћинства и индустрије, затим воде коришћене за наводњавање, употреба средстава за заштиту биља, вештачка ђубрива, депоније органског и другог отпада су основни узроци загађења воде. Загађивачи животне средине акумулирају се у површинским водама (језера, реке) и отуда могу да штете здрављу људи и животиња, узрокујући различита обољења (имуносупресија, деловање на репродуктивне органе, акутна тровања). Инфективне болести, као што су колера, тифозна грозница, дијареја, повраћање, обољења коже и бубрега узрокована су, често, загађеном водом. Здравље људи у многоме зависи и од контаминената у храни биљног и анималног порекла која су у храну доспела из воде. Загађена вода значајно утиче на живи свет мора (рибе, мекушци, ракови), који се користе у исхрани људи (39,53).

Извори и степен загађења животне средине у великој мери зависе од отпадних вода из домаћинства и индустрије, пораста популације, употребе вештачких ђубрива у пољопривредној

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

производњи, као и недовољно добро организованог система менаџмента везаног за управљање отпадом. Сматра се да 75-80% загађења воде долази из воде из домаћинстава и индустријског отпада, односно прераде шећера, текстила, производње пестицида, вештачких ђубрива, производње папира итд. Загађена вода река, језера има често непријатан мирис, а у њој је редукована и количина флоре и фауне. То је и разлог што се 80% светске популације суочава са озбиљним претњама везаним за сигурност воде (water сецурити) (23,39).

У води могу да се нађу вируси, бактерије, паразити и гљивице, који могу да буду узрок обољења људи (54,55,56). Најважније биолошке опасности по здравље људи приказани су у табели 3.

Табела 3. Доказани и потенцијални микроорганизми у води (прилагођено према 55)

Микроорганизми	Доказани	Потенцијални
Вируси	<i>Adenovirus</i> 40 i 41, <i>Avipolyomavirus</i> <i>Enterovirus</i> A–D, <i>Hepatitis</i> A i E <i>Norovirus</i> G1 i G2, <i>Rotavirus</i> A <i>Sapovirus</i> G1	<i>Mamastrovirus</i> 1, <i>Orthoreovirus</i> C <i>Mimivirus</i> , <i>Mamavirus</i>
Бактерије	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Campylobacter coli</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella enterica</i> <i>Shigella sonnei</i> , <i>Vibrio cholerae</i> <i>Legionella longbeacheae</i> , <i>Legionella</i> <i>micdadei</i> , <i>Legionella pneumophila</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7, NTM (non-tuberculous mycobacteria), <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Arcobacter</i> <i>butzleri</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Clostridium</i> <i>difficile</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> , ARB (<i>Afipia</i> , <i>Bosea</i> , <i>Parachlamydia</i> spp., <i>Coxiella</i> <i>burnetii</i>), <i>E. coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Протозое	<i>Cryptosporidium hominis</i> , <i>C. parvum</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> , <i>Giardia</i> <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Acanthamoeba</i> T4, <i>Balamuthia mandrillaris</i> , <i>Naegleria</i> <i>fowleri</i>	<i>Blastocystis hominis</i> , <i>Acanthamoeba</i> spp. <i>Vahlkampfia</i> spp., <i>Vannella</i> spp., <i>Vermamoeba vermiformis</i>
Гљивице	Microsporidia (npr. <i>Encephalitozoon</i> <i>bieneusi</i> , <i>E. intestinalis</i>)	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus</i> <i>terreus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida</i> <i>parapsilosis</i> , <i>Exophiala dermatitidis</i>

Неки тешки метали су неопходни у очувању здравља људи, али је много већи број оних који су штетни. У животну средину тешки метали доспевају природним путем, али и антропогеном активношћу. Различите врсте индустрија (електро и метална индустрија) најчешће генеришу отпад који долази у животну средину. Тешки метали могу да се нађу и у атмосфери (жива, олово), одакле доспевају у површинске воде. Површинске воде се користе за наводњавање, а одатле контаминенти долазе у ланац хране. Здрављу људи прети 35 метала, од којих су 23 тешки метали који имају различите ефекте на здравље људи. Према Међународној агенцији за испитивање канцера анорганског арсена и кадмијума су уврштени у групу канцерогена. Арсен изазива оштећења и рак коже, а кадмијум делује на функцију бубрега и може да изазове и канцер овог органа. На болести срца и садржај холестерола у крви утиче антимоно, анемије може да узрокује олово, жива утиче на оштећење бубрега и јетре, бакар дигестивног тракта. Највећу забринутост, када се говори о контаминацији воде тешким металима, изазивају арсен, кадмијум, олово, хром, бакар, жива и никл, углавном због њиховог великог садржаја у води за пиће и њиховог значаја по здравље људи. Посебно се изучавају негативни ефекти на здравље људи

арсена, кадмијума, олова и живе, па је и њихов садржај предмет прописа који дефинишу њихову максималну дозвољену количину у води и појединим намирницама (39,53,54).

Пестициди су хемијске материје намењене за сузбијање макро и микроорганизма за које се сматра да у одређеним условима могу да буду штетни за биљни и животињски свет. Према намени и дејству на штетне паразите, пестициди припадају наведеним групама: акарициди, инсектициди, фунгициди, акарофунгициди, инсектофунгициди, нематоциди и фунгициди за третирање земљишта, средства за третирање семена, хербициди, арборициди, дефолијанти, десиканти, молусциди-лимациди, родентициди, синергисти, репеленти и регулатори раста биљака. Пестициди припадају различитим групама једињења, међу којима су најзначајнији хлоровани угљоводоници, органофосфати и карбамати. Хлоровани угљоводоници и органофосфати делују негативно на људско здравље са различитим знацима тровања, односно појавом различитих обољења. Пестициди могу да доспеју у воду и одатле улазе у ланац хране (54).

Када у водене токове доспеју фосфор и азот, односно фосфати и нитрати из вештачког ђубрива и друге штетне материје, потпомаже се раст водених алги које троше велике количине кисеоника, које на крају падају испод количине потребне за живи свет мора, посебно риба. Тако настају тзв. "мртве зоне" у којима нема живота. Мртве зоне у морима настају најчешће у релативно затвореним водама (Мексички залив, Балтичко море) и у приобалним деловима мора и океана. Из истог разлога и на исти начин настају и мртве реке, реке у којима нема живих бића. Таква је у Србији Борска река. Она се сматра и најзагађенијом реком у свету. Налази се у Борском базену (РТБ-Бор) и садржи велике количине тешких метала. У ову реку уливају се без пречишћавања и отпадне воде из града Бора. Низводно се ова река спаја са Пливањском и Равном реком, формирајући Белу реку која се улива у Тимок, притоку Дунава. Нажалост, у Србији има више мртвих река (нпр. Ветерница, Врањска, Србинска река-притоке Јужне Мораве). У Европи је прва мртва река била Рајна, која је постала канал отпадних вода индустрије. Међутим, захваљујући строгом придржавању усвојених законских норми живот у ову реку се вратио. Сличних случајева било је и са другим рекама Европе (Сена-Париз) (29,42).

Данас живимо у време геолошке епохе антропоцена која је почела између 1947. и 1964. године прошлог века. Као један од елемената који јасно одваја антропоцен од холоцена је налаз пластике у стенама. Ово време је познато као и "атомско доба", али би му сасвим одговарао и назив "доба пластике". Први природни полимер, целулоид, појавио се 1870. године, а први вештачки (бакелит), означен као материјал за "хиљаду намена", комерцијализован је 1911. године. Најлон се појавио за време Другог светског рата. Данас се у свету произведе 322 милиона тона пластике (16 типова), а њен отпад износи 52 kg по становнику годишње у свету (Србија 45 kg по становнику годишње). Пластика данас има вишеструку намену у различитим областима људског деловања. Према величини пластичног отпада који налазимо у природи, разликују се: нанопластика < 1 μm (дијаметар), микропластика (1 mm- 5 mm), мезопластика (5 mm - 200 mm) и макропластика (преко 200 mm). Само се нанопластика не производи као таква, већ настаје физичком разградњом микропластике. Сва четири облика пластике се налазе у животној средини, па и у води. Пластика је утврђена код 693 врсте морских организама (2007-2013. године) и то код 40% морских сисара, 100% корњача, 46% морских птица. Просечна количина пластике у животној средини процењена је на 4,7-12,7 милиона тона, а до 2025. године очекује се количина отпада пластике од 150 милиона тона. До 2050. године маса пластике у морима и океанима биће већа него маса свих морских организама. Процењује се да је у водама света било 5,25 трилиона комада пластике (2007-2013. године), не рачунајући нанопластику, а 2014. године између 15 и 51 трилион комада. Морске струје у морима и океанима формирају "острва пластике". Највеће острво пластике је у Тихом океану, које има површину од 1,6 милиона km² (18 пута веће од површине Србије), а маса му је 80.000 тона. Пластика је нађена и у дубинама мора од 10.000 m. Због својих особина (перзистентност, разноликост, убиквитарност, хемијска инертност) представља један од најтежих, ако не и натеже решив, проблем у заштити животне средине. У Европи се мање од 50% пластике (2005-2016. године) рециклира или користи као гориво. Сва остала количина пластике заврши неконтролисано у природи. Штетност пластике за здравље људи везује се за штетне мономере, продукте који настају њеним сагоревањем (РАН, РСВ). Највећа пажња данас се поклања нано- и микропластици, које улазе у ланац хране и могућности њиховог штетног ефекта

за здравље људи. Мишљења о штетности пластике, посебно нанопластике, за здравље људи су данас неусаглашена и, често, противуречна (57-62).

11. Уместо закључка

Вода је опште наследно добро, чију вредност морају сви познавати. Задатак је сваког од нас да је економично и брижљиво користи (Европска повеља о води).

Оно што је ретко, скупо је. Вода као најважнија ствар на свету, напротив, нема цену (Платон, 427-347 године п.н.е.).

Ко не брине о води, не брине за боље сутра (ирска пословица).

Уколико постоји чаролија на овој планети, она је у капи воде (Loren Eiseley, 1907-1977).

Литература

1.https://sr.wikipedia.org/wiki/osnovni_elementi. 2.Dooge JCI, 2018, Fresh surface water, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Center for Water Resources Research, University College Dublin, Ireland, 1, 1-42. 3.https://sr.wikipedia.org/sr.el/poreklo_vode_na_zemlji. 4.Oro J, 1961, Comets and the formation of biochemical compounds on the primitive Earth, Nature, 190, 389-390. 5.Appel PWU, Fedo CM, Moorbath S, Myers JS, 1998, Recognizable primary volcanic and sedimentary features in a low-strain domain of the highly deformed, oldest known (~3.7-3.8 Gyr) Greenstone Belt, Isua, West Greenland. Terra Nova, 10, 57-62. 6.Ikoma M, Genda H, 2008, Origin of the ocean on the Earth: Early evolution of water D/H in a hydrogen-rich atmosphere. Icarus, 194, 42-52. 7.Pearson DG, Brenker FE, Nestola F, McNeill J, Nasdala L, Hutchison Mt, Mateveev S, Mather K, Silversmit G, Schmitz S, Vekemans B, Vincze L, 2014, Hydrous mantle transition zone indicated by ringwoodite included within diamond, Nature, 507, 221-224. 8.Keppler H, 2014, Geology: Earth's deep water reservoir, Nature, 507, 174-175. 9.<https://sh.wikipedia.org/wiki/Voda>. 10.Küppers M, O'Rourke L, Bockelée-Morvan D, Zakharov V. , Lee S, von Allmen P, Carry B, Teyssier D, Marston A, Müller T, Crovisier J, Barucci MA, Moreno R, 2014, Localized sources of water vapour on the dwarf planet (1) Ceres, Nature 505, 525-527. 11.Cook CJ-R, Gutro R, Brown D, Fohn J, 2013, Hubble Sees Evidence of Water Vapor at Jupiter Moon, NASA, Pristupljeno 12.12.2013. 12.https://en.wikipedia.org/wiki/Water_distribution_on_Earth. 13.<https://bs.wikipedia.org/wiki/Voda> 14.Gigović Lj, 2014, Geostrategijski značaj pitke vode, Globus, 30/7, 71-82. 15.Bajrami Š, 2017, Bezbednost vode u 21. veku, Vojno delo, 128-152. 16.Pimentel D, Berger B, Filiberto D, Newton M, Wolfe B, Karabinakis E, Clark S, Poon E, Abbott E, Nandagopal S, 2004, Water Resources: Agricultural and Environmental Issues, BioScience, 54(10), 909-918. 17.Molden D, 2007, Water for food, Water for life: A Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture. Earthscan/IWMI. 18.Ničiforović-Babac O (urednik), 2009, Ilustrovana istorija sveta-rane civilizacije od preistorije do 900 p.n.e. Beograd, Mladinska knjiga. 19.Mrdić N, 2007, Snadbevanje vodom, u Antici na prostoru Gornje Mezije i jugoistočnog dela Donje Panonije, Arheologija i prirodne nauke, Posebna izdanja 4, Beograd, 1-45. 20.Čelebi E, 1967, Putovanje po jugoslavenskim zemljama (prevod Hazim Šabanović), Svjetlost, Sarajevo, 1-671. 21.http://www.beograd.rs/lat/gradska-vlast/2144-jkp-beogradski-vodovod-i-kanalizacija_3/ 22.Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome (FAO), 2003, Review of world water resources by country, Annex 2 - Water resources per country and territory, 78-82. 23.Kreamer KD, 2012, The Past, Present, and Future of Water Conflict and International Security, Journal of Contemporary Water Research & Education 149(1), 88-96. 24.Baltić ŽM, Marković R, 2017, Hrana-prošlost, sadašnjost, budućnost, 28. Savetovanje veterinarar Srbije, Zlatibor, Zbornik radova i kratkih sadržaja, 21-33. 25.Milivojević M, Radaković S, 2018, Voda na planeti zemlji, Sektor za preventivnu medicinu VMA, Vojnomedicinska akademija, Beograd. 26.Borić D, Dimitrijević V, 2007, Apsolutna hronologija i stratigrafija Lepenskog vira, Beograd, Starinar, LVII, 9-55. 27.Gavela B, 1962-63, O paleolitiku Srbije. Arheološki vesnik, 13-14, 85-99. 28.United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), 2016, The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Rome, Italy: FAO. 29.Kilibarda N, Baltić ŽM, Teodorović V, Dimitrijević M, Karabasil N, 2008, Tama i sjaj ribarstva kao izvora hrane na početku 21. veka, 20. Savetovanje veterinarar Srbije, Zlatibor, 34-50. 30.<https://en.wikipedia.org/wiki/Watermill>. 31.Mišić S, Subotin-Golubović T, 2003, Svetoarhandelovska hrisovulja, Istorijski institut, Beograd, 100. 32.Mišić S, 1992, Unutrašnje vode i njihovo korišćenje u srednjovekovnoj Srbiji, Dodatak istorijskom glasniku 1-2, Beograd, 1990-1992, 50-51. 33.Milićević M,

2005, Kneževina Srbija (fototipско издање), Beograd, Book & Marso. **34.**<https://sr.wikipedia.org/sr-el/Hidroelektrana>. **35.**<http://www.enciklopedija.hr>. **36.**John H, 1998, A history of water in modern England and Wales, Manchester University Press. **37.**Hadfield C, 1986, World Canals: Inland Navigation Past and Present, David and Charles. **38.**<https://sr.wikipedia.org/sr-el/Наводњавање> **39.**Haseena M, Malik FM, Javed A, Arshad S, Asif N, Zulfiqar S, Hanif J, 2017, Water pollution and human health, Environmental Risk Assessment and Remediation, (3), 16-19. **40.**Statistički Godišnjak RS, 2017, Beograd, Republički zavod za statistiku. **41.**<https://sh.wikipedia.org/wiki>. **42.**<https://sh.wikipedia.org/wiki>. **43.**<https://sr.wikipedia.org>. **44.**Jiriček K, 1923, Istorija Srba (preveo i dopunio Jovan Radonić), Treća sveska (Kulturna istorija, prvi deo), Beograd, Izdavačka knjižnica Gece Kona. **45.**Stanković S, 2009, Banje Srbije, Beograd, Zavod za udžbenike. **46.**https://sr.wikipedia.org/sr-el/Бањски_туризам. **47.**Milosavljević J, 2006, Termalne i termomineralne vode-neiskorišćeno bogatstvo, Planeta, broj 20, godina IV (<http://www.planeta.org.rs/20/1/hidrogeologija.htm>). **48.**Stojiljković D, Nešković-Zdravić V, Šekularac G, 2003, Zdravstveni aspekti kvaliteta flaširanih voda, Letopis naučnih radova, 27, 1, 185–188. **49.**https://sr.wikipedia.org/sr-el/Минерална_вода. **50.**Petrović MT, Zlokolica-Mandić M, Veljković N, Papić JP, Poznanović MM, Stojković SJ, Magazinović MS, 2012, Makro- i mikroelementi u flaširanim vodama i vodama iz javnih vodovoda u Srbiji, Hemijska industrija, 66 (1), 107-122. **51.**Zakon o vodama, Službeni glasnik RS broj 30/10. **52.**Zlatanović S, 2009, Legislativa u sektoru voda Srbije i harmonizacije sa evropskom direktivom, seminarski rad, Pravni fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2. **53.**Mandour RA, 2012, Human health impacts of drinking water (surface and ground) pollution Dakahlyia Governorate, Egypt, Applied Water Science, 2, 157-163. **54.**Baltić ŽM, Teodorović V, 1997, Higijena mesa riba, rakova i školjki, Veterinarski fakultet, Beograd, 1-247. **55.**Ashbolt JN, 2015, Microbial contamination of drinking water and human health from community water systems, Current environmental health reports, 2(1), 95-106. **56.**Betts R, 2014, Microbial Update Water, International Food Hygiene, 25 (5), 12-13. **57.**Worm B, Lotze KH, Jubinville I, Wilcox C, Jambeck J, 2017, Plastic as a Persistent Marine Pollutant, Annual Review of Environment and Resources, 42, 1-26. **58.**Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, Narayan R, Lavender Law K, 2015, Plastic waste inputs from land into the ocean. Science 347, 768–713. **59.**Waters CN, Zalasiewicz J, Summerhayes C, Barnosky AD, Poirier C, Gałuszka A, Cearreta A, Edgeworth M, Ellis CE, Ellis M, Jeandel C, Leinfelder R, McNeill JR, deB. Richter, Steffen W, Syvitski J, Vidas D, Wapreigh M, Williams M, Zhisheng A, Grinevald J, Odada E, Oreskes N, Wolfe PA, 2016, The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene, Science 351, 137. **60.**Galloway TS, Lewis CN, 2016, Marine microplastics spell big problems for future generations, Proceedings of the National Academy of Sciences, 113, 2331–2333. **61.**Cole M, Galloway TS, 2015, Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae, Environmental Science of Technology, 49, 14625–14632. **62.**Čirić J, Janjić J, Bošković M, Đorđević J, Glišić M, Glamočlija N, Popović M, Marković R, Baltić ŽM, 2018, Nanoplastika-razlog za brigu po zdravlje ljudi i vodene organizme, Zbornik kratkih sadržaja, 23. godišnje savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (Bosna i Hercegovina) sa međunarodnim učešćem, Teslić, Banja Vrućica, 6-9. juna 2018. godine, 91-93.

Захвалница

Овај рад је финансиран средствима Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије у оквиру пројекта “Одабране биолошке опасности за безбедност/квалитет хране анималног порекла и контролне мере од фарме до потрошача“, 2011-2018, бр.пројекта ТР 31034 и “Утицај квалитета компонената у исхрани ципринида на квалитет меса, губитке и економичност производње”, бр. пројекта ТР 31011.

ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ II

**АКТУЕЛНА ЕПИЗООТИОЛОШКА
СИТУАЦИЈА У СРБИЈИ И РЕГИОНУ**

ЕПИЗООТИОЛОШКА СИТУАЦИЈА У СРБИЈИ У 2017. И 2018. ГОДИНИ

THE EPIZOOTIOLOGICAL SITUATION IN SERBIA IN 2017 AND 2018 YEARS

*Будимир Плавишић¹, Бобан Ђурић¹, Саша Остојић¹, Јелица Узелац¹,
Тамаш Петровић², Емина Милакара¹*

¹Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде, Управа за ветерину;

²Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад

Кратак садржај

Општи, пасивни и активни епизоотиолошки надзор домаћих и дивљих животиња, од суштинског је значаја за очување здравља популације животиња, јавног здравља, напретка у пољопривредној производњи и руралном развоју. Здравствени надзор животиња, базиран на програмима циљаног мониторинга, клиничких и лабораторијских испитивања, континуираној едукацији и програмима јачања свести код узгајивача и других укључених лица, представља једну од основних активности националне ветеринарске службе и обезбеђује јој улогу јавног добра. Општи стандард у погледу заштите здравља и добробити животиња, представљају смернице и препоруке Светске организације за здравље животиња (ОИЕ), која је дефинисала листу болести обавезних за пријављивање са 117 болести животиња, инфекција и инфестација у 2018. години. Адекватно спровођење епизоотиолошког надзора на подручју целе земље, обезбеђује благовремено откривање заразних болести и брзо успостављање контролних мера у циљу спречавања ширења и сузбијања болести, односно ефикасност система брзог упозоравања и реаговања.

У Републици Србији постоји развијен систем здравственог надзора који чине модеран правни оквир у области ветеринарства, ефикасна мрежа ветеринарских организација, лабораторија и епизоотиолошке службе и буџетска подршка за превенцију и контролу приоритетних болести, уз успостављен систем евидентирања заразних болести које су по закону обавезне за пријављивање. У односу на нарочито опасне заразне болести, епизоотиолошку ситуацију у Србији карактерисала је потпуна стабилизација епизоотије болести плавог језика из претходног периода, уз спровођење вакцинације на подручју целе земље. Епизоотија нодуларног дерматитиса из 2016. године у потпуности је заустављена уз системско спровођење вакцинације свих говеда у целој земљи, без евидентираних случајева болести након октобра 2016. године. Такође, нису забележени случајеви класичне куге свиња и атипичне куге живине, док је забележен по један случај беснила у 2017. и 2018. години.

Када су у питању ензоотске болести, вишегодишњи тренд смањења броја жаришта и позитивних случајева, забележен је код више болести: бруцелоза говеда (5 жаришта са укупно 8 позитивних животиња), бруцелоза оваца и коза (3 жаришта, 45 позитивних животиња), туберкулоза говеда (7 жаришта, 8 позитивних говеда) и ензоотска леукоза говеда (7 жаришта, 12 позитивних животиња). Кју грозница утврђена је у 14 газдинстава, са 27 случаја болести, док је трихинелоза евидентирана у 95 газдинстава са 111 позитивних животиња.

Међутим, постоји стална опасност од поновног појављивања или повећања инциденције код неких болести животиња (класична куга свиња, нодуларни дерматитис, слинавка и шап, атипична куга живине, авијарна инфлуенца, беснило), повећање преваленце ендемских болести и инфекција (бруцелоза, туберкулоза, салмонелоза, кју грозница) али и појава неких егзотичних болести које су присутне на европском континенту (афричка куга свиња, куга малих преживања, богиње оваца и богиње коза), што захтева стално јачање капацитета ветеринарских служби у

земљи и унапређење сарадње са произвођачима, индустријом и другим надлежним службама, и заинтересованим лицима, укључујући ловце.

Искуство из земаља које су се суочиле са избијањем и ширењем афричке куге свиња, указује да је то болест од највећег значаја за здравље свиња и сточарство у целом региону, с обзиром на епизоотиолошке, економске и социјалне последице њеног појављивања како код дивљих тако и код домаћих свиња. До августа 2018. године, у Европи је забележена ова болест у Русији, Грузији, Украјини, Белорусији, Молдавији, Пољској, Летонији, Литванији, Естонији, Чешкој, Мађарској и Румунији, са тенденцијом прогресивног ширења. Ризик од ширења болести на неинфицирана подручја је велики, посебно када су у питању дивље свиње и газдинства која држе свиње на отвореном или са ограниченим биосигурносним мерама. Међутим, ризик од појављивања код фармских свиња које спроводе адекватне биосигурносне мере није велики, управо због примене контролних мера на самим фармама.

Од посебног значаја је спровођење мера спречавања уношења вируса афричке куге свиња у Србију, на шта се национална служба Србије припрема већ дуже време. Припремљен је робустан правни оквир који се односи на спровођење мера чији је циљ спречавање појављивања, ширења и сузбијања афричке куге свиња, и то:

1. Закон о ветеринарству („Службени гласник РС” 91/05, 30/10 и 93/12);
2. Правилник о мерама за рано откривање, дијагностику, спречавање ширења, сузбијање и искорењивање заразне болести афричке куге свиња („Службени гласник РС” 32/10);
3. Програм мера здравствене заштите животиња („Службени гласник РС” 11/18);
4. Правилник о утврђивању плана управљања кризним ситуацијама (“Службени гласник РС”, 11/2018);
5. Оперативни приручник за спровођење кризног плана за контролу и сузбијање заразне болести афричка куга свиња (119-01-260/2018-05 од 26.4.2018. године) и
6. Наредба о предузимању мера за спречавање уношења заразне болести Афричке куге свиња (*Pestis Suum Africana*) у Републику Србију („Службени гласник РС” 40/14).

Теренска ветеринарска и епизоотиолошка служба, у сарадњи са ветеринарском инспекцијом, морају обављати интензиван надзор фарми свиња како би се подигао ниво превентивних и биосигурносних мера и спречило уношење вируса афричке куге свиња у популацију домаћих свиња, са несагледивим последицама по сточарску и прерађивачку индустрију. Од највећег значаја је спречити директан и индиректан контакт са дивљим свињама, што се посебно односи на ловце, љубитеље природе и друга лица која посећују ловишта или природу у инфицираним државама. Најчешћи начин уношења вируса афричке куге свиња у земље које су слободне од ове болести јесте путем контакта са дивљим свињама или преко контаминираних хране пореклом од дивљих или домаћих свиња у зараженим подручјима, и преко отпадака од хране. Због тога је потребно не само избегавати одлазак у ова подручја, већ посебно набављати храну пореклом од свиња, нарочито традиционалне производе који нису прошли термичку обраду, конзумирати је и уносити у Србију.

Слично као и код класичне куге свиња, приоритет је дат спровођењу биосигурносних мера и добре фармске праксе на свим газдинствима са свињама, као и у унутрашњем и међународном промету, забрану исхране свиња помијама, спровођење адекватних мера у ловиштима укључујући и уклањање лешева и споредних производа животињског порекла, као и едукацији и јачању свесности код циљних група, укључујући узгајиваче и ловце. Водичи и препоруке припремљени су, дистрибуирани и објављени на интернет страницама Управе за ветерину: <http://www.vet.minpolj.gov.rs/srb/africka-kuga-svinja>

Са друге стране, ова болест захтева укључивање других служби и ревносно обављање послова из надлежности према упутствима ветеринарске службе, како би се ризик од уношења вируса афричке куге свиња свео на минимум, односно превентивне и контролне мере спроводиле на адекватан начин.

Кључне речи: епизоотиолошки надзор, пријављивање болести, систем брзог упозоравања и реаговања, легислатива.

**BRUCELOZA U HRVATSKOJ S POSEBNIM OSVRTOM
NA BRUCELOZU U MORSKIH SISARA**

**BRUCELLOSIS IN CROATIA WITH A SPECIFIC REVIEW
ON BRUCELOSIS IN MARINE MAMMALS**

Željko Cvetnić

Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

Kratak sadržaj

Bruceloza je zarazna bolest životinja i ljudi. U životinja se najčešće manifestuje pobačajem, kroničnog je toka ili je latentna infekcija. Jedna je od najopasnijih bolesti koje se sa životinja prenose na ljude (zoonoza). U 2015. godini izvršeno je 916.738 seroloških, 448 bakterioloških i 330 molekularnih pretraga na brucelozu u različitim životinjskih vrsta. Etiološki je bolest dokazana u jednom uzgoju svinja (*B. suis* bv. 2). Tijekom 2016. serološki je pretraženo 645.694 uzoraka krvi životinja, bakteriološki 738 uzoraka i molekularno 893 uzorka. Bruceloza je potvrđena u jednom uzgoju svinja (*B. suis* biovar 2) i jednom uzgoju ovaca (*B. melitensis*). U godini 2017. serološki je pretraženo 644.619 uzoraka krvi, bakteriološki 846 i molekularnim pretragama 465 uzorka. Bruceloza je dokazana u 16 svinja (*B. suis*), a *B. melitensis* u dva uzgoja ovaca i koza. Prva istraživanja bruceloze u delfina u Republici Hrvatskoj započela su u leto 2015. godine. *Brucella* sp. izdvojena je iz limfnih čvorova dobrog delfina (*Tursiops truncatus*) koji je nađen uginut na području Poreča. To je prvi dokaz bruceloze delfina u Jadranskom moru. Izolovana je i identifikovana zoonotska *Brucella ceti* soj ST27 koji je prvi puta dokazana u Evropi. Program kontrole i iskorenjavanja bruceloze u Republici Hrvatskoj usklađen je s evropskim zakonodavstvom i provodi se na celokupnoj populaciji ovaca i koza, goveda te svinja od 2014. godine. Konačni cilj ovog programa je eradicacija bruceloze te ispunjenje uslova da Republika Hrvatska stekne status zemlje članice službeno slobodne od bruceloze ovaca i koza te goveda.

Ključne riječi: Bruceloza, domaće životinje, delfin, Hrvatska

Uvod

Bruceloza je kontagiozna zarazna bolest velikog broja životinja i ljudi. U životinja se najčešće manifestuje pobačajem, kroničnog je toka ili je latentna infekcija. Jedna je od najopasnijih bolesti koje se sa životinja prenose na ljude (zoonoza). Danas je poznato jedanaest vrsta brucela. Čovek se najčešće inficira vrstama *Brucella* (*B.*) *melitensis*, ređe *B. abortus* i *B. suis*, retko vrstom *B. canis*, a bolest mogu uzrokovati *B. ceti* i *B. pinnipedialis* (1). Prema procjeni Svetske zdravstvene organizacije (SZO), godišnje se zabeleži oko 500.000 slučajeva bruceloze kod ljudi, iako je ta brojka u stvarnosti možda 25 puta veća (2,3). U Hrvatskoj je bruceloza u goveda (*B. abortus*) nije zabeležena još od 1964. godine. Bruceloza u koza i ovaca uzrokovana vrstom *B. melitensis* sporadički se pojavljuje, takvi slučajevi zabeleženi su u 2004., 2005., 2008. i 2010. godini (4,5). Proširenost bruceloze uzrokovane vrstom *B. melitensis* u Bosni i Hercegovini ukazuje na stalnu pretnju širenja bolesti u Hrvatsku (6,7,8) *B. suis* je zabeležena u krmača tokom pobačaj gdje se nerastovi koriste u prirodnom pripustu (9). Prva istraživanja bruceloze u delfina u Republici Hrvatskoj započela su u leto 2015. godine. *Brucella* sp. je izolovana iz limfnih čvorova dobrog delfina (*Tursiops truncatus*) koji je nađen uginut na području Poreča. To je prvi dokaz bruceloze delfina u Jadranskom moru. Izolovana je i identifikovana *Brucella ceti* soj ST27 koji je prvi puta dokazan u Evropi, što može predstavljati značajnu pretnju zdravlju ljudi (10,11).

Program kontrole i iskorenjivanja bruceloze u Republici Hrvatskoj u domaćih životinja usklađen je s evropskim zakonodavstvom i provodi se na celokupnoj populaciji ovaca i koza, goveda te svinja od 2014. godine. Cilj ovoga rada je prikazati stanje s obzirom na brucelozu u domaćih životinja u Republici Hrvatskoj kao i nalaz *B. ceti* u delfina na području Jadranskog mora.

Materijal i metode

Serološke pretrage

Tokom 2015. godine pretraženo je 916.738 uzoraka krvi (644.581 krvi koza i ovaca, 219.905 krvi goveda, 6.722 krvi svinja, 45.530 ostalih pretraga na brucelozu (*B. ovis* i drugo), 2016. godine pretraženo je 645.694 uzoraka krvi (413.685 krvi ovaca i koza, 211.766 krvi goveda, 7.409 krvi svinja, 12.834 ostalih pretraga na brucelozu (*B. ovis* i drugo), 2017. godine pretraženo je 644.619 uzoraka krvi (433.181 krvi ovaca i koza i 199.528 krvi goveda, 2.081 krvi svinja, 9.829 ostalih pretraga na brucelozu (*B. ovis* i drugo).

Za serološke pretrage na brucelozu (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) koristili smo Rose bengal test (RBT), a sve pozitivne i sumnjive serološke reakcije ovim testom ponavljane su i potvrđivane reakcijom vezanja komplementa (RVK), a ELISA testom (*B. suis*). Ponekad je za dokazivanje kao potvrdni test korišten i brucelinski test. Testovi su korišteni prema uputstvima OIE-a (12).

Bakteriološke pretrage

Tokom 2015. godine bakteriološki je na brucelozu obrađeno je 448 uzroka (285 porijeklom iz goveda, 99 iz ovaca, 27 iz koza i 37 iz svinja), 2016. godine 738 uzoraka (571 iz goveda, 94 iz ovaca, 45 iz koza i 18 iz svinja) i 2017. godine 846 uzoraka (656 iz goveda, 53 iz ovaca, 60 iz koza i 77 iz svinja iz svih Županija u Republici Hrvatskoj. Materijal je u većini slučajeva bio od domaćih životinja koje su pobacile pa su dostavljani pobačeni plodovi i posteljice ili su u njih utvrđene pozitivne serološke reakcije na brucelozu. Prilikom klanja serološki pozitivnih životinja uzimani su uzorci limfnih čvorova, jetra, slezena i reproduktivni organi. U periodu od 2015. do 2018. obrađen je i materijal 30 delfina na brucelozu iz različitih područja na Jadranskom moru.

Obrađeni materijal smo nasađivali na selektivne hranjive podloge i to na krvni agar, *Brucella* agar i modifikovanu selektivnu hranjivu podlogu Farell. Ploče s nasađenim materijalom inkubirali smo u termostatu pri normalnoj atmosferi na temperaturi od 37°C i uz dodatak 5-10% CO₂. Rast kolonija promatra se u dnevnom razmacima, a obično je vidljiv 3-7 dana. Izolate smo identifikovali na bazi morfologije kolonija (sitne, konveksne, prozirne i hrapave (R), rastu na CO₂, produkciji H₂S, rastu na podlogama s dodatkom 20µg/ml tionina i bazičnog fuksina te aglutinacije s monospecifičnim antiserumima (12,13,14).

Molekularne pretrage

Tokom 2015. godine izvršeno je 330, 2016. 893, a u 2017. godini 465 različitih molekularnih pretraga materijala porijeklom iz goveda, koza, ovaca, svinja i dupina.

Izolovanje genomske DNK *Brucella* sp., iz izolata provodili smo komercijalno dostupnim kitom QIAampDNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Za potrebe pretrage koristili smo 2 ili 5 µL nadtaloga. Pripremljeni uzorci obrađuju se u uređaju (QIAcube (QIAGEN, Hilden, Njemačka) koji vrši automatizovano izolovanje DNA. Dokaz *Brucella* sp u izdvojenim izolatima dokazali smo umnažanjem dela genoma koji kodira sintezu proteina BCSP-31. Veličina produkta umnažanja iznosi 443 bp (parova baza) (15). Koristili smo prajmere BRU-UP (GGG CAA GGA AGA TTT) i BRU-LOW (CGG CAA GGG TCG GTG TTT) (Qiagen, U.S.A.). Pretragom "Bruce-ladder" utvrđujemo o kojoj se vrsti roda *Brucella* radi, a uključujući i cepne sojeve (*B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 i *B. melitensis* Rev1). Koristili smo 8 parova prajmera u jednoj reakcijskoj mešavini. Pripadnike pojedine vrste smo razlikovali na osnovi karakterističnih mutacija, insercija i delecija u njihovim genomima (16). Proizvode umnažanja analizirali smo kapilarnom elektroforezom na uređaju QIAxcel (QIAGEN, Hilden, Njemačka) uz biljeg veličine 100 - 3000 bp (QIAGEN, Hilden, Njemačka).

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

Rezultati

Rezultati seroloških pretraga

Tijekom istraživanog perioda u 2015. godini pretraženo je 219.905 krvi goveda u 27.603 stada, serološki su bila sumnjiva 23 goveda u 19 stada. Iste godine pretraženo je 544.581 krvi ovaca i koza u 19.053 stada, serološki su pozitivne reakcije utvrđene 44 ovce/koze u 28 stada. Od 6.722 pretraženih krvi svinja pozitivne reakcije bile su utvrđene u 61 svinje.

Godine 2016. godine pretraženo je 211.766 krvi goveda u 25.411 stada, serološki su utvrđene sumnjive reakcije u 20 goveda u 10 stada. Iste godine pretraženo je 413.689 krvi ovaca i koza u 19.285 stada, serološki su pozitivne reakcije utvrđene u 8 ovaca/koza u 8 stada. Od 7.409 pretraženih krvi svinja serološki pozitivne reakcije utvrđene su u 22 svinje.

Godine 2017. pretraženo je 199.528 krvi goveda u 23.001 stada, a sumnjive reakcije utvrđene su u 2 goveda iz 2 stada. Od 2.081 pretraženom krvi svinja pozitivne reakcije su utvrđene u 72 svinje. Provedbom brucelinizacije u svih serološki sumnjivih goveda utvrđene su negativne reakcije jer se radilo o lažno pozitivnim reakcijama (Tablica 1. i 2.).

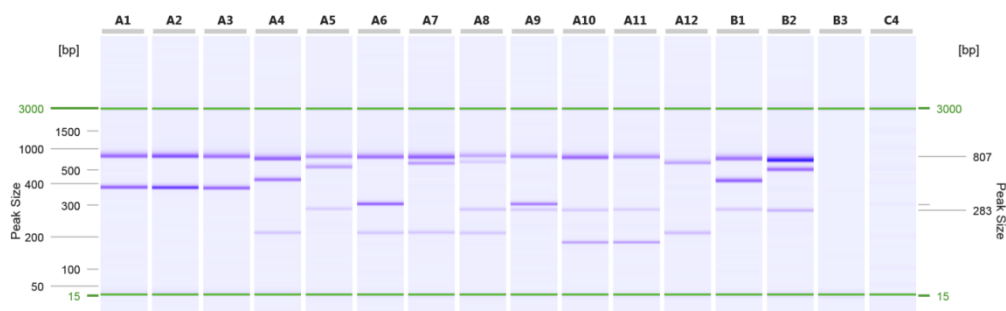
Tijekom 2016. godine utvrđeno je 16.927 (71,7%), a 2017. godine 21.759 (92,1%) stada ovaca i koza služno slobodnih u Republici Hrvatskoj (Tablica 1).

Tablica 1. Uporedni prikaz stada ovaca i koza službeno slobodnih od bruceloze (*B. melitensis* po Županijama) u Republici Hrvatskoj

Županija	Stada ovaca i koza službeno slobodna od <i>B. melitensis</i> 2016 godina		Stada ovaca i koza službeno slobodna od <i>B. melitensis</i> 2017 godina	
	Broj stada	%	Broj stada	%
Bjelovarsko - bilogorska	2138	79,4	2366	89,5
Brodsko - posavska	527	81,5	637	97,0
Dubrovačko - neretvanska	161	48,2	170	50,7
Grad Zagreb	77	63,1	84	63,6
Istarska	581	67,3	699	82,0
Karlovačka	1009	79,2	1213	89,9
Koprivničko - križevačka	571	65,3	619	71,6
Krapinsko - zagorska	375	69,2	587	98,3
Ličko - senjska	1344	65,4	1629	75,7
Međimurska	72	51,1	108	81,2
Osječko - baranjska	1093	89,9	1217	100
Požeško - slavonska	762	82,3	865	92,2
Primorsko - goranska	427	42,2	501	48,7
Sisačko - moslavačka	2189	87,0	2410	96,9
Splitsko - dalmatinska	746	47,9	1026	69,9
Šibensko - kninska	1169	80,3	1218	83,9
Varaždinska	242	73,3	293	84,2
Virovitičko - podravska	890	85,3	967	96,6
Vukovarsko - srijemska	547	75,8	658	90,1
Zadarska	1254	60,3	1465	71,1
Zagrebačka	753	62,5	1010	84,2
UKUPNO	16 927	71,7	21 759	92,1

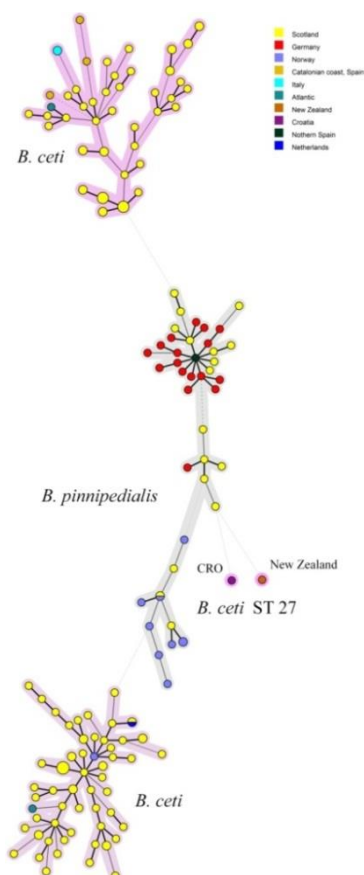
Rezultati bakterioloških i molekularnih pretraga

U 2015. godini bakteriološki je izolovana *Brucella* sp. iz svinje i iz jednog delfina, a molekularnim pretragama identifikovana je iz uzoraka svinje *B. suis* biovar 2, a iz delfina *B. ceti* ST 27 (Slika 1 i 2) (11). Godine 2016. bakteriološki je izdvojena *Brucella* sp. iz jedne svinje i jedne koze koja je bila serološki pozitivna, a molekularnim pretragama identifikovana je iz svinje *B. suis* biovar 2, a iz koze *B. melitensis*. Godine 2017. bakteriološki je izolovana *Brucella* sp. iz 16 svinja i 2 koze, a molekularnim pretragama je iz uzoraka svinja identifikovana *B. suis* biovar 2, a iz koza *B. melitensis*.



Slika 1. Multiplex PCR (Suis - ladder) (11)

Legenda: (A1 - soj 350/1, A2 - soj 350/2, A3 - soj 350/3, A4 - *B.suis* referentni soj (r.s.) bv.1, A5 - *B.suis* r.s. bv.2, A6 - *B.suis* r.s. bv.3, A7 - *B.suis* r.s. bv.4, A8 - *B.suis* r.s. bv.5, A9 - referentni soj *B. abortus* S99, A10 - r.s. *B. melitensis* 16M, A11 - r.s. *B. ovis* REO 198, A12 - r.s. *B. canis* RM 666, B1 - *B. pinnipedialis* soj, B2 - *B.ceti* soj, B3 - negativna kontrola, B4 - size marker)



Slika 2. Minimum Spanning Tree (MST) prikaz rezultata metode MLST izolovanog soja 350 uspoređenog sa sojevima dostupnim u Brucella2012 database. Sojevi su označeni prema pripadnosti vrsti *B. ceti* ili *B. pinnipedialis* te podretlu, pri čemu boje navedene u legendi označavaju pojedinu zemlju (11).

Diskusija

Epidemiološka situacija u Republici Hrvatskoj u odnosu na brucelozu u goveda uzrokovana vrstom *B. abortus* je povoljna već nekoliko desetljeća. Posljednji slučaj *B. abortus* je u Hrvatskoj potvrđen 1965. godine, a program nadzor bruceloze u goveda je usklađen s EU propisima (Direktiva 64/432/EC), a program se u Hrvatskoj provodi od 2011. godine. Višekratnim testiranjem celokupne populacije rasplodnih goveda u zemlji, a tokom provedbe ovih mera nije potvrđen niti jedan slučaj bruceloze goveda u zemlji. Republika Hrvatska je u završnoj fazi provođenja programa suzbijanja bruceloze u goveda. Trenutno je 19 članica EU slobodno od bruceloze u goveda. Predviđa se da će 2020. godine 25 članica EU (osim Portugala, Italije i Grčke), dobiti status zemlje slobodne od bruceloze u goveda pa tako i Republika Hrvatska. Često je iskorenjivanje bolesti povezano i s velikim troškovima koje dijelom sufinancira i EU (17). Republika Hrvatska (Uprava za veterinu) je 2013. godine započela, a od 2014. godine se provodi program suzbijanja bruceloze u ovaca i koza uzrokovan vrstom *B. melitensis* na celoj populaciji ovaca i koza. Poslednja dva slučaja bruceloze u ovaca i koza zabeležena su krajem 2016. i 2017. godine na granici s Bosnom i Hercegovinom. Obzirom na prisutnost bolesti u susjednoj državi, Evropska komisija je zatražila od Republike Hrvatske određivanje rizičnog područja na kojima postoji opasnost od ulaska bolesti. Odredene su opštine na kojima će se provoditi pojačani nadzor i mere u kontroli bruceloze. Takve situacije su opisane i ranijih godina (6,7,8). Problemi u vakcinisanju stada

ovaca i koza u Bosni i Hercegovini i ponovna pojava bruceloze u životinja uzrokuju pojavu bruceloze u ljudi što predstavlja problem u javnom zdravlju (18). U svinja, posebno u onih držanih ekstenzivno i u divljih svinja infekcija vrstom *B. suis* biovar 2 je i dalje prisutna. Bruceloza nije zabeležena u velim uzgojima, ali se često javlja tamo gde se koristi prirodni pripust. U periodu od 2011. do 2015. godine vršeno je istraživanje u 13 Županija u Republici Hrvatskoj, a pozitivne reakcije utvrđene su u 1,7% nerastova i u 5,3% krmača koje su pobacile. Rezultati i dalje ukazuju da je brucelozu svinja teško iskoreniti u uzgojima koji svinje drže u slobodnim i poluslobodnim uzgojima. Osobito je to izraženo gde je kontakt s divljim svinjama moguć, a kontrola bolesti je i dalje potrebna (9). Status države službeno slobodne od bruceloze dobije se tek kad je 99,8% stada bude službeno slobodno od bruceloza, tokom pet uzastopnih godina.

U nadzoru i kontroli bruceloze Evropska Unija je uvela različite propise o trgovini i promet goveda i svinja (EC 64/432), te ovaca i koza (EC 91/68), a isto tako uvela je propise o proizvodima životinjskog podrijetla, identifikovanje životinja i slično. Postoje i različite agencije koje su osnovane poslednjih godina poput Evropskog centar za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC: European Centre for Disease Prevention & Control (2005), Evropska agencija za sigurnost hrane (EFSA: European Food Safety Authority (2002)). Osim toga osnovane su različite grupe koje su sufinancirane iz programa koji pomažu iskorenjivanje bruceloze (Task Force for Monitoring Diseases Eradication (2000), Eradication programmes, expert groups (2012)). Godine 2006. uspostavljen je i EU Referalni Laboratorij koji koordinira rad svih nacionalnih laboratorija za brucelozu u Europskoj Uniji (provodi proficiencij testove, održava radionice tijekom godine i omogućuje trening osoblja te pomaže prilikom pojave bruceloze u pojedinoj zemlji članici). U EU postoji strategija u kontroli i eradikaciji bruceloze. Provođenjem zajedničke politike kontrole i suzbijanja bruceloze došlo je do smanjenja obolenja ljudi. Tokom 1999. godine utvrđeno je nešto manje od 4000, a 2011. taj broj je bio manji od 400 obolelih ljudi.

Prva istraživanja bruceloze u delfina u Republici Hrvatskoj započela su u leto 2015. godine. Tokom 2015. i 2016. obrađeno je 9, a 2017. i 2018. godine još 21 uginulih delfina koji su pronađeni na različitim lokacijama uglavnom na severnom Jadranu. *Brucella* sp. izdvojena je iz limfnih čvorova prvog dostavljenog dobrog delfina oznake 350 koji je nađen području Poreča. Izolat (broj 350) izolovan je peti dan nakon nasađivanja na standardne hranjive podloge po Farrellu pri 37°C. Dostupnim molekularnim metodama potvrđena je pripadnost soja rodu *Brucella*. Konvencionalnim PCR-om utvrđen je gen BCSP-31, a 100%-tna homologija s poznatim vrstama brucela, uključujući i vrste izolovane iz morskih sisavaca potvrđena je temeljem sekvence 16S rRNA. Identifikovanje vrste unutar roda provedeno je multipleks PCR metodom Bruce-ladder. S ciljem razlikovanja vrsta *B. ceti* i *B. pinnipedialis* korištene su dodatno kreirani prajmeri te je utvrđen profil kojim se još uvijek sa sigurnošću ne može odrediti pripadnost ni jednoj od poznatih vrsta. Stoga su nadalje započete genotipizacijske analize soja pomoću MLVA, radi utvrđivanja vrste te analiza sekvenci devet genskih lokusa metodom MLST, radi detaljnijih filogenetskih analiza i važnih epidemioloških podataka. Tek je posljednja navedena metoda dala konačan odgovor da se radi o soju *Brucella ceti* ST27. To prvi dokaz bruceloze u delfina u Jadranskom moru, a radi se o zoonotskom soju ST27 koji je prvi puta dokaz te vrste u Evropi (9,10,19).

Zaključak

U posljednjih deset godina evidentan je ogroman napredak u kontroli bruceloze, koji se manifestuje u poboljšanju strategije upravljanja i kontrolom stada (identifikovanjem životinja, promet stokom, redoviti pregled stada i drugo). Brucelozu nije lako iskoreniti, dobri rezultati su vidljivi u Francuskoj i na Cipru (potpuno iskorenjivanje bruceloze), iskorenjivanje skoro završeno u Sjeverno Irskoj, odlični rezultati u Španjolskoj, a uočena je nešto sporija eradikacija u Portugalu i Italiji te loši rezultati eradikacije bruceloze u Grčkoj.

Literatura

1. Cvetnić Ž, 2015, Bruceloza, Hrvatski veterinarski institut/Medicinska naklada, Zagreb. 2. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christiou L, Tsianos EV, 2006, The new global map of human brucellosis. *Lancet. Infect. Dis.* 6, 91-9. 3. Bosilkovski M, 2013, Human brucellosis in Republic of Macedonia – clinical experience in endemic region. Simpozij „Bruceloza u Hrvatskoj i susjednim zemljama“, HAZU, Zagreb. Str. 5-6. 4. Cvetnić Ž, Gašpar A, Listeš E, Punda-Polić V, Špičić S,

Marjanović S, Brstilo M, Labrović A, 2006, Epizootiologija bruceloze u ovaca i koza u južnoj Hrvatskoj. Vet. Stn. 37, 69-75. **5.** Špičić S, Zdelar-Tuk M, Račić I, Duvnjak S, Cvetnić Ž, 2010, Serological, bacteriological, and molecular diagnosis of brucellosis in domestic animals in Croatia. Croat. Med. J. 51, 320-6. **6.** Punda-Polić V, Cvetnić Ž, 2006, Human brucellosis in Croatia. Lancet Infect. Dis. 6, 540-1. **7.** Dautović Krkić S, 2006, Humana bruceloza u BiH, klinički i epidemiološki aspekti. XX. simpozijum iz infektivnih bolesti s međunarodnim sudjelovanjem »Bruceloza - javnozdravstveni problem«, 23-26. 2. 2006, Sarajevo. Knjiga sažetaka, str. 18. **8.** Zvizdić S, Čengić D, Bratić M, Mehanić S, Pinjo F, Hamzić, 2006, Brucella melitensis: review of the human infection case. Bosn. J. Basic. Med. Sci. 6, 15 -18. **9.** Cvetnić Ž, Duvnjak S, Zdelar Tuk M, Reil I, Mikulčić M, Cvetnić M, Špičić S, 2017, Swine brucellosis caused by Brucella suis biovar 2 in Croatia. Slov. Vet. Res. 54, 149-54. **10.** Cvetnić Ž, Duvnjak S, Đuras M, Gomerčić T, Reil I, Zdelar Tuk M, Špičić S, 2016, Evidence of Brucella strain ST27 in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in Europe. Vet. Microbiol. 196, 93-97. **11.** Cvetnić Ž, Duvnjak S, Đuras M, Gomerčić T, Zdelar Tuk M, I Reil, Habrun B, Špičić S, 2017, Brucellosis in marine mammals, with special emphasis on the Republic of Croatia. Rad 530. Med. Sci. 44, 9-24. **12.** OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014, Chapter 2.7.2. Caprine and ovine brucellosis. **13.** Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, 1988, Techniques for the brucellosis laboratory (INRA, Paris, 1988). **14.** Corbel MJ, Gillk PW, Thomas EL, 1983, Methods for the identification of Brucella. Central Veterinary Laboratory, Weybridge. **15.** Serpe L, Gallo P, Fidanza N, Scaramuzza A, Fenizia D, 1999, Single-step method for rapid detection of Brucella spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. J. Dairy Res. 66, 313-37. **16.** Lopez-Goni I, Garcia-Yoldi D, Marin CM, De Miguel MJ, Munoz PM, Blasco JM, Jaques I, Grayon M, A. Clockaert, Ferreira AC, Cardoso R, Desa M, Walvarens K, Albert D, Garin-Bastuji B, 2008, Evaluation of multiplex PCR assay (bruce-ladder) for molecular typing of all Brucella species including the vaccine strains. J. Clin. Microbiol. 46, 3484-87. **17.** Caminiti A, Pelone F, Battisti S, Gamberale F, Colafrancesco R, Sala M, La Torre G, Della Marta U, Scaramozzino P, 2017, Tuberculosis, brucellosis and leucosis in cattle: a cost description of eradication programmes in the region of Lazio, Italy. Transbound. Emerg. Dis. 64, 1493-504. **18.** Arapović J, Špičić S, Ostojčić M, Duvnjak S, Arapović M, Nikolić J, Cvetnić Ž, 2018, Epidemiological, clinical and molecular characterization of human brucellosis in Bosnia and Herzegovina - An ongoing brucellosis outbreak. Acta. Med. Academica. 47, 50-60. **19.** Duvnjak S, Špičić S, Kušar D, Papić B, Reil I, Zdelar Tuk M, Pavlinec Ž, Đuras M, Gomerčić T, Hendriksen RS, Cvetnić Ž, 2017, Whole-genome sequence of the first sequence type 27 Brucella ceti strain isolated from European waters. Genome Announc. 14, 37.

ЗООНОЗЕ У РЕПУБЛИЦИ СРПскоЈ У 2017. ГОДИНИ
У КОНЦЕПТУ „ЈЕДНО ЗДРАВЉЕ“

ZOONOSES IN THE REPUBLIC OF SRPSKA IN 2017
IN THE CONCEPT OF "ONE HEALTH"

*Драго Недић¹, Јања Бојанић², Оливер Стевановић¹, Јелена Марић¹,
Виолета Сантрач¹, Бојан Голић¹, Радмила Чојо³, Кристина Шевић³,
Соња Николић¹, Зоран Бркић¹, Драган Касазић¹, Жељко Сладојевић¹*

¹ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске "Др Васо Бутозан", Бања Лука, Република Српска;

²ЈЗУ Институт за јавно здравство Републике Српске, Бања Лука, Република Српска;

³Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде, Бања Лука, Република Српска

Кратак садржај

Више од 60% заразних болести изазвано је патогенима који су поријеклом од домаћих или дивљих животиња. Концепт "Једно здравље" уведен је почетком 2000-их јер је здравље људи и животиња међусобно везано и зависно од укупног здравља у екосистему. Болести животињског поријекла које се могу пренијети на људе, као што су птичји грип, бјеснило или бруцелоза представљају свјетске ризике по јавно здравље. И многе друге болести које се углавном преносе са особе на особу такође круже међу животињама или су им животиње резервоари и могу изазвати озбиљне здравствене проблеме. Ови ризици расту са глобализацијом, климатским промјенама и промјенама понашања људи, омогућавајући патогенима да евалуирају у нове облике и да се појаве на новим територијама. Ветеринарске службе, јавне и приватне, имају кључну улогу у развоју и спровођењу политика за управљање ризицима животињског здравља. У заштити здравља и добробити животиња, они значајно доприносе побољшању здравља људи, као и безбједности хране. Због тога су им потребне адекватне и ефикасне методе за спречавање и контролу болести животиња, и морају бити у могућности да сарађују и раде у блиској сарадњи са свим заинтересованим странама, а посебно са здравственим епидемиолошким службама како би се предузимале заједничке мјере. У 2017. години је евидентиран 191 случај обољелих људи од антропозооза са стопом инциденце од 16,5% и процентом учешћа од 1,42% у укупном обољевању од заразних болести, те се антропозоозе у 2017. години по проценту учешћа налазе на петом мјесту међу групама заразних болести. Међу регистрованим зоонозама по учесталости су хеморагична грозница са бубрежним синдромом на првом мјесту (94), затим лептоспироза (30), кју грозница (26), трихинелоза (22), бруцелоза (12), токсоплазмоза (4), ехонококоза (2) и тетанус (1), без пријављених случајева антракса и туларемије.

Код животиња у лабораторијама ЈУ Ветеринарског института Републике Српске "Др Васо Бутозан" Бања Лука утврђене су болести животиња зооноског карактера: бруцелоза говеда (36), бруцелоза оваца (148), бруцелоза паса (4), Кју грозница (91), лептоспироза (21), високо патогена инфлуенца птица (1 двориште), анизакијаза (5), трихинелоза (13), салмонелоза (246), кластридије (4), Е. коли (53), стафилококе (107), стрептококе (47), протеус (9), труперела (4), псеудомонас (6), хламидофила абортус (18), пастерела (1), коринебактерије (3), ентеробактерије (1), ентерококус (8), бацилус (1), антракс (1). Активним надзором значајно се повећава степен новооткривених случајева зооноза, а тиме и могућност благовременог превентивног дјеловања.

Кључне ријечи: зоонозе, јединствено здравље, инфекције, Република Српска

Увод

Зооноза (грч. *zoon* - животиња и *nosos* - болест) је болести коју човек добија од клинички или субклинички болесних животиња. Живот у заједничком простору човјека и животиња ствара могућности преноса узрочника инфективних болести између животиња и људи. Узрочници зооноза могу бити бактерије, вируси, рикетије, гљивице и паразити [1, 2, 3]. Од 1.415 патогена за које је познато да могу да заразе људе, 61% је зоонозног карактера [4].



Слика 1. Преглед учешћа зооноза у укупном појављивању заразних болести

Велики је број патогена који круже у природи и изазивају болести међу животињама, а на различите начине и у различито вријеме се могу пренијети и на људе. Од зоонозних патогена човек може да оболи када они потичу од домаћих или дивљих животиња које живе у непосредном човјековом окружењу. Треба имати у виду да то подразумева и све већи број и све више различитих врста кућних љубимаца [5].

Преношење зооноза је најчешће: директним контактом са животињама, удисањем ваздуха или прашине контаминираних животињским екскретима или директним контактом са зараженим животињама, односно њиховим секретима и ткивима, контаминацијом са зелених и јавних површина, изметом паса (*Toxocara canis*, *Dyphillidium canis*, *Echinococcus granulosus*), уједом заражене животиње, конзумирањем или контактом са храном, путем вектора (крпељи, комарци, муве, глодари).

Најзначајнији зоонозни патогени који узрокују болести са храном су ешерихија коли O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7), кампилобактер (*Campylobacter*), калицивириде (*Caliciviridae*) и салмонела (*Salmonella*) [6, 7, 8, 9]. Многа обољења која се појављују након конзумирања хране могу се повезати са зоонозним патогенима јер различите врсте хране могу бити загађене животињским отпадом. За неку храну се сматра да је уобичајено контаминирана зоонозним патогенима као што су јаја, морски плодови, месо, млијечни производи, па чак и неко поврће [10]. Познато је да су неке зоонозе распрострањене по читавом свијету (космополитска зооноза) док се неке јављају само на одређеним подручјима (ендемска зооноза). Важан чинилац у ширењу космополитских зооноза је миграција носилаца узрочника, резервора инфекције. Зоонозе изазване паразитима се појављују и шире у зависности од присуства, биолошких вектора који преносе узрочника од сталног до прелазног домаћина [11].

Да ли ће се зооноза појавити и проширити зависи и од спољашње температуре и влаге, које појачавају или смањују виталност патогена, а то објашњава ендемски и сезонски карактер зооноза.

Најчешће зоонозе према узрочницима су: бактеријске: антракс, бруцелоза, туберкулоза, кампилобактериоза, салмонелоза, лептоспироза, болест мачијег огреба, лајмска болест, црвени вјетар, тетанус, листериоза, туларемија, јерсиниоза; вирусне: бјеснило, хеморагијске грознице, енцефалитис, менингоенцефалитис, авијарна инфлуенца, ебола гроозница; паразитске: ехинококоза, трихинелоза, токсоплазмоза, токсокароза, тенијазе, лишманијаза, метиљавост, филариоза - лоа лоа, маларија, болест спавања, шагасова болест, дифилоботриоза, пнеумоцистикоза, хименолепидоза, шистозомијаза, балантидиоза; рикецијске: Q-грозница, пјегави тифус; гљивичне: трихофитије, микроспоридије, хистоплазмоза [12, 13, 14].

Контакт са фармским животињама може довести код фармера или других који долазе у контакт са зараженим животињама. Малеус нпр. првенствено утиче на оне који имају контакт с коњима и магарцима. Блиски контакт са домаћим животињама може довести до кожне инфекције антраксом, док је инфекција антраксом удисањем честа за раднике у кланицама и фабрикама за прераду коже и вуне [15]. Контакт са овцама приликом и након партуса може довести до хламидиозе или ензоотског абортуса код трудница, бруцелозе, као и повећан ризик од кју грознице, токсоплазмозе и листериозе у трудноћи или иначе имунолошког оштећења. Ехинококоза је узрокована паразитом који се може ширити од заражених оваца храном или водом контаминираним фецесом или вуном. Птичији грип је уобичајен код живине а ријетко је код људи. Епидемиологе брине да ће сој птичијег грипа да се рекомбинује са људским вирусом грипа и изазвати пандемију попут шпанске грознице из 1918. године. Неке од мјера заштите су неопходне на ширем подручју као што је наредбом 2017. године, живина у Великој Британији била привремено затворена због опасности од појаве и ширења птичијег грипа [16].

Узрочници зооноза могу изазвати обољења код више животињских врста. Инфлуенца вирус је типични представник микроорганизма који инфицирајући различите животињске врсте, рекомбинује гене са другим вирусима, стварајући на тај начин нове антигенске подврсте са повећаном инфективношћу па могу изазвати тешку клиничку слику грипа са компликацијама због недостатка имунитета хумане популације. Клиничком сликом доминирају различити симптоми [17], зависно од патогености и вируленције узрочника и одбрамбених способности имуног система домаћина. Као и многе друге болести тако се и зоонозе морају прије свега спречавати, а ако се појаве онда благовремено и адекватно лијечити јер могу да буду смртоносне за човјека.

За постављање дијагнозе, у случају зооноза ријетко је довољна типична клиничка слика. Зато добра анамнеза и исцрпни подаци о контакту обољеле особе, наводе љекара на циљана лабораторијска испитивања, без којих је тешко са сигурношћу поставити дијагнозу - зооноза. Иначе, у дијагностици зоонозе примењују се следеће методе: директно изоловање узрочника болести; микроскопски преглед пунктата, столице, крвног размаза или болничког материјала; доказивањем присуства антигена узрочника или присуства специфичних антитела разноврсним серолошким реакцијама [18].

За успјешну превенцију, сузбијање и заштиту од зооноза, од битног значаја је добро познавање путева преношења и ширења болести. Превенција има највећи значај у борби против зооноза [19]. У ове мјере спадају: редовно прање руку после употребе тоалета и контакта са животињама; масовна едукација становништва, посебно дјете и власника паса [20]; добра термичка обрада намирница; преглед свињског односно говеђег меса на присуство паразита прије употребе; редовна вакцинација становништва према програму вакцинисања и вакцинације прије одласка у егзотична подручја са ендемским зоонозама [21]; хемопрофилакса све вријеме боравка у егзотичним подручјима са ендемским зоонозама; заштита од инсеката - механичка или коришћењем различитих репелената [22]; уништавање вектора или њихових легала; лијечење клицоноша и паразитиноша; редовна ветеринарска контрола и вакцинација кућних љубимаца; стављање под контролу паса луталица; доношење законских прописа о држању паса.

Неки узрочници зооноза могу да буду употријебљени као биолошко оружје због чега све више расте потреба за њихово изучавање. Зоонозни патогени као биолошко оружје не представљају опасност само за човјека него и за животиње нарушавајући и уништавајући природне ресурсе, што једном подручју или некој земљи наноси велике економске губитке.

За стручну и укупну јавност веома је важно да располажу са подацима о кретању заразних болести. У земљама региона јавно здравствени институту издају периодичне или

годишње извјештаје о кретању заразних болести подразумијевајући и зоонозе. У циљу бољег разумијевања, болести се групишу на различите начине, а један од тих је: респираторне, цријевне, паразитарне заразне болести; антропозоонозе; полне заразне болести, трансмисивне заразне болести, кожно заразне болести, епидемије заразних болести, болничке инфекције и епидемије болничких инфекција [23]. Тако нпр. од респираторних болести зоонозног карактера туберкулоза (*Tuberculosis*) и данас представља велики здравствени проблем. Сваке године се у свијету региструје око 9 милиона нових случајева обољелих од туберкулозе. Око 2 милиона људи годишње умре од посљедица туберкулозе, од чега је око 0,4 милиона смртних исхода међу ХИВ позитивним особама. Свјетска здравствена организација је прогласила туберкулозу за глобалну здравствену пријетњу још 1993. године. Или, код цријевних заразних болести зоонозни патогени као што су *Salmonella enteritidis*, *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* и *Enterobacter* заузимају најзначајније мјесто.

Материјал и методе

Да бисмо приказали бројно стање зооноза у Републици Српској користило смо податке које достављају надлежни органи у хуманој (клинике, болнице, домови здравља, амбуланте) и ветеринарској медицини (институти, заводи, ветеринарске организације). Према важећим прописима све здравствене установе достављају податке на прописаним обрасцима који се достављају и обједињавају у ЈЗУ Институт за јавно здравство Републике Српске. Подаци о заразним болестима људи се објављују у мјесечним билтенима и годишњој публикацији.

Када је у питању здравље животиња па и зоонозе, податке прикупља ресор за ветеринарство у Министарству пољопривреде, а највећи број података се обрађује у ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске "Др Васо Бутозан" Бања Лука. Узорци потичу са фарми и из погона за производњу хране. Коришћене лабораторијске методе су у највећем броју акредитоване методе по стандарду БАС ЕН ИСО 17025. Мањи број неакредитованих метода се односи на веома ријетке патогене који немају нарочито опасан зооноски потенцијал.

Након обраде подаци се објављују у мјесечном билтену и стављају на увид јавности. Сортирање и систематизовање доступних података вршили смо преко расположивих база (EpiInfo, LabIS), а обраде у MS Office пакету и SPSS v.23.0 софтверу за статистичку обраду података. Подаци се односе на 2017. годину за простор Републике Српске.

Резултати и дискусија

У Републици Српској је током 2017. године регистровано 13.419 лица обољелих од заразних и паразитарних болести са стопом инциденце од 1.161,1 на 100.000 становника (у даљем тексту ‰_{0000}). Стопа морталитета износила је 3,11 ‰_{0000} односно 36 болесника је умрло од заразних болести, од чега је 19 болесника умрло од посљедица сепсе, 10 од бактеријске пнеумоније, 3 од интестиналне инфекције, и по 1 од инфлуенце, туберкулозе, лептоспирозе и акутног вирусног хепатитиса Б што се у сличним оквирима наводи и у доступној литератури [1, 2, 3].

У графиконима 1 и 2 приказано је кретање броја и стопа инциденце обољелих од заразних болести у петогодишњем периоду од 2013. до 2017. године [23].



Графикон 1. Број обољелих од заразних болести у Републици Српској у периоду 2013 - 2017. год.



Графикон 2. Стопа инциденце обољелих од заразних болести у Републици Српској у периоду 2013-2017. година

У петогодишњем периоду, од 2013-2017. године уочава се тенденција извјесног смањења броја обољелих односно стопе инциденце, са изузетком 2014. године када је забиљежена нешто већа стопа у односу на претходну 2013. годину. У ствари, највећа вриједност од 1.456,1 ‰ је евидентирана 2014. године, да би у сљедећој 2015. години дошло до одређеног пада стопе инциденце на 1.412,9 ‰, у 2016. се биљежи даљњи пад на вриједност од 1.234,4 ‰ и на крају у 2017. години је регистрована најнижа вриједност од 1.161,1 ‰ (графикон 2).

Највеће процентуално учешће у укупном оболијевању од заразних болести у 2017. години је имала група респираторних заразних болести са 66,29% учешћа, на другом мјесту су цријевне заразне болести са 26,84%, трећу позицију заузима група осталих заразних болести са 2,21%, а четврту паразитарне заразне болести са 1,65% учешћа. На петом мјесту су зоозоозе са

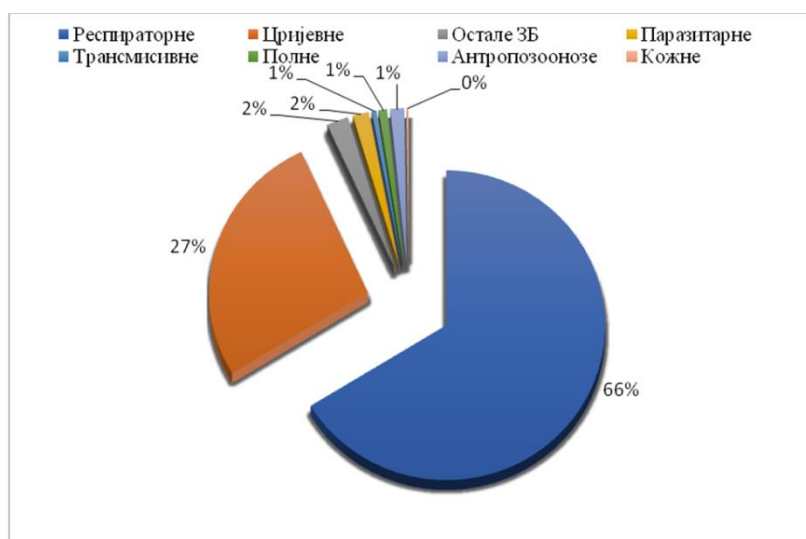
29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

учешћем од 1,42%, затим полне 0,87%, трансмисивне 0,51% и на осмом мјесту су кожне заразне болести са 0,21% учешћа.

У табели 1. и графикану 3. су представљени број обољелих и процентуално учешће појединих група заразних болести у укупном обољевању од заразних болести у 2017. године. На графикану 3. приказано је учешће појединих група заразних болести у укупном обољевању од заразних болести у 2017. години.

Табела 1. Број обољелих и стопа инциденце за поједине групе заразних болести у 2017. години

Групе заразних болести	Број обољелих	Стопа инциденце (‰/0000)
Респираторне	8.895	769,7
Цријевне	3.601	311,6
Остале заразне болести	297	25,7
Паразитарне	222	19,2
Зоонозе	191	16,5
Полне	117	10,1
Трансмисивне	68	5,9
Кожне	28	2,4



Графикон 3. Учешће појединих група заразних болести у укупном обољевању од заразних болести у 2017. години

Учешће зооноза са стопом инциденце од 16,5 ‰/0000 је само дио од обољења која су зооноског карактера а сврстане су према овој подјели у друге групе болести. Од појединих група болести можемо издвојити неке које спадају у зоонозе као нпр. туберкулоза која је током 2017. године у Републици Српској пријављена у 175 новооткривених случајева са стопом инциденце од 15,2‰/0000 и процентом учешћа од 1,97% у укупном обољевању међу капљичним заразним болестима, те се туберкулоза налази на седмом мјесту међу респираторним заразним болестима. У 2017. години, званично су пријављене двије епидемија цријевних заразних болести гдје је пут

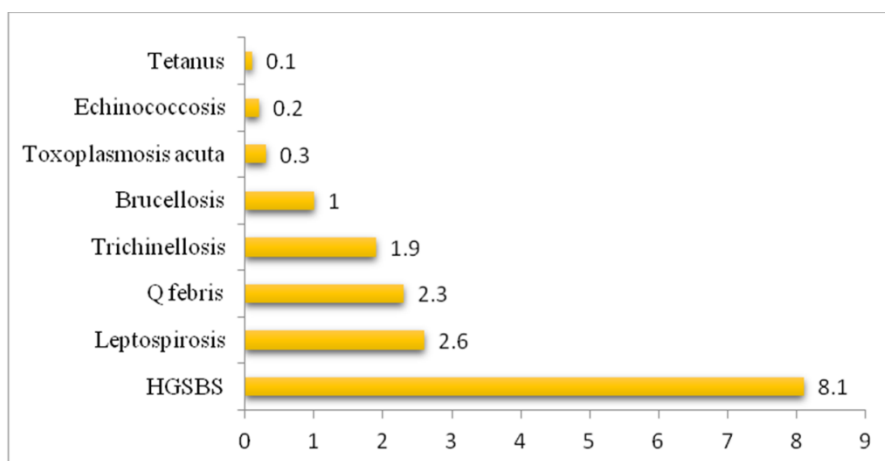
29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

преноса била храна. Учешће салмонелоза је на другом мјесту са 142 обољел и учешћем од 3,94%. Када су у питању најчешће намиринице и храна преко којих је дошло до преношења узрочника заразних болести, то су били: свињско месо, пилеће месо и колачи. Свака појава алиментарних епидемија у суштини указује на пропусте у надзору, производњи, промету, дистрибуцији, складиштењу и чувању животних намириница и хране. Такви и слични пропусти се морају што хитније отклањати, како би храна била безбједна у читавом ланцу „од производње до стола.“ Током 2017. године пријављена су 34 случаја повреда од животиња сумњивих на бјеснило (*Lyssa kontakt*) са инциденцом 3,0⁰/₀₀₀₀ и процентуалним учешћем од 11,45%. У овом периоду пријављена су 222 случаја паразитарних заразних болести, те се паразитарне болести по учесталости налазе на четвртном мјесту са 1,65% учешћа у укупном оболијевању од заразних болести, а стопа инциденце у 2017. години је износила 19,2⁰/₀₀₀₀. Наведени подаци у складу су са наводима из литературе [5, 11, 12, 13, 14].

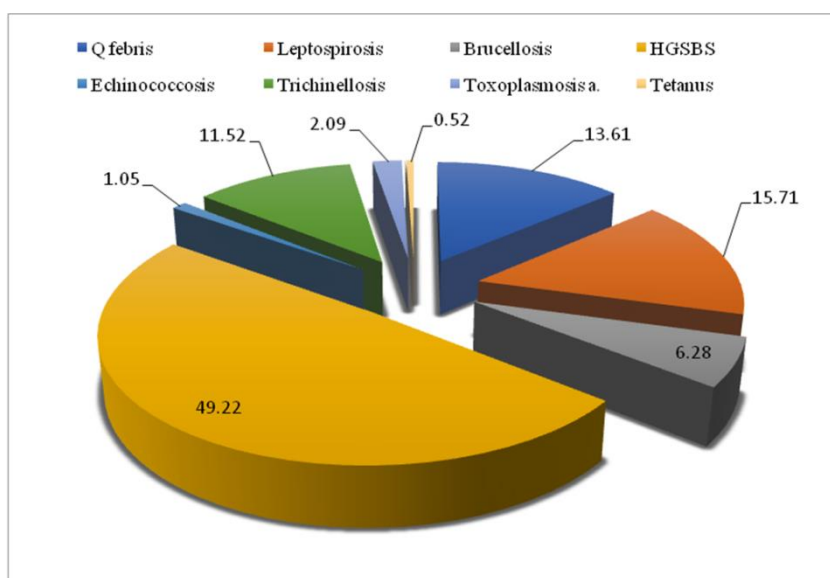
У 2017. години је евидентиран 191 случај обољелих од антропозооза са стопом инциденце од 16,5⁰/₀₀₀₀ и процентом учешћа од 1,42% у укупном оболијевању од заразних болести, те се антропозоозе у 2017. години по проценту учешћа налазе на петом мјесту међу групама заразних болести. Међу регистрованим зоозама хеморагична грозница са бубрежним синдромом се налази на првом мјесту, на другом је лептоспироза, трећем кју грозница, затим слиједи трихинелоза, бруцелоза, токсоплазмоза, ехококоза и тетанус. Број обољелих, стопа инциденце и проценат учешћа појединих антропозооза у 2017 години, приказани су у табели 2. и графиконима 4. и 5. Сличне податке наводе и Н. Krauss и сар. [17].

Табела 2. Учесталост антропозооза у 2017. години

Врста болести	Број обољелих	Стопа инциденце (‰)	Учешће (%)
HGSBS	94	8,1	49,22
Leptospirosis	30	2,6	15,71
Q febris	26	2,3	13,61
Tricinellosis	22	1,9	11,52
Brucellosis	12	1,0	6,28
Toxoplasmosis acuta	4	0,3	2,09
Echinococcosis	2	0,2	1,05
Tetanus	1	0,1	0,52
Anthrax	0	0,0	0,00
Tularemia	0	0,0	0,00
УКУПНО	191	16,5	100



Графикон 4. Стопа инциденце антропозооза у 2017. години



Графикон 5. Учешће (%) појединих антропозооза у укупном обољевању од антропозооза у 2017. години

Од укупног броја регистрованих антропозооза, током 2017. године регистрована су 94 случаја хеморагичне грознице са бубрежним синдромом, те је стопа инциденце износила $8,1/0000$, а проценат учешћа у укупном обољевању од антропозооза 49,22%. Регистроване су 4 епидемије ове болести и то на подручју општина Градишка, Костајница, Козарска Дубица и Бања Лука са укупно 70 обољелих. Пријављено је 30 случајева лептоспирозе, а један болесник је умро од посљедица лептоспирозе. Од Q грознице је 26 обољелих, а званично није пријављена ни једна

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

епидемија ове болести. У јануару 2017. године. Дом здравља Братунац пријавио је епидемију трихинелозе у селу Слапашница са 22 обољела који су у једном домаћинству конзумирали месо домаће свиње. Овом проблематиком бавили су се и Pedro N. Acha и Boris Szyfres [12].

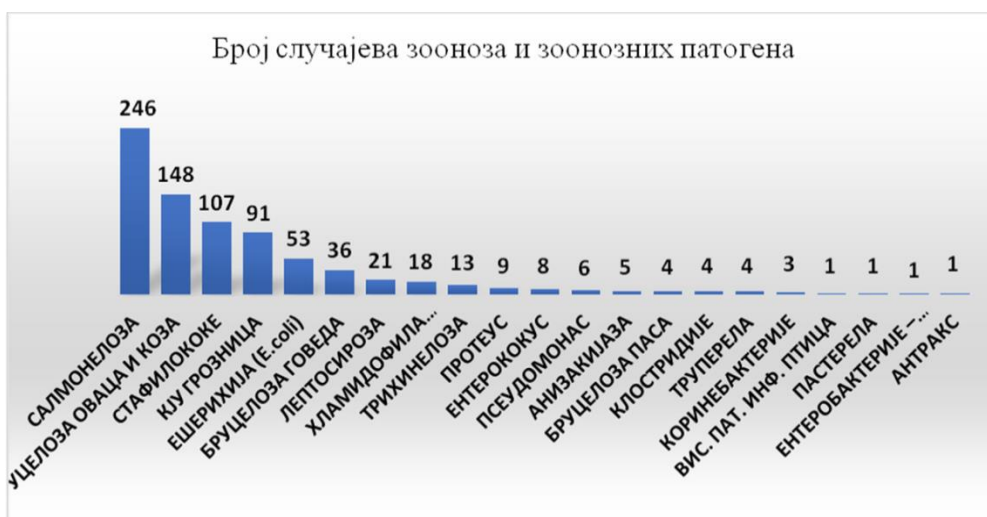
Током 2017. године евидентирано је 12 обољелих од бруцелозе, те је стопа оболијевања износила $1,0 \text{ ‰}$. Цветнић Ж. [13, 14] веома детаљно описује појаву и ширење бруцелозе наводећи различита искуства у сузбијању бруцелозе па и раније постигнуте резултате у Републици Српској и БиХ. Ради подсећања, велика епидемија бруцелозе у Републици Српској почела је 2007. године, а врхунац епидемије је био у 2008. години са 216 обољелих људи и десетине хиљада оваца и коза. Захваљујући свеобухватним противеписооитолошким и противеписидемијским мјерама, број обољелих у 2009. години се смањило на 79 са стопом инциденце од $5,6 \text{ ‰}$. Тренд пада оболијевања настављен је у следећој 2010. и наредним годинама. Међутим, проблем бруцелозе је и даље присутан, те због тога треба спроводити одговарајуће ветеринарске и друге мјере усмјерене на благовремено откривање и ликвидацију обољења и то првенствено међу животињама (овце, козе и говеда). Акутна токсоплазмоза регистрована је у 4 случаја, ехинококоза у 2 и 1 пријављен случај тетануса.

У лабораторијама ЈУ Ветеринарског института Републике Српске ”Др Васо Бутозан” Бања Лука утврђено је више од 20 различитих патогена зоонотског карактера. Најзаступљенији патогени су салмонеле, бруцеле, коксидије, стафилококе, лептоспире, ешерихија и друге. Одсуство бјеснила као резултат добре и свеобухватне превентивне акције наводе и Wilson JM и сар. [18].

Табела 3. Учесталост зооноза и зоонозних патогена у 2017. години потврђених у ветеринарским лабораторијама

Назив зоонозе или патогена	Број случајева
Бруцелоза говеда	36
Бруцелоза оваца и коза	148
Бруцелоза паса	4
Кју грозница	91
Лептосириоза	21
Вис. пат. инф. птица (жариште)	1
Анизацијаза	5
Трихинелоза	13
Салмонелоза	246
Клостридије	4
Ешерихија (<i>E.coli</i>)	53

Назив зоонозе или патогена	Број случајева
Стафилококе	107
Протеус	9
Труперела	4
Псеудомонас	6
Хламидофила (<i>Ch.abortus</i>)	18
Пастерела	1
Коринебактерије	3
Ентеробактерије – (неидентиф.)	1
Ентерококус	8
Антракс	1



Графикон 6. Графички приказ учесталости зооноза и зоонозних патогена у 2017. години утврђених у ветеринарским лабораторијама

Овим се не искључује и постојање многих других зоонозних патогена, али није било индикација за њихово откривање или још увијек није прописана обавезност на њихову контролу и пријављивање. Евидентан је пораст боја случајева обољевања и животиња и људи од бруцелозе без обзира што се проводи и превентивна вакцинација оваца и коза од 2009. године. Ова мјера је уведена после 2008. године када је била веома висока преваленца ове болести (око 5%) и када је регистровано скоро 1.000 серопозитивних људи у БиХ (216 у Републици Српској). Као и код животиња тако и код људи многе болести пролазе без пријављивања па се не може поуздано тврдити да ли болест постоји или не. Значајно је напоменути да неколико година није утврђен ни један позитивни случај бјеснила ни код домаћих нити код дивљих животиња. Ово је резултат превентивне, оралне вакцинације лисица у региону. Многе од нађених болести, односно патогена могу се добрим биосигурносним мјерама спријечити и активним надзором благовремено открити. Наведени резултати су упоредиви са резултатима, наравно у мањем обиму са резултатима које наводе многи аутори [6, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 20, 22].

Закључак

Анализом добијених података о кретању заразних болести у Републици Српској епидемиолошка ситуација у 2017. години била несигурна и неповљна. Оваква квалификација епидемиолошке ситуације је због епидемијске појаве више врста заразних болести, са посебним нагласком на епидемије хеморагичне грознице са бубрежним синдромом на подручју општина Градишка, Костајница, Козарска Дубица и Бања Лука. Епидемиолошка ситуација по питању заразних болести у Републици Српској у 2017. години у суштини је била под контролом, али и даље је неопходно јачати систем контроле и надзора над заразним болестима. Осим унапређења информационог система потребно је јачање стручних људских ресурса и опреме, континуирано праћење и ажурирање законске регулативе, те јачање лабораторијских капацитета. Практиковање тимског рада и мултидисциплинарног приступа у имплементацији свеобухватних мјера и активности ће значајно допринијети реалнијој процјени епидемиолошке ситуације и с тим у вези ефикаснијем спровођењу потребних превентивних и противепидемијских мјера. Јачање и усавршавање система надзора и раног упозоравања над заразним обољењима доприноси бржем

откривању и сузбијању појединачних случајева и епидемија заразних болести, те на смањење последица обољевања, компликација, инвалидности и умирања од истих.

Поред угрожености људи зоонозним патогенима не треба занемарити чињеницу да код појава ових болести међу животињама могуће су огромне материјалне штете што може да угрози економију земље (бруцелоза, кју грозница, лептоспироза, авијарна инфлуенца и др.). Из наведених резултата и дискусије може се закључити да је брига о здрављу животиња примарни задатак кад је у питању спречавање појаве и ширење зоонозних болести. То је прво одговорност субјеката као власника животиња или произвођача хране, уз незаобилазну улогу ветеринарске службе. Основне мјере за заштиту људи од зооноза су: редовно прање руку после употребе тоалета и контакта са животињама; масовна едукација становништва, посебно дјеце и власника животиња; добра термичка обрада намирница; преглед свињског односно говеђег меса на присуство паразита прије употребе; редовна вакцинација становништва према програму вакцинисања и вакцинације прије одласка у егзотична подручја са ендемским зоонозама; заштита од инсеката - механичка или коришћењем различитих репелената; уништавање вектора или њихових легала; спречавање традиционалног начина номађења; лијечење клицоноша и паразитиноша; редовна ветеринарска контрола и вакцинација кућних љубимаца; стављање под контролу паса луталица; доношење прописа о држању животиња и њихова обавезна примјена.

Литература

1. WHO. "Zoonoses". Retrieved 18 December 2014.
2. The Merriam-Webster Dictionary. "Zoonosis".
3. Руководство по зоонозам / Под ред. акад. АМН СССР В. И. Покровского. Л.: Медицина, 1983. 320 с. 15000 экз. (в пер.).
4. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME (2001). "Risk factors for human disease emergence". *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 356 (1411): 983–989. doi:10.1098/rstb.2001.0888. PMC 1088493. PMID 11516376.
5. Michael R. Conover & Rosanna M. Vail: Human Diseases from Wildlife. CRC Press, 2015. ISBN 978-1-4665-6214-1 (Print); ISBN 978-1-4665-6215-8 (eBook).
6. Humphrey T, O'Brien S, Madsen M (2007). "Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective". *International Journal of Food Microbiology*. 117 (3): 237–257. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006. PMID 17368847.
7. Cloeckaert A (2006). "Introduction: emerging antimicrobial resistance mechanisms in the zoonotic foodborne pathogens Salmonella and Campylobacter". *Microbes and Infection*. 8 (7): 1889–1890. doi: 10.1016/j.micinf.2005.12.024. PMID 16714136.
8. Frederick, A. Murphy (1999). "The Threat Posed by the Global Emergence of Livestock, Food-borne, and Zoonotic Pathogens". *Annals of the New York Academy of Sciences*. 894: 20–7. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb08039.x. PMID 10681965.
9. Недић Драго (1992): *Campylobacter spp.* у објектима за клање стоке и њихов значај за хигијену намирница. Магистарски рад. Ветеринарски факултет Сарајево, стр 116.
10. "Investigating Foodborne Outbreaks" (PDF). Centers for Disease Control and Prevention. 15 September 2011. Retrieved 5 June 2013.
11. Srinivasan A, Burton EC, Kuehnert MJ, et al. Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med*. Mar 17 2005;352(11):1103-11. [Medline].
12. Pedro N. Acha & Boris Szyfres: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Volume 3: Parasitoses. PAHO Pan American Health Organization, 3rd ed., Washington, 2003.
13. Cvetnić Ž, 2013, Bakterijske i gljivične zoonoze, Medicinska naklada, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, 327 str.
14. Cvetnić Ž, 2015, Brucelozna, Medicinska naklada, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, 273 str.
15. "Inhalation Anthrax". *www.cdc.gov*. Retrieved 2017-03-26.
16. "Avian flu: Poultry to be allowed outside under new rules". *BBC News*. 2017-02-28. Retrieved 2017-03-26.
17. H. Krauss, A. Weber, M. Appel, B. Enders, A. v. Graevenitz, H. D. Isenberg, H. G. Schiefer, W. Slenczka, H. Zahner: Zoonoses. Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans. 3rd Edition, 456 pages. ASM Press. American Society for Microbiology, Washington DC., USA. 2003. ISBN 1-55581-236-8.
18. Wilson JM, Hettiarachchi J, Wijesuriya LM. Presenting features and diagnosis of rabies. *Lancet*. Dec 6 1975;2(7945):1139-40. [Medline].
19. Матюхина З.П. Основы физиологии питания, гигиены и санитарии. — М., «Высшая школа», 1984. С. 47.
20. Benedict M, Levine R, Hawley W, and Lounibos L. Spread of The Tiger: Global Risk of Invasion by The Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. Spring 2007, 7(1): 76-85. doi:10.1089/vbz.2006.0562.
21. Willoughby RE Jr. Early death" and the contraindication of vaccine during treatment of rabies. *Vaccine*. Nov 27

2009;27(51):7173-7. [Medline]. **22.** Gavani AS, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet*. 2002;360(9330):374-9. **23.** "Годишњи извјештај" (2017): Здравствено стање становништва Републике Српске, 2016. (Analysis of population health in Republic of Srpska, 2016). ЈЗУ Институт за јавно здравство, Република Српска/Public Health Institute, Republic of Srpska. 2016, 331 стр. Бања Лука.

ФЛАВИВИРУСИ НА ПОДРУЧЈУ СРБИЈЕ – ТРЕНУТНО СТАЊЕ И ИЗАЗОВИ

FLAVIVIRUS IN THE AREA OF SERBIA - CURRENT STATE AND CHALLENGES

*Тамаш Петровић¹, Миланко Шеклер², Душан Петрић³, Дејан Видановић²,
Александар Поткоњак⁴, Ивана Хрњаковић Цвјетковић^{5,6}, Госпава Лазвић¹,
Александра Изњатовић Ћупина³, Диана Лунуловић¹, Весна Милошевић^{5,6}, Сава Лазвић¹*

¹Одељење за вирусологију, Научни институт за ветеринарство “Нови Сад”; ²Ветеринарски специјалистички институт “Краљево”; ³Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Лабораторија за медицинску и ветеринарску ентомологију; ⁴Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Департман за ветеринарску медицину; ⁵Универзитет у Новом Саду, Медицински факултет, Катедра за микробиологију са паразитологијом и имунологијом; ⁶Институт за јавно здравље Војводине, Центар за вирусологију, Нови Сад

Кратак садржај

Циљ овога рада је да сумарно прикаже податке о појави, присуству и раширености неких зооноотских флавируса чија циркулација је утврђена на подручју Републике Србије током последњих десетак година. У род *Flavivirus* фамилије *Flaviviridae* спадају векторски преносиви вируси зооноотског потенцијала. Род обухвата више од 70 врста вируса који се преко комараца и крпеља преносе на људе. Неки од ових вируса изазивају обољења само људи (као што су жута грозница и Денга), док други изазивају обољења животиња и људи. Резервоари и природни домаћини за ове друго поменуте вирусе су пре свега животиње а вируси се путем различитих вектора, најчешће комараца и крпеља могу пренети и на друге врсте животиња, као и на људе. Већи број врста ових вируса је широко распрострањен у свету, посебно у тропским и суптропским климатским појасевима. Поједини представници овога рода су утврђени на подручју Републике Србије тек у скорашњем периоду. У раду су приказани подаци истраживања која су спроведена на подручју Републике Србије, а односе се на утврђивање присуства и раширености вируса Западног Нила, вируса крпељског енцефалитиса и Усуту вируса. Поменута истраживања су указала, како на присуство скорије детектованих вируса Западног Нила и Усуту вируса, тако и на тренутну циркулацију вируса крпељског енцефалитиса за који су раније постојали ограничени серолошки подаци о присуству антитела код људи. За разумевање истинског значаја налаза и преваленције различитих флавируса за јавно здравље у Републици Србији, неопходно је спровести детаљнија ентомолошко-акаролошка, серо-епидемиолошка, клиничка и вирусолошка истраживања.

Кључне речи: флави вируси, вирус Западног Нила, вирус крпељског енцефалитиса, Усуту вирус, Србија.

Присуство и раширеност вируса Западног Нила (ВЗН)

Вирус Западног Нила (ВЗН - *West Nile virus* - *WNV*) је неуротропни, комарцима преносиви флави вирус зооноотског потенцијала. Вирус се одржава у природи у ензоотском циклусу кружења између птица као домаћина и комараца, најчешће из рода *Culex* али и других, као вектора вируса. Вирус повремено инфицира и друге кичмењаке, укључујући ту и човека и коње, код којих изазива спорадична обољења која некад могу завршити смртним исходом (1). Вирус Западног Нила (ВЗН) је први пут изолован из узорака једне високо фебрилне жене у Уганди (*West Nile* округ) 1937. године (2), по чему је инфекција и добила назив Грозница Западног Нила (ГЗН), а данас се, након Денга вируса, сматра другим најраспрострањенијим флави вирусом у свету. Вирус је данас ендемски присутан на подручјима Африке, Азије, Европе, Блиског истока,

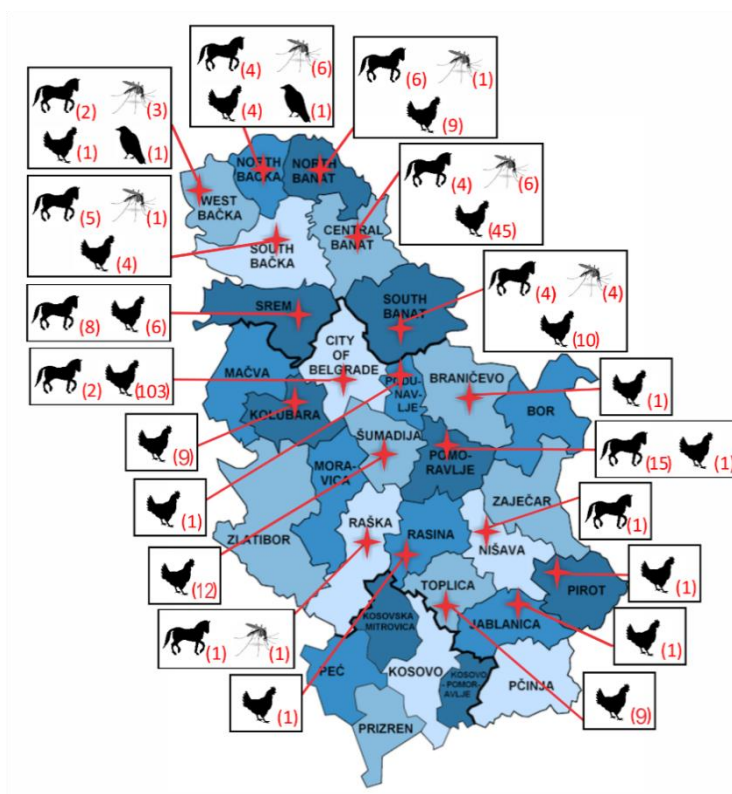
Аустралије и на Америчком континенту (3,4,5,6,7). На подручју Европе и то претежно у медитеранским земљама су циркулисали само сојеви линије 1 вируса све до 2004. године, када је у Мађарској из јастреба, по први пут у Европи, изолован ВЗН линије 2. Од тада, ВЗН линије 2 је потврђен у великом броју дивљих птица, комараца са доказаним векторским капацитетом, као и људи у Мађарској, Аустрији, Русији, Италији, Грчкој, а у новије време и у Србији (8,9,10,7,11,12,13,14,15).

Дивље птице су посебно значајне са аспекта здравља људи и животиња јер често мигрирају преко националних али и интерконтиненталних граница, представљајући тако преносиоце вируса на велике раздаљине (16). Код већег броја врста дивљих птица али не свих код су подложне инфекцији, ниво виремије, односно број вирусних честица који се налази у крвотоку у фази виремије, је довољно велики да омогући преношење вируса на комарце при убоду (3). Људи и сисари, а међу њима нарочито коњи, су случајни домаћини вируса, тзв „слепа улица“ за даље ширење вируса и немају значајнију улогу у природном циклусу кружења вируса јер је ниво виремије приликом њихове инфекције сувише низак да би се вирус пренео на комарце приликом убода (4,10), али се зато код њих, нарочито код људи и коња, инфекција може у мањем проценту манифестовати тешким неуроинвазивним обољењем, често и са смртним исходом. Инфекције ВЗН код људи пролазе најчешће асимптоматски (80 – 90% случајева). Код мањег броја инфицираних особа (до 20%) се могу појавити блажи клинички симптоми који подсећају на обољење слично грипу, са наглом појавом повишене телесне температуре, главобољом, болом у грлу, леђима, мишићима, зглобовима, умором, благим пролазним осипом и лимфаденопатијом. Међутим, просечно код једног од 150 случајева и то најчешће код старијих особа, као и код особа са коморбидитетним стањима, може се развити тежа неуроинвазивна форма болести са енцефалитисом или менингоенцефалитисом, која може довести до смртог исхода (17,4). Код коња инфекција ВЗН, као и код људи, пролази најчешће клинички инапаратно али чак и у до 10% случајева се јављају неуролошке сметње код којих је морталитет и до 50% (17,5). У Европи је овај вирус присутан већ деценијама, али се недавно, број, учесталост и озбиљност епидемија са неуролошким последицама за птице, људе и коње драматично повећао у централној и јужној Европи, представљајући озбиљан проблем у ветеринарском и јавном здрављу (1,15).

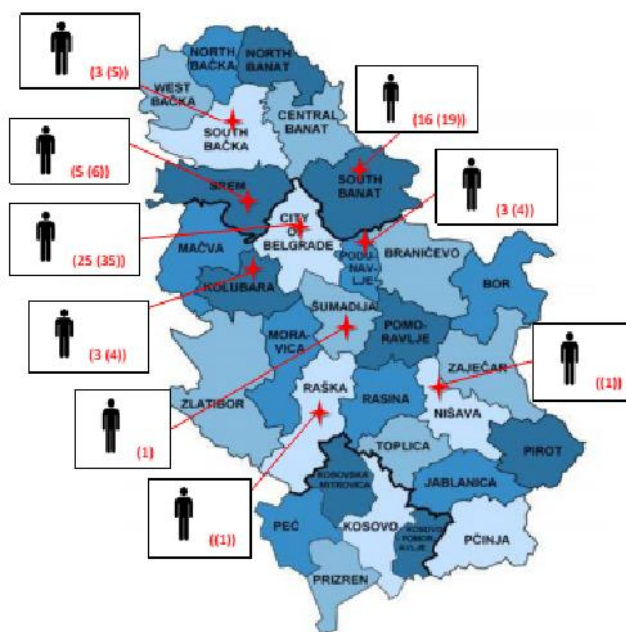
Након неких историјских података, први подаци о присуству вируса Западног Нила (ВЗН) у Србији утврђени су испитивањима крвних серума коња на присуство антитела против овога вируса на подручју Војводине. Прво тестирање је спроведено са крвним серумима узоркованим током 2009. и 2010. године. Присуство антитела против ВЗН је детектовано имуноензимским тестом (ЕЛИСА) а затим и неутрализационим тестом редукције плакова (ПРНТ) код 12% (46/349) испитаних узорака (18). Изненађујуће висок проценат серопозитивних коња је покренуо додатна истраживања, тако да су серолошка тестирања настављена у наредне 3 године. Испитивањима ЕЛИСА тестом на присуство антитела против ВЗН која су спроведена на узорцима крвних серума коња узоркованих 2011. године је детектовано 28,6% (72/252) серопозитивних животиња, а затим и 49,2% (64/130) и 46,9% (45/96) серопозитивних крвних серума коња који су узорковани и тестирани током 2012. и 2013. године (19,20,21). Изразит пораст преваленције серопозитивних коња је указивао на све интензивнију циркулацију ВЗН у природи. И поред високе преваленције, клиничка слика болести код коња није пријављена, односно лабораторијски потврђена. Циркулација ВЗН у природи је такође потврђена ЕЛИСА и ПРНТ тестом код 5/92 (5,4%) крвних серума дивљих птица позитивних на антитела против ВЗН, као и детекцијом присуства самог вируса *real-time RT-PCR* тестом у узорцима ткива 8/82 (9,8%) угинулих дивљих птица. Ово испитивање је спроведено на узорцима од 134 дивље птице, сврстаних у 46 врста, узоркованих током прве половине 2012. године на подручју Војводине (15). Поред наведеног, код 6% (3/50) и 9,15% (28/306) испитаних збирних узорака комараца, узоркованих током 2010. и 2013. године, *real-time RT-PCR* тестом је утврђено присуство генома вируса ВЗН (21,22). Такође, 5,04% (17/337) испитаних крвних серума људи, узоркованих са подручја Војводине током 2010. године, су реаговала позитивно у ЕЛИСА тесту на присуство антитела против ВЗН (22). Од 2012. године, када је забележена прва епидемија ВЗН и клиничка слика код оболелих људи, сваке године се региструју случајеви обољења људи (23,24). Национални програм мониторинга ВЗН, који финансира Управа за ветерину, а спроводе ветеринарски научни и специјалистички Институту са

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

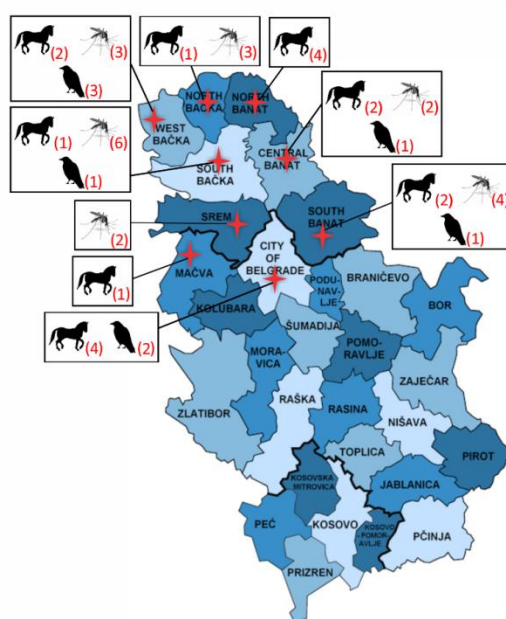
ветеринарским станицама уз активно учешће ентомолога и орнитолога, отпочео је од 2014. године и био је успешан у откривању циркулације и присуства ВЗН код сентинел животиња (домаће живине и коња у 2014., односно само код коња у осталим годинама), у дивљим птицама и комарцима и то пре избијања првих случајева код људи у свакој сезони. Овај програм се са мањим изменама наставио и током 2015., 2017. као и 2018. године (који је у току) (25,26). Основни циљ овога програма јесте рана детекција присуства ВЗН на неком подручју и правовремено алармирање надлежне здравствене службе и локалних самоуправа ради контроле – сузбијања комараца, информисања становништва и предузимања свих могућих превентивних мера заштите људи и животиња. Програм мониторинга се заснива на индиректном и директном праћењу присуства ВЗН у природи. Индиректно праћење вируса се врши серолошким тестирањем – сентинел коња и живине (живине само у 2014.год.), која се врше континуирано и периодично у периоду највеће активности комараца (јун – септембар). Број сентинел животиња које се прате је дефинисан на нивоу свакога округа Републике Србије и то у односу на висину ризика од појаве инфекције ВЗН. Директно праћење присуства ВЗН се врши периодичним и континуираним испитивањима збирних узорка комараца узоркованих сваке две недеље у периоду њихове највеће активности (јун - август) и дивљих птица (ткива угунутих и брисева живих пријемчивих врста дивљих птица) на присуство овога вируса. Број узорка за испитивање је такође одређен по окрузима на основу висине ризика (26). Део резултата програма мониторинга ВЗН током 2014 и 2015 године су приказани у сликама и графиконима испод (слике 1 – 4 и графикон 1 и 2).



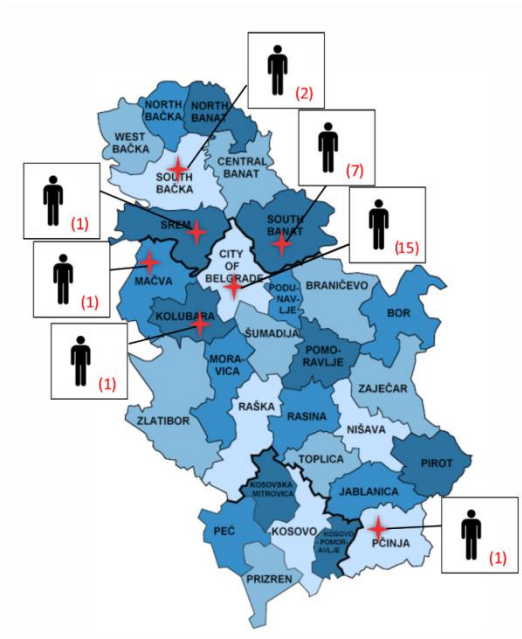
Слика 1. Резултати Програма мониторинга ВЗН на подручју Р. Србије током 2014. године - позитивни случајеви налаза вируса код комараца и дивљих птица и специфичних антитела код сентинел коња и живине.



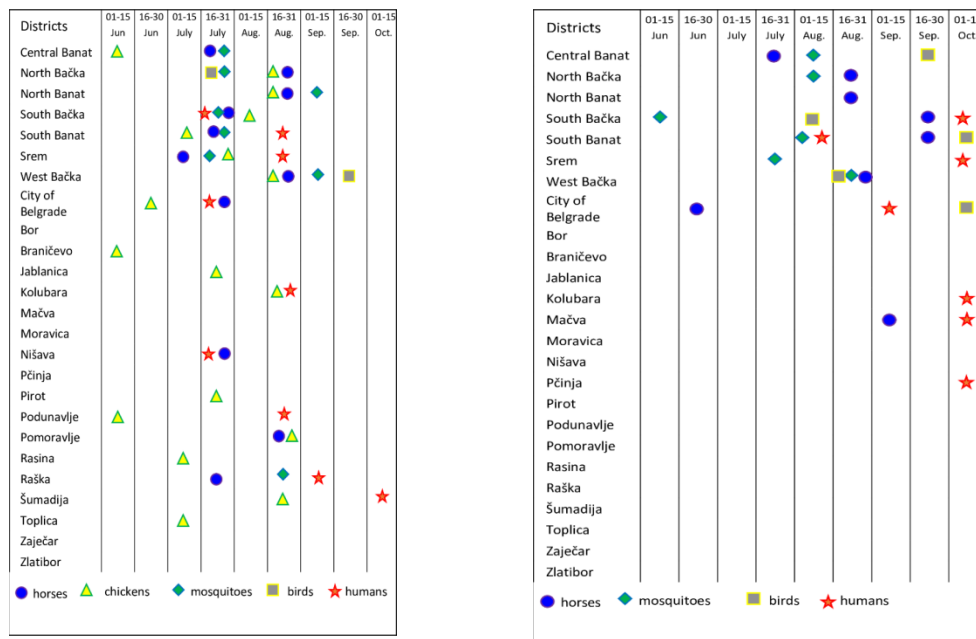
Слика 2. Регистровани хумани случајеви болести Западног Нила током 2014. године – (x) клинички и лабораторијски потврђени случајеви, ((x)) пријављени клинички а лабораторијски не потврђени случајеви



Слика 3. Резултати Програма мониторинга ВЗН на подручју Р. Србије током 2015. године - позитивни случајеви налаза вируса и специфичних антитела код комараца, дивљих птица и сентинел коња.



Слика 4. Регистровани хумани случајеви болести Западног Нила током 2015. године – (х) клинички и лабораторијски потврђени случајеви



Графикон 1. (лево) и Графикон 2 (десно) Временска дистрибуција првих позитивних налаза присуства вируса по Програму мониторинга ВЗН у односу на прве хумане случајеви по окрузима Републике Србије током 2014. (лево) и 2015. године (десно) (18)

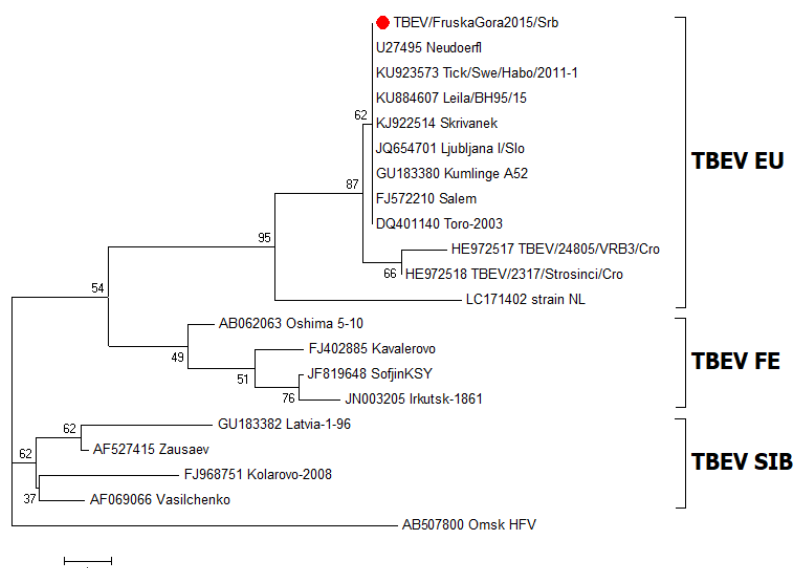
Присуство и раширеност вируса крпељског енцефалитиса (ВКЕ)

Крпељски енцефалитис (КЕ) је вирусно обољење распрострањено у подручју средње и источне Европе и Азије, које се преноси путем заражених крпеља. Болест се јавља ендемски, односно само у природним активним жариштима у којима постоје природни резервоари вируса (ситни глодари). Вирус се не преноси са животиња на другу животињу нити са човека на човека, али се може пренети са животиње на човека путем анималних производа и то пре свега конзумирањем не пастеризованог млека и млечних производа домаћих преживара (најчешће коза и говеда) (27,28). Осим тога, искључиви преносиоци вируса су крпељи и то готово по правилу из рода *Ixodes*. Крпељ може да буде заражен у свим стадијумима свог животног циклуса, и доживотни је носилац ВКЕ, који се у њему размножава и преноси трансваријално са једне на другу генерацију крпеља. Код животиња највише су забележене клинички манифесне инфекције код паса (29) и коња (30), а асимптоматски код домаћих преживара, што уједно представља и значајан епидемиолошки проблем због преноса вируса на људе (27,28,31).

На подручју бивше Југославије први налази – изоација вируса из крви инфициране особе у Словенији потичу још из 1953.године (32). У том периоду и касније су бележени налази присуства ВКЕ на западном делу бивше Југославије, пре свега Републике Словеније, као ендемском подручју. На подручју Србије такви налази тада нису утврђени (33). Међу прве налазе присуства ВКЕ у Србији спадају серолошка испитивања која су спроведена методом инхибиције хемаглутинације на 1726 узорака крвних серума здравих људи узоркованих на подручју Републике Србије у периоду од 1962. до 1969. године, присуство специфичних антитела против ВКЕ је утврђено код 1,1% до 52,6% испитаника (код 1,1% испитаних на подручју Срема, 2% на подручју централне Србије, 3,6% на подручју источне Србије, 7,3% на подручју Београда, 8,4% на подручју Баната, 19,4% на подручју западне Србије, 37,8% на подручју Косова и 52,6% испитаних на подручју Санцака), а вирус је изолован из крпеља на подручју Санцака 1972. године (33,34). Скорије спроведена серолошка испитивања присуства ВКЕ ЕЛИСА тестом су утврдила присуство антитела против овога вируса код 7,9% (8/101) испитаних здравих људи на подручју Јужнобачког округа, док на подручју Нишавског округа није утврђен ниједан (0/80) позитиван налаз (35).

Неколико деценија након првих налаза и изостанка даљих истраживања, присуство вируса крпељског енцефалитиса (ВКЕ) је утврђено *real-time RT-PCR*, конвенционалним *RT-PCR* тестом и секвенционирањем генома у крпељима *Ixodes ricinus* прикупљеним током 2014. и 2015. године. Испитивањем 50 крпеља са два локалитета са Фрушке Горе и 15 локалитета у околини Београда утврђено је присуство ВКЕ код 2% (1/50) и 6,6% (30/450) испитаних крпеља и то на 2 од 17 локалитета (Андревље, Фрушка Гора и Манастирска шума-Раковица). Један од детектованих ВКЕ је и секвенциониран и молекуларно типизиран као западноевропски подтип вируса (графикон 3). Осим тога, ниска преваленција антитела против ВКЕ је утврђена ЕЛИСА тестом код 0,37% (1/267) испитаних крвних серума пацијената узоркованих у истом периоду на Инфективној клиници Клиничког центра Војводине (36).

Од података о присуству ВКЕ код животиња постоје скорашња серолошка истраживања која су спроведена на 200 узорака крвних серума животиња узоркованих током 2014. и 2015. године. У поменутих узорцима ЕЛИСА тестом је утврђено присуство специфичних антитела против ВКЕ код 17,5% (7/40) испитаних паса, 5% (1/20) коња, 12,5% (5/40) дивљих свиња, 2,5% (1/40) говеда и код 2,5% (1/40) испитаних срна. При томе, присуство специфичних антитела против ВКЕ није утврђено нити код једног (0/20) узорка испитаних крвних серума коза (36). Осим поменутог, вирус крпељског енцефалитиса је по први пут код животиња на подручју Србије утврђен 2017. године *RT-PCR* методом у узорцима крви болесног коња и кобиле из истог газдинства на подручју које покрива Ветеринарски специјалистички институт „Пожаревац“. Оболеле животиње су показивале симптоме неуролошких поремећаја са епилептиформним нападима са смртним исходом на крају (37).



Графикон 3. Молекуларна типизација ВКЕ утврђеног у крпељу врсте *Ixodes ricinus* на подручју Фрушке Горе (означен кружићем) у односу на референтне вирусе и изолате доступне у банци гена (NCBI GenBank). TBEV EU = сојеви западно-европског подтипа ВКЕ; TBEV FE = сојеви далеко-источног подтипа ВКЕ; TBEV SIB = сојеви сибирског подтипа ВКЕ.

Присуство и раширеност Усугу вируса (УСУВ)

Усугу вирус (УСУВ) је изолован први пут 1959. године из комараца врсте *Culex neavei* поред реке Усугу у држави Свазиланду (од скоро Есватини - јужни део Африке) по којој је вирус добио име (38). Први хумани изолати су детектовани 1981. и 2004. године код оболелих особа на подручју Централноафричке Републике и Буркине Фасо (39). У Европи је присутност УСУВ доказана први пут 2001. године у Аустрији код птица крвова (*Turdus merula*) (40), а следећих година и у другим европским државама. Недавно објављеним истраживањем потврђена је присутност вируса у архивским узорцима ткивима угинулих птица из 1996. године на подручју Италије, указујући на то да је УСУВ био присутан на подручју Европе и пре 2001. године (41).

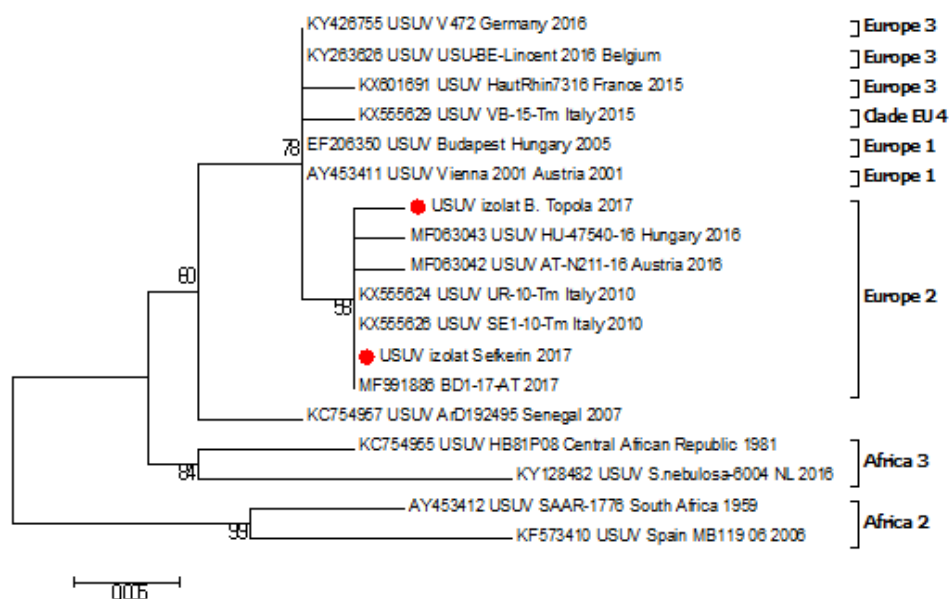
Природни циклус УСУВ сличан је циклусу вирусом Западног Нила. Резервоари и природни домаћини вируса су различите врсте дивљих птица, а главни вектори комарци рода *Culex* иако је вирус доказан и у другим врстама комараца. (42,43,44). Код инфицираних птица могу се развити различити клинички облици болести који варирају од асимптоматске инфекције до масовних угинућа услед мултисистемске инфекције. Леталне инфекције УСУВ забележене су код птица из реда певачица (Passeriformes) од којих је најосетљивије врсте кос (*Turdus merula*), затим врабац (*Passer domesticus*) и сврака (*Pica pica*) као и птице из реда сова (Strigiformes). Код високо пријемчивих врста птица УСУВ показује широк ткивни тропизам умножавајући се у различитим ткивима (централном нервном систему, мишићном ткиву, фибробластима, епителним ћелијама црева и респираторног тракта, лимфатичном ткиву и сл.), што узрокује отказивање функција већег броја органа и угинуће инфициране јединке. Ток болести је најчешће акутан или перакутан, често без развоја значајнијег имунског одговора (43,44).

Експерименталним инфекцијама је доказано да гуске и кокошке могу бити инфициране УСУВ али не показују клиничке знакове болести и само повремено излучују вирус. Људи, као и коњи, након инфекције УСУВ имају низак ниво вiremije те постају случајни крајњи домаћини вируса са којих се вирус даље не може пренети („слепа улица“ за даље ширење вируса). Клиничке манифестације код људи и коња нису честе али се у односу на досадашње забележене случајеве може рећи да су веома сличне онима које изазива вирус Западног Нила. Већи број инфекција

протиче асимптоматски, а ређе са јавља грозница и само у малом броју случајева неуролошке манифестације као резултат енцефалитиса и енцефалитиса (42,43,44).

Према до сада објављеним подацима, УСУВ је доказан код птица и комараца на подручју Аустрије, Мађарске, Шпаније, Италије и Белгије. Осим тога, инфекција УСУВ је серолошки доказана код дивљих птица у Енглеској, Чешкој, Немачкој, Италији, Пољској, Шпанији и Швајцарској (42,43,44), док је у Италији 2009. године први пут описана сероконверзија код коња (45). У Србији је први пут утврђено присуство антитела против УСУВ код дивљих птица током 2012. године приликом тестирања на присуство вируса Западног Нила (15). Присуство антитела против Усуту вируса код коња је први пут детектовано у Србији 2009., а у Хрватској 2011. године (18,46). Ови налази, који су несумњиво указивали на присуство и циркулацију вируса на подручју како Србије, тако и Хрватске су били основ за даља истраживања, пре свега на пољу присуства специфичних антитела код људи. У Србији су током 2015. године извршена тестирања крвних серума 88 особа, са могућим ризиком изложености арбовирусним инфекцијама које се преносе комарцима, са подручја Јужнобачког округа ЕЛИСА тестом. Присуство антитела против Усуту вируса су утврђена код 5% (4/88) испитаника (35). У Хрватској је током 2012. године утврђено присуство специфичних антитела против Усуту вируса код једне особе са подручја Вуковара, а током 2013. године су утврђени и први клинички случајеви Усуту вирусне инфекције код људи (3 пацијента са неуроинвазивном формом болести (менингитис и менингоенцефалитис) са подручја Загреба) (43,47). Иначе, први случај Усуту вирусне инфекције код људи на подручју Европе је забележен у Италији (48).

Присуство самог Усуту вируса је по први пут у Србији детектовано *real-time RT-PCR* и класичним *RT-PCR* тестом код 0,9% (2/216) збирних узорак комараца узоркованих на подручју Јужнобачког округа током 2015. године (42), као и у 2,75% (3/109) испитаних збирних узорак комараца врсте *Culex pipiens* узоркованих на подручју Војводине током 2017. године (49). Два детектована Усуту вируса у комарцима током 2017. године су секвенционирани и молекуларно типизирани као УСУВ линије 2 европског подтипа вируса (графикон 4). Овим истраживањима су потврђени сви претходни серолошки налази код животиња и људи на подручју Србије.



Графикон 4. Молекуларна типизација 2 детектована УСУВ утврђених у комарцима на подручју Бачке Тополе и Сеферина (означени кружићем) у односу на референтне вирусе и изолате доступне у банци гена (*NCBI GenBank*). Легенда са десне стране представља различите линије УСУВ.

Уместо закључка

Циљ овога рада је био да прикаже истраживања која су на тему епидемиологије и дијагностике флавирусних инфекција рађена на подручју Србије у протеклих десетак година и да на тај начин прикаже актуалну епидемиолошку и епизоотиолошку ситуацију, као и мере надзора ВЗН које се тренутно предузимају у Републици Србији. Приказани резултати истраживања су већ дали одговор на нека питања присуства неких флавирусних инфекција као и раширености њихове појаве, када је реч о вирусу Западног Нила кроз досадашње годишње програме праћења, али исто тако су отворила многа друга питања, пре свега везана за учесталост појаве и раширеност ВКЕ и УСУВ. Такође, ту су и питања међусобног утицаја ове три вирусне инфекције како по питању проблема диференцијалне дијагностике услед сличног клиничког испољавања, тако и по питању опасности по здравље људи и животиња. За разумевање истинског значаја налаза и преваленције различитих флавируса за јавно здравље у Републици Србији, неопходно је спровести детаљнија серо-епидемиолошка, клиничка и вирусолошка истраживања. Осим тога, као резултат све видљивијих климатских промена и ширења појединих вектора према северу, реално је очекивати појаву и неких других флавирусних инфекција које до сада нису биле присутне на подручју Србије. С тим у вези, даља истраживања су неопходна, укључујући нарочито перманентно праћење ширења вектора али и њихову инфизираност различитим патогеним узрочницима обољења животиња и људи, као и присуство тих патогених узрочника у популацији природних домаћина и резервоара. Сходно поменутом, неопходно је успостављање једног свеобухватног програма надзора на подручју Србије који би могао прикупити све потребне информације и дати одговоре неопходне за анализу ризика и адекватне мере превенције и контроле.

Захвалница: Рад је реализован по пројекту TP31084 финансираном од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Литература:

1. Martin-Acebes MA, Saiz JC. West Nile virus: a re-emerging pathogen revisited. *World J Virol* 2012;1(2):51-70. 2. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JH. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 1940; 20, 471-492. 3. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 Strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis* 2003; Vol 9, No 3, 311-322. 4. Hrnjaković-Cvjetković I, Cvjetković D, Petrić D, Milošević V, Jerant-Patić V, Zgomba M. Savremena saznanja o infekciji virusom Zapadnog Nila. *Medicinski Pregled* 2009; Vol. 62, No5/6, 231-235. 5. Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, Lelli R. Epidemiology of West Nile in Europe and the Mediterranean basin. *The Open Virol J* 2010; No 4, 29-37. 6. Weissenböck H, Hubálek Z, Bakonyi T, Nowotny N. Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet. Microbiol* 2010; 140, 271-280. 7. Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulou K, Vazquez A, Tenorio A, Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg Infect Dis* 2011; Vol 17, 920-922. 8. Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, Nowotny N. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(4), 618-623. 9. Savini G, Capelli G, Monaco F, Polci A, Russo F, Di Gennaro A, Marini V, Teodori L, Montarsi F, Pinoni C, Pisciella M, Terregino C, Marangon S, Capua I, Lelli R. Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet Microbiol* 2012; 158 No 3-4, 267-273. 10. Valiakos G, Touloudi A, Iacovakis C, Athanasiou L, Birtsas P, Spyrou V, Billinis C. Molecular detection and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 2 in sedentary wild birds (Eurasian magpie), Greece, 2010. *Euro Surveill* 2011; 16(18):pii=19862. 11. Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Szeeredi L, Ratz F, Skare J, Bakonyi T. Clinical and pathological features of lineage 2 West Nile virus: Infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2007; Vol 7, No 2, 181-188. 12. Platonov AE, Fedorova MV, Karan LS, Shopenskaya TA, Platonova OV, Zhuravlev VI. Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol Res* 2008;

103, Suppl 1, 45-53. **13.** Wodak E, Richter S, Bagó Z, Revilla-Fernández S, Weissenböck H, Nowotny N, Winter P. Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet Microbiol* 2011; 149, No 3-4, 358-366. **14.** Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D, Monachetti A, Tavio M, Del Gobbo R, Capobianchi MR, Menzo S, Nicoletti L, Magurano F, Varaldo PE. Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy. *Euro Surveill*. 2011; Vol 16, No 43, pii=20002. **15.** Petrović T, Blazquez A, Lupulović D, Lazić G, Escibano-Romero E, Fabijan D, Kapetanov M, Lazić S, Saiz JC. Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Eurosurveillance* 2013; Vol 18, 44, 1-8. **16.** Linke S, Niedrig M, Kaiser A, Ellerbrok H, Muller K, Muller T, Conraths FJ, Muhle RU, Schmidt D, Koppen U, Bairlein F, Berthold P, Pauli G. Serologic evidence of West Nile virus infections in wild birds captured in Germany. *Am J Trop Med Hyg* 2007; Vol 77, 358-364. **17.** Blitvich BJ. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim Health Res Rev* 2008; 9(1), 71-86. **18.** Lupulović D, Martín-Acebes M, Lazić S, Alonso-Padilla J, Blázquez A-B, Escibano-Romero E, Petrović T, Saiz JC. First Serological Evidence of West Nile Virus Activity in Horses in Serbia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2011; Vol. 11, No9, 1303-05. **19.** Medić S, van den Hoven R, Petrović T, Lupulović D, Nowotny N. Serological evidence of West Nile virus infection in the horse population of northern Serbia. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(7):914-918. doi:10.3855/jidc.3885. **20.** Petrović T, Lazić S, Lupulović D, Lazić G, Bugarski D, Vidanović D, Stefan-Mikić S, Milošević V, Hrnjaković-Cvetković I, Petrić D. Serological study on WNV presence in horses in Vojvodina after the human outbreak in Serbia in 2012. *Arch Biol Sci Belgrade* 2014; 66 (2), 473-481. DOI:10.2298/ABS1402473P. **21.** Petrović T., Lupulović D., Petrić D., Vasić A., Hrnjaković-Cvetković I., Milošević V., Vidanović D., Šekler M., Lazić S., Đuričić B., Plavšić B., Saiz J.: Groznica zapadnog Nila - značajna vektorska virusna infekcija u Srbiji: aktuelna situacija = WNV infection - an emergent vector borne viral infection in Serbia: Current situation. *Veterinarski glasnik*, 69, 1-2, 111-126, 2015. **22.** Petrić D, Hrnjaković Cvjetković I, Radovanov J, Cvjetković D, Jerant Patić V, Milošević V, Kovačević G, Zgomba M, Ignjatović Čupina A, Konjević A, Marinković, D, Paz Sánchez-Seco M. West Nile virus surveillance in humans and mosquitoes and detection of cell fusing agent virus in Vojvodina province (Serbia). *HealthMED* 2012; Vol. 6, No 2, 462-468. **23.** European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Reported cases of West Nile fever for the EU and neighbouring countries. Situations update 30. November 2012. [Pristupljeno 16 dec 2012]. **24.** Popović N, Milošević B, Urošević A, Poluga J, Lavadinović L, Nedeljković J, Jevtović D, Dulović O. Outbreak of West Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012. *Euro Surveill*. 2013;18(43):pii=20613. **25.** Petrović T., Šekler M., Petrić D., Lazić S., Lupulović D., Lazić G., Debeljak Z., Bugarski D., Plavšić B.: West Nile virus surveillance program in Serbia = Program nadzora prisustva virusa zapadnog Nila u Srbiji. *Arhiv veterinarske medicine*, ISSN 1820-9955, 7, 2, str.29-45, 2014. **26.** Petrović T., Šekler M., Petrić D., Lazić S., Debeljak Z., Vidanović D., Ignjatović Čupina A., Lazić G., Lupulović D., Kolarević M., Plavšić B.. Methodology and results of integrated WNV surveillance programmes in Serbia. *PLoS ONE* 2018, 13(4): e0195439. **27.** Hudopisk N, Korva M, Janet E, Simetinger M, GrgičVitek M, Gubnšek J, et al. Tick-borne encephalitis associated with consumption of raw goat milk, Slovenia, 2012. *Emerging Infect Dis*. 2013;19(5):806-8. **28.** Balogh Z, Ferenczi E, Szeles K, Stefanoff P, Gut W, Szomor KN, et al. Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *J Virol Methods*. 2010;163(2):481-5. **29.** Pfeffer M, Dobler G. Tick-borne encephalitis virus in dogs-is this an issue? *Parasit Vectors* 2011; 4:59. **30.** Klaus C, Horugel U, Hoffmann B, Beer M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: Clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Vet Microbiol* 2013; 163: 368-72. **31.** Caini S, Szomor K, Ferenczi E i sur. Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011. *Euro Surveill* 2012;17(12):pii=20128. **32.** Vesenjāk-Zmijanac J, Bedjanić M, Rus S, Kmet J. Virus meningoencephalitis in Slovenia: 3. Isolation of the causative agent. *Bulletin of the World Health Organization*. 1955;12 (4):513-20. **33.** Petrović, V.; Ristanović, E.; Potkonjak, A.; TBE in Serbia. In: Dobler, G.; Erber, W.; Schmitt H.J. Eds: TBE-The Book. Global Health Press 2017. Available online: <https://id-ea.org/tbe/tbe-countries-serbia/>. **34.** Bordjoski M, Gligic A, Boskovic R. Arbovirus infections in Serbia. *Vojnosanitetski pregled*. 1972;29(4):173-5. **35.** Hrnjakovic Cvjetkovic I, Patić A, Nikolic N, Radovanov J, Kovačević G, Galovic JA, et al. Seroprevalence of West Nile Virus and Tick-borne encephalitis virus in South Backa

District and Nisava District. Abstract book of 48th Days of Preventive Medicine. Nis, Serbia. 2014: 35-48 P. 35. **36.** Potkonjak A, Petrović T, Ristanović E, Lalić I, Vračar V, Savić S, Turkulov V, Čanak G, Milošević V, Vidanović D and others. Molecular Detection and Serological Evidence of Tick-Borne Encephalitis Virus in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017; doi:10.1089/vbz.2017.2167. **37.** Živojinović M., Stokić Nikolić S., Dobrosavljević I., Lazić M., Radojičić S., Stojanović M., Veljović Lj., Miličević V. Krpeljski encefalitis u Srbiji. *Zbornik radova i kratkih sadržaja*, 28. Savetovanje veterinara Srbije, Zlatibor 07-10. septembar 2017.godine, 109-113. **38.** Williams MC, Simpson DI, Haddow AJ, Knight EM. The isolation of West Nile Virus from man and of Usutu virus from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites* (Theobald) in the Entebbe area of Uganda. *Ann Trop Med Parasitol* 1964;58:367-74. **39.** Nikolay B, Diallo M, Boye CSB, Sall AA. Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:1417-23. **40.** Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis* 2002;8:652-6. **41.** Weissenböck H, Bakonyi T, Rossi G, Mani P, Nowotny N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg Infect Dis* 2013;19:274-7. **42.** Hrnjaković Cvjetković I., Petrović T., Petrić D., Milosević U., Radovanov J., Kovacević G., Jovanović Galović A., Patić A., Nikolić N., Cvjetković D., Stefan Mikić S., Milosević V. Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Arhiv veterinarske medicine* 2017, Vol 10, No 1, 25-35. **43.** Vilibić-Čavlek T., Barbić Lj., Stevanović V., Mlinarić-Galinović G. Usutski virus: novi Flavivirus u Hrvatskoj. *Liječnički Vjesnik* 2015;137:46-51. **44.** Juan-Carlos S., Blázquez A-B. Usutu virus: current knowledge and future perspectives. *Virus Adaptation and Treatment* 2017;9. **45.** Savini G, Monaco F, Terregino C i sur. Usutu virus in Italy: An emergence or a silent infection. *Vet Microbiol* 2011;151:264-74. **46.** Barbic L, Vilibic-Cavlek T, Listes E., Stevanović V., Gjenero-Margan I., Ljubin-Sternak S., Pem-Novosel I., Listes I., Mlinarić-Galinović G., Di Gennaro A., Savini G. Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2013;13: 772-4. **47.** Vilibic-Cavlek T., Kaic B., Barbic L. et al.: First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. *Infection*, 42, 4, 689-95, 2014. **48.** Pecorari M., Longo G., Gennari W., Grottola A., Sabbatini A., Tagliacuzzi S., et al.: First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveillance*, 14, 50, 19446, 2009. **49.** Petrović T., Lazić G., Ignjatović Čupina A., Lazić S., Lupulović D., Samojlović M., Hrnjaković Cvjetković I., Milošević V., Petrić D. Prisustvo Usutu virusa na području Vojvodine u 2017. godini. *Book of Abstracts, XX Simpozijum epizootiologa i epidemiologa*, 8.-20. april 2018., Vrnjačka Banja, 48-49.

УЛОГА ДИЈАГНОСТИЧКИХ ЛАБОРАТОРИЈА У СУЗБИЈАЊУ
ЗАРАЗНИХ БОЛЕСТИ ЖИВОТИЊА

*THE ROLE OF DIAGNOSTIC LABORATORIES IN THE
CONTROL OF INFECTIOUS ANIMAL DISEASES*

*Соња Радојичић¹, Мирослав Валчић¹, Милена Живојиновић², Наташа Стевић¹,
Милован Миловановић¹, Будимир Плавишић³, Весна Милићевић⁴*

¹Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду,

²Ветеринарски специјалистички институт Пожаревац;

³Управа за ветерину, Министарство пољопривреде шумарства и водопривреде, Република Србија;

⁴Научни институт за ветеринарство Србије, Београд

Кратак садржај

У процесу брзог препознавања нарочито опасних заразних болести подједнако су важни сви елементи ветеринарске струке. Управа за ветерину која има кључну улогу у праћењу епизоотиолошке ситуације у земљи, региону и глобално у свету као и у координацији ветеринарске струке, ветеринари на терену и у дијагностичким лабораторијама представљају нераскидиву целину која уколико не функционише у складу са принципима добре ветеринарске и лабораторијске праксе, може да има несагледиве последице не само за једну земљу, већ и цео регион. У блиској прошлости било је више примера који доказују значај доброг функционисања читавог система. Улога дијагностичких лабораторија је у том контексту последњи и најважнији чинилац који неку сумњу на заразну болест потврђује или одбацује. Из тог разлога, значај унапређења рада дијагностичких лабораторија је од међународног интереса па се и Светска организација за заштиту здравља животиња (ОИЕ) укључује организовањем такозваних „*twinning*“ пројеката (заједничких, партнерских, међународних пројеката) чији је циљ унапређење капацитета и стручности као и комуникација између референтних и националних лабораторија. Овакви пројекти у крајњој линији директно утичу на јачање глобалног надзора заразних болести, као и повећања спремности за откривање, спречавање ширења и контролу таквих болести. У прилог чињеници да улога и значај дијагностичких лабораторија превазилазе интересе и границе једне земље, говори и успостављен систем акредитације лабораторија у Републици Србији.

Кључне речи: дијагностика, заразне болести, лабораторије, *twinning* пројекти, акредитација

Некада и сада

Пре више од две деценије започеле су промене у нивоима функционисања ветеринарских дијагностичких лабораторија. У то време, основни постулати су били усмерени на одговорности ветеринарских лабораторија које се баве заразним болестима. Тада су формиране три групе лабораторија према одговорностима и задацима које такве лабораторије обављају. У првој групи су биле укључене централне или националне ветеринарске лабораторије, националне или међународне референтне лабораторије, са високим биосигурносним нивоима као и регионалне или државне ветеринарске дијагностичке лабораторије. Главна улога ових лабораторија је била у пружању помоћи националним лабораторијама у дијагностици нарочито опасних заразних болести животиња. Другу групу лабораторија чиниле су оне са производним погонима за формулацију дијагностичких китова и производњу ветеринарских вакцина. Трећу групу су чиниле ветеринарске истраживачке лабораторије које су се углавном концентрисале на научна истраживања и на тај

начин индиректно доприносило побољшању дијагностике заразних болести животиња (1). Већ 2000. године на међународном нивоу започело је активно успостављање система квалитета у ветеринарским лабораторијама са тада важећим издањем Стандарда ISO/IEC 17025:1999 (Општи захтеви за компетентност лабораторија за испитивање и лабораторија за еталонирање) (6). Друго издање стандарда из 2006. године данас се замењује трећим издањем из 2017. године (SRPS ISO/IEC 17025:2017). Као и претходна издања, овим међународним стандардом се утврђују општи захтеви за компетентност, непристрасност и конзистентност у раду лабораторија на начин који је дефинисан у овом стандарду (11).

Заразне болести и њихова дијагностика

Брзо препознавање неке болести представља темељ за њену успешну контролу и ерадикацију. У самом дијагностичком процесу учествују бројни фактори чији је редослед важности различит и зависи од конкретне ситуације. Тако на пример у случају појаве клиничких манифестација болести, процес дијагностике започиње од самог власника, а затим и од ветеринара практичара који долазе на лице места и врше клинички преглед сумњивих и оболелих животиња. Процес дијагностике се најчешће завршава у специјализованим лабораторијама у које се шаље адекватан материјал за преглед. У том смислу, најважнија улога лабораторија је у откривању заразних болести и посебно оних које имају значајан потенцијал ширења у које се убрајају и прекограничне, односно оне које се први пут јављају на територији неке земље.

Уз то, дијагностичке лабораторије имају и друге важне улоге а то је пре свега учешће у присмотри (*surveillance*, енгл), која је из угла епизоотиологије један од најважнијих поступака у контроли неке болести. Поред тога, често занемариван и недовољно коришћен капацитет дијагностичких лабораторија је интерпретација добијених резултата, али и саветодавна улога, која, бар по искуствима ветеринара практичара у нашој земљи, често изостаје.

Као последњи и кључни фактор у постављању дијагнозе, лабораторије данас имају огромну улогу у читавом ланцу ветеринарских услуга. Постављање дијагнозе на основу епизоотиолошке анамнезе, клиничке слике или резултата обдукције, бар када су заразне болести животиња у питању, данас је незамисливо. У таквим би случајевима откривање, контрола и превенција заразних болести животиња значајно изгубила на ефикасности, а последице би биле несагледиве (3). Дијагностичке лабораторије у складу са концептом да "тест одговара намени, односно сврси" могу да:

1. Докажу да је популација животиња слободна од неке болести односно инфекције (преваленција једнака нули) и то:
 - а-Статус слободна са или без вакцинације;
 - б-Статус слободна са историјског аспекта/никада није регистрована на некој територији;
 - в-Статус поново успостављена слобода као последица ерадикације, а након избијања болести на некој територији;
2. Докажу статус слободан од инфекције или етиолошког агенса код појединачних животиња или производа пореклом од животиња у циљу безбедне трговине;
3. Докажу ефикасност ерадикационих програма;
4. Дијагностикују клиничке случајеве болести;
5. Процене преваленцију болести односно инфекције како би се извршила адекватна анализа ризика;
6. Утврде имунолошки статус код појединачних животиња или у популацији односно групи животиња након вакциналних кампања (9).

Када се говори о дијагностичким лабораторијама углавном се мисли на оне које су у јавном сектору и које су у вези са државном организацијом, али не треба заборавити ни потенцијални приватни сектор и посебно онај везан за индустрије. Ипак, у борби са заразним болестима примарну улогу имају лабораторије које су у државном сектору. Организација ветеринарских дијагностичких лабораторија у државном сектору се разликује од земље до земље, али без обзира на то, свака од њих треба да има такав систем управљања који обезбеђује одговорно, транспарентно, етично, напредно и поштено испитивање и пласирање добијених резултата (8,9,10).

Као и у свим земљама које пролазе дугогодишњи период транзиције, можемо рећи да се данас као један од најважнијих фактора издваја поверење јавности и појединца у добијене резултате испитивања. У том смислу, посебна пажња се обраћа на успостављање система квалитета лабораторија у земљама у развоју и транзицији, како би се добијени резултати заснивали на научним сазнањима и опште прихваћеним стандардима, и како би се спречила коруптивна пракса, али и политички утицаји (4). Националне ветеринарске службе различитих земаља организоване су мање или више за вршење различитих послова везаних за заштиту здравља животиња, али и за безбедност хране која је последњих година у фокусу светске јавности.

Кључни елементи неопходни за одговоран рад ветеринарских дијагностичких лабораторија су дефинисано власништво, одговорност и надзор, извршни менаџмент, инфраструктура, људски ресурси, здравље и безбедност, биосигурност, добробит животиња, поштовање прописа у раду са модификованим генима или њиховим производима и очување животне средине. У развијеним земљама посебан акценат се ставља на здравље и безбедност лабораторијског особља, али и на рад са генетичким материјалима и посебно на очување животне средине која је регулисана међународним стандардом SRPS ISO 14001:2005 (Системи управљања заштитом животне средине-захтеви са упутством за примену). Ова потенцијално слаба места у раду лабораторија треба да буду регулисана са посебном пажњом у складу са стандардом, прописима и законима (4,5).

Како се последњих година дешавају значајне промене дистрибуције такозваних прекограничних односно егзотичних болести (*transboundary, foreign diseases*) које се рапидно шире на територије на којима гледано кроз историју, никада нису биле дијагностиковане, њихов утицај на економију, трговину и сигурност хране за велики број земаља света је несумњив. То истиче важност дијагностичких лабораторија као битног чиниоца у стратешком приступу контроле зараза. Саме карактеристике таквих болести указују да је земља у којој је дошло до појаве епизоотије, проблем целог региона или континента, а многе од њих су показале да је светска дистрибуција реалност са којом се свакодневно суочавамо. Последњих година велики проблем представљају болести са зоонозним потенцијалом као што је Грозница западног Нила, високо патогена авијарна инфлуенца која има размере панзотије, али и потенцијална могућност ширења грознице долине Рифт која је у току 2018. године пријављена по први пут у неким афричким земљама у којима никада није забележена (2). Ово су само неке болести које представљају глобални проблем садашњости и блиске будућности.

Основни циљеви Националних ветеринарских лабораторија који се доносе у складу са државним приоритетима су:

- брза и тачна дијагностика заразних болести;
- доношење стратегија за сузбијање, контролу и евентуално ерадикацију прекограничних, нарочито опасних заразних болести које угрожавају економију земље и имају утицај и на здравље људи;
- развијање, координација и имплементације програма за контролу прекограничних болести;
- координација и сарадња са другим земљама посебно земљама региона у континуираној контроли и евентуално ерадикацији нарочито опасних прекограничних болести које имају изразит негативан економски утицај на здравље животиња, али и људи када су у питању зоонозе;
- мониторинг, оцена и изналажење најефикаснијих и најисплатнијих метода контроле таквих болести које имају социоекономске последице;
- учествовање у доношењу кризних планова за нарочито опасне заразне болести.

У Републици Србији, у дијагностици заразних болести, спровођењу Програма мера здравствене заштите животиња Управе за ветерину при Министарству пољопривреде, шумарства и водопривреде, спровођењу мониторинга, пасивној и активној пристојности заразних болести највећим делом учествују лабораторије организоване при научним и специјалистичким ветеринарским институтима Републике Србије које су у успостављеном систему акредитације која је део система Акредитационог тела Србије као међународно признатог тела. За разлику од

развијених земаља света у којима се дијагностичке лабораторије при Универзитетима односно Факултетима високо котирају и имају лидерску позицију (12), у нашој земљи то није случај, а институције високог образовања остају на маргинама дешавања са минималним учешћем у пласирању резултата испитивања и релативним учешћем у саветодавним телима.

Капацитети и организација ветеринарских дијагностичких лабораторија су прилично различити и у директној су вези са економским могућностима неке земље. У земљама попут Сједињених Америчких Држава (САД) систем ветеринарских лабораторија је на основу квалитета и оспособљености подељен на три нивоа. Тако на пример, услови за постизање првог нивоа подразумевају бројне факторе оспособљености који подразумевају:

- огроман капацитет за тестирање узорака на оне болести које су од примарног државног интереса;
- учествовање у програмима прегледа које прописује Министарство пољопривреде САД;
- акредитацију од стране одговарајућих акредитационих тела;
- беспрекоран менаџмент за обављање свих послова у систему управљања квалитетом;
- стручно и обучено особље за дату врсту испитивања;
- функционалан, континуиран систем за управљање лабораторијским информацијама (ЛИМС-*Laboratory Information Management System*);
- капацитет за слање резултата дијагностичких тестова у централну базу података;
- пружање помоћи у даљем развоју информационог система;
- издавање резултата испитивања у предвиђеном року;
- помагање другим лабораторијама у развијању информационог капацитета;
- обезбеђен и одржан биосигурносни ниво 3 лабораторија (ниво биосигурности одређује Центар за контролу болести - *CDC* у Атланти);
- адекватне изворе државног финансирања за одржавање опреме и лабораторијског простора;
- у складу са захтевима Министарства пружање испомоћи у особљу у друге лабораторије или на терену у случајевима избијања епизоотија или проглашења ванредних ситуација,
- обезбеђују адекватне обуке за особље на националном и међународном нивоу;
- прихватају узорке из других држава у оквиру САД које су погођене епизоотијама, посебно из лабораторија 2 и 3 нивоа односно нижег дијагностичког капацитета;
- помажу у развоју и валидацији одређених дијагностичких процедура;
- учествују у организовању обука, тренинга и вежби симулирања појаве болести, и
- учествују у периодичним проверама које организује Министарство пољопривреде САД (3).

За лабораторије 2 и 3 нивоа прописани су знатно блажи критеријуми. Тако лабораторије 2 нивоа немају капацитете за тестирање великог броја узорака, могу имати привремену акредитацију од стране одговарајућег акредитационог тела, сви послови обезбеђења квалитета морају бити под надзором одговарајућег менаџмента и не морају да поседују биосигурносни ниво 3, док се услови за постизање 3 нивоа односе на стручно и квалификовано особље које може о потреби да учествује у програмима прегледа које прописује Министарство, као и успостављен контролисани систем квалитета и лабораторијског информационог система (3).

Са друге стране, велики број земаља неразвијеног дела света нема опремљене лабораторије нити стално запослено особље. Примера ради, у Уганди поједини дистрикти од укупно 13 територијалних јединица, уопште немају дијагностичке лабораторије, а они који их имају, немају одговарајућу опрему или је она симболична. Стање у овој земљи и степен сиромаштва су толико драматични, да се у таквим лабораторијама налази по један или два светлосна микроскопа, фриџидер и ретко замрзивач, док већина лабораторија нема стерилизатор, аутоклав, вагу или водено купатило. Такође, у овој земљи проблеми везани за лабораторије свде се на постојање извора струје (често нема електричне енергије већ су у питању генератори) док неке лабораторије немају ни текућу воду већ користе кишницу (7). Оваква диспропорција у лабораторијским капацитетима треба да буде део савести светских организација за очување здравља животиња и посебно због пропагирања концепта ``Једно здравље`` који је уведен 2000. године и који као идеја треба да функционише на нивоу целог света. У том смислу активност међународних институција

треба да буде значајно јача и вођена успостављеним принципима транспарентности, међународне солидарности, али и промоције ветеринарских служби посебно неразвијеног дела света.

Иницијатива за заједничке, *twinning* пројекте је покренута 2006. године и данас представља водећи програм ОИЕ-а за изградњу капацитета ветеринарских лабораторија. До данас је завршено 47 пројекта међу којима се налази и пројекат између Велике Британије и Уганде и који се односио на побољшање лабораторијских капацитета. У току је преко тридесет пројеката који се реализују на пет континената, док је осам одобрених пројекта треба да почне са реализацијом. На листи земаља које учествују у оваквим пројектима нема земаља из бивше СФРЈ. Овакви лабораторијски пројекти за циљ имају стварање капацитета и пласирање научне експертизе у земљама у развоју, као јединствени пут којим се омогућава размена знања, идеја и искуства између две стране и посебно као метод за побољшање лабораторијских капацитета и стручности у земљама у развоју и земљама у транзицији. Из оваквог вида сарадње у одређеним случајевима учесницима у заједничким пројектима се отвара могућност да постану референтне лабораторија ОИЕ. До сада, као резултат овакве сарадње формиран је један колаборативни центар и признате су четири нове референтне лабораторије (7). Ипак треба имати на уму да финансирање статуса референтне лабораторије на међународном нивоу треба да буде обезбеђено из националних извора, што ставља у неједнак положај земље чланице ОИЕ.

На крају, начело "Квалитет је путовање а не одредиште" ("*Quality is a journey, not a destination*"), остаје непревазиђена дефиниција стандарда квалитета којим се руководе све добро позициониране и на прави начин устројене дијагностичке лабораторије (5).

Захвалница: Рад је финансиран средствима пројеката Министарства науке и технолошког развоја, Р. Србије (ТР37015 и ТР31088).

Литература

1.Trusczyński, MJ, 1998, The role and importance of veterinary laboratories in the prevention and control of infectious diseases of animals Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 17 (2), 405-410. 2.Lazarus, DD, Woma, TY. Fasina FO, 2011, Veterinary Diagnostic laboratories and their Role in Transboundary Animal Disease Control, Vom Journal of Veterinary Science 8, 59-63. 3.<https://www.legis.iowa.gov/docs/publications/IR/861011.pdf>. 4.S. Edwards, S, Jeggo, MH, 2012, Governance and management of veterinary laboratories Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 31 (2), 493-503. 5.Schmitt BJ, 2003, Veterinary diagnostic laboratories and their support role for Veterinary Services, Rev Sci Tech. 22(2):533-6. 6.<http://www.naweb.iaea.org/nafa/aph/public/guidelines-eng-may02.pdf> Guidelines for Establishing Quality Systems in Veterinary Diagnostic Testing Laboratories Report of an Joint FAO/IAEA Consultants Meeting/Workshop organized by the Joint AO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory and Department for Technical Cooperation Vienna International Centre 4-8 September 2000. 7.Nakayima, J, Nerima, B, Sebikali, C, Magona, JW, 2016, An assessment of veterinary diagnostic services needs in Uganda, Journal of Veterinary Medicine and Animal health Vol. 8(7), pp. 50-55. 8.http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng-Health_standards/tahm/1.01.01_MANAGING_VET_LABS.pdf. 9.http://www.oie.int/fileadmin/Home/engHealth_standards/tahm/1.01.05_QUALITY_MANAGEMENT.pdf. 10.<http://www.oie.int/scientific-expertise/registration-of-diagnostic-kits/background-information/>. 11.http://www.iss.rs/standard/nat-standard_document_id=61635. 12.Schulz, LL, Hayes, DJ, Holtkamp, DJ, David A, Swenson, DA, 2018, Economic impact of university veterinary diagnostic laboratories: A case study, Preventive Veterinary Medicine 151 (2018) 5-12.

ЗНАЧАЈ ЕПИЗООТИОЛОШКЕ СЛУЖБЕ У СИСТЕМУ
ПРИСМОТРЕ ЗАРАЗНИХ БОЛЕСТИ ЖИВОТИЊА

*THE EPIZOOTIC IMPORTANCE IN THE SURVEILLANCE
OF INFECTIOUS ANIMAL DISEASES*

*Мирослав Валчић¹, Соња Радојичић¹, Зоран Дебељак²,
Наташа Стевић¹, Милован Миловановић¹*

¹Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду,

²Ветеринарски специјалистички институт, Краљево

Кратак садржај

Епизоотиолошка служба у оквиру система здравствене заштите животиња и делокруг рада Управе за ветерину (Управа) при Министарству које се бави пољопривредом било које земље, представља најзначајнију полуку управљања ветеринарским системом уопште. Због једноставности и ниске цене коштања, државне администрације се најчешће одлучују да се обавља истраживање постојања заразних болести у виду пасивног или активног надзора тј. мониторинга. Међутим, уколико би се за неко заразно обољење показало да представља значајан проблем, онда је боље да се примени истраживање у смислу присмотре.

Присмотра подразумева стално систематско сакупљање, анализу и интерпретацију специфичних података који су неопходни за планирање, примену и евалуацију рада ветеринара и примену адекватних мера. Дисеминација свих информација које се добију, интегрални је део присмотре.

Епизоотиолошка присмотра је најинтензивније праћење појављивања заразних болести, поремећаја продуктивности и добробити животиња. Она обухвата:

Сакупљање, бележење и анализирање података са терена,

Дисеминацију података заинтересованим институцијама и

Активности током спровођења мера чији је циљ контрола, сузбијање и искорењивање болести.

Као и надзор, и присмотра може да буде активна и пасивна.

Циљеви присмотре у епизоотиологији се поклапају са циљем ветеринарске медицине: одржавање здравственог стања животињских врста, заштита здравља људи од зооноза и контрола намирница анималног порекла. У новије време, присмотре се обављају и у односу на стање добробити животиња. Епизоотиолошка служба се нарочито бави брзом детекцијом жаришта обољења, идентификацијом здравствених проблема (ензоотије и епизоотије), проценом здравственог стања одређене популације, успостављањем приоритета у ветеринарској медицини, идентификацијом нових болести које угрожавају регион, евалуацијом мера за контролу, сузбијање и ерадикацију болести, сакупљањем информација ради планирања истраживања и потврђивањем одсуства појединих обољења.

Кључне речи: епизоотиологија, присмотра.

Увод

За свако епизоотиолошко испитивање може да се каже да обухвата све оне активности којима се постиже један или више од пет циљева епизоотиологије:

1. одређивање порекла обољења за које је узрочник (или узрок) познат,
2. испитивање и контрола обољења чији узрок није познат,
3. разјашњење и испитивање екологије и природне историје обољења,

4. дефинисање мера и програма чији је циљ контрола, сузбијање и искорењивање обољења и
5. испитивање економских параметара у ветеринарској медицини уопште.
У односу на различите критеријуме који се користе да би се поједина испитивања сврстала у групе
може да се каже да постоје следећа епизоотиолошка испитивања:
квалитативна и квантитативна, а у неким случајевима и комбинована,
проспективна и ретроспективна,
дијагностичка (клиничка, лабораторијска итд) и
просторна и временска.

Целокупни рад епизоотиолога може да се опише једном простом реченицом: сакупљање података и њихова анализа. У периодима времена када се наизглед у неком региону не појављују епизоотије и када су ензоотске болести под контролом, епизоотиолог обавља присмотру. Ради се о епизоотиолошком појму који подразумева проналажење случајева обољевања са циљем спровођења мера контроле, сузбијања и искорењивања, нарочито оних болести животиња које могу да значајно угрозе економски статус државе.

Епизоотиолошка присмотра обухвата већи број активности. У време када је борба са инфективним болестима била најзначајнији посао епизоотиолога (и епидемиолога), онсовно је било да се пронађе савки случај обољевања и да се разјасне сви путеви преношења. Међутим, данас је већина нарочито опасних инфекција под контролом или су мере за њихово сузбијање јасно дефинисане и прописане. Са друге стране, свест да је већина обољења, поремећаја продуктивности и угрожавања добробити животиња условљено већим бројем фактора, условила је да епизоотиолошка присмотра подразумева велики број разноврстних активности.

У данашње време, најзаступљенија су квантитативна епизоотиолошка испитивања у оквиру којих се налазе четири врсте и која се разликују по сложености, детаљима и интензитету сакупљања података.

Преглед (survey, енгл.) је испитивање група (агрегата) животиња при чему се броје јединке које су оболеле у односу на оне које су здраве. Обавља се на узорку из популације, а ретко када се испитује цела популација. Она могу да буду унакрсна (пресек стања) или лонгитудинална (у дужем временском периоду).

Проверавање (screening, енгл.) је облик испитивања којим се идентификују недиагностиковани случајеви обољења при чему се користе брзе, теренске методе које су по правили осетљиве и којима се одвајају вероватно оболеле од вероватно здравих јединки.

Надзор (monitoring, енгл.) и присмотра (surveillance, енгл.) су испитивања која су детаљнија. У оквиру надзора, обавља се рутинско посматрање и бележење здравственог стања, производних карактеристика и фактора спољшње средине у популацији животиња при чему идентитет јединки није од значаја.

Може да се каже да се у контексту проналажења случајева обољевања, користе два појма. Штавише, неки аутори испитивања која су детаљнија у поређењу са прегледом (survey, engl.) и проверавањима (screening, engl.), равномерно користе појмове под називима надзор (monitoring, engl.) и присмотра (surveillance, engl.).

Међутим, уопштено може да се каже да присмотра представља најинтензивнији метод који подразумева:

1. сакупљање, бележење и анализу података са терена,
2. дисеминацију података заинтересованим институцијама и
3. активности током спровођења мера чији је циљ контрола, сузбијање и искорењивање болести.

Једна од најприхватљивијих дефиниција присмотре јесте она која гласи: Ради се о сталном систематском сакупљању, анализи и интерпретацији специфичних података који су неопходни за планирање, примену и евалуацију рада ветеринара и које је интегрисано са што бржом дисеминацијом информација онима који то треба да знају.

Циљеви присмотре се поклапају са циљевима ветеринарске медицине: одржавање здравственог стања и добробити животињских врста, заштита здравља људи од зооноза и контрола намирница анималног порекла. Епизоотиолошка присмотра се нарочито бави брзом детекцијом жаришта обољења, идентификацијом здравствених проблема (ензоотије и епизоотије), проценом здравственог стања одређене популације, успостављањем приоритета у ветеринарској медицини,

идентификацијом нових болести које угрожавају регион, евалуацијом мера за контролу, субијање и ерадикацију болести, сакупљањем информација ради планирања истраживања и потврђивањем одсуства појединих обољења.

Врсте пристомотри се разликују у зависности од функције и методе. Најуопштенија је епизоотиолошка пристомотра. Пристомотра која се односи на неку посебну болест је детаљнија и она се нпр. спроводи током епизоотије класичне куге свиња.

Сентинел пристомотра

У ветеринарској медицини, а нарочито у епизоотиологији постоје страни изрази који тешко могу да се преведу користећи само једну реч (челенец - вештачка инфекција, емерцинг - болести које су нове за регион, појављују се по први пут, итд.). Корен речи (*sentinella*) потиче из италијанског језика и у буквалном преводу значи стражар. У контексту епизоотиологије, ради се о животињској врсти која за дати регион или локалитет, служи као индикатор појављивања неког обољења. Познајући природне историје појединих инфективних болести, као сентинел може да се сматра и нека дивља врста животиња; нпр. птице за источни енцефалитис коња. У неким случајевима пристомотра ће да се односи на већи број сентинел врста. У САД-у се нпр. обавља пристомотра кретања и појављивања вируса изазивача грознице западног Нила, контролисањем случајева код људи, коња, паса, мачака, дивљих птица, вектора и домаћих врста птица. Сентинел као појам може да се односи не само на поједину врсту већ и на поједине групе животиња (стада, јата, чопоре итд.). На пример, у циљу сентинел пристомотре болести плавог језика у Италији, 2000. године, цела земља је подељена на квадрате димензија 20×20 km. У сваком од квадрата одређено је по 59 сентинел говеда чији је серолошки статус проверен па је на тај начин установљено кретање не само болести плавог језика и вектора, већ су и детерминисани серотипови вируса.

Испитивање присуства специфичних антитела је један од најчешће коришћених метода пристомотре. На тај начин може да се установи не само обољење које је у току већ и контакт са узрочником током претходног периода. Серолошка пристомотра је незамењива у касним фазама спровођења мера контроле, сузбијања и ерадикације неког обољења. На пример, током спровођења мера ерадикације класичне куге свиња, а у случају да се не примењује вакцинација, неопходно је да се свиње које су ван жаришта серолошки провере да ли су биле у контакту са вирусом. Простор у виду прстена који се налази на периферији жаришта зависиће од природне историје болести (познавања самог обољења) и може да износи 3 km (слинавка и шап), а некада и преко 150 km (болест плавог језика).

Пристомотра може да буде активна и пасивна. У првом случају истражују се само оболеле животиње са клиничким симптомима. Пасивна пристомотра има за циљ стално праћење статуса обољевања при чему се користе подаци који се рутински добијају са терена. Извори информација су најчешће дијагностичке лабораторије или кланице. Основни недостатак пасивне пристомотре јесте могућност да се неки случајеви обољевања не пријаве. Међутим, пасивна пристомотра је од великог значаја приликом испитивања појављивања нових обољења у региону, она мање кошта и добар је основ успостављања квалитетних међусобних односа изимеђу сточара, ветеринара, лабораторије и ветеринарске инспекције. Активна пристомотра подразумева потрагу за обољевањем и то узимањем узорака и од клинички здравих животиња. Често се ради о посебним пројектима који указују на посвећеност ветеринарске службе у процесу сакупљања што већег броја информација о присуству обољења. На пример, у оквиру пасивне пристомотре, у Србији се сваки случај побачаја код преживара мора разјаснити у односу на узрок. Међутим, активна пристомотра би подразумевала узимање узорака и од животиња које нису gravidне и испитивање сероконверзије на изазиваче абортуса (Q грозница, нпр.).

Паралелно са пасивном и активном пристомотром, у новије време се спомињу појмови као што су циљна и глобална пристомотра. У случају циљне пристомотре, сакупљају се информације о специфичном обољењу у претходно дефинисаној популацији животиња. Најчешће се ради о узорку из целе популације који представља животиње под већим ризиком од обољевања. Глобална пристомотра представља активност непрестаног посматрања ензоотија, а циљ је да се уочи повећана инциденција и дефинишу фактори који утону на учесталију појаву болести.

Опште напомене и извори података

Постоји велики број различитих околности које доводе до погрешних података, а који су нетачни или делимично тачни, било због субјективних разлога или се ради о објективним околностима под којима се грешке јављају. Овакви подаци не могу да служе за епизоотиолошку анализу. Подаци могу да буду неажурни (када су се околности промениле), могу да се односе на погрешну карактеристику, недовољни или су последица системске грешке (бијаса).

Често се погрешни подаци добијају као последица изостанка сарадње сточара, ветеринара, инспектора и свих оних који треба да их доставе. Ово може да буде последица непознавања студије присмотре. Наиме, установљено је да се подаци лакше добијају ако су у оквиру планираних програма мера које се спроводе у држави. Међутим, и у том случају, сакупљање података треба да је у разумном временском периоду. Тако је нпр. током испитивања које је планирано да се обавља пет година (инконтиненција урина код куја), само 7% ветеринара у потпуности завршило студију. Погрешни подаци могу да се очекују и ако се ради о финансијским подацима (недостатак поверљивости), као и када је испитивање дуготрајно (губи се превише времена).

Посебни аспекти сакупљања података су финансијски и могућност праћења извора података. Очигледно је да сакупљање података кошта, а цена је одраз износа новца за лабораторијска испитивања, слање материјала, дневнице анкетара итд.

Што се тиче могућности праћења извора података током присмотре, ради се о начинима како може да се провери тачност података у односу на локацију, време и квалитет информације. У протеклих неколико деценија, велика пажња у свету се посвећује праћењу пута кретања не само живих животиња, већ и њихових производа. Почетни корак у овом процесу је идентификација појединачних животиња. У новије време, значајан напредак је учињен имплантацијом микрочипова што представља основу за добијање информација о свим карактеристикама појединачне животиње (старост, промет, резултати дијагностичких тестова, спроведене мере итд.). У Србији постоји неколико система за идентификацију животиња који се заснивају на ушним маркицама. На основу идентификације животиња, добијају се како основни подаци (дати рођења и угинућа као кретања) тако и информације у вези дијагностичких испитивања. Унос података је на различитим нивоима и то од власника фарме, ветеринара, ветеринарских инспектора, кланица, транспортних организација, ветеринарске управе итд. Истовремено са праћењем појединачних животиња у оквиру једне државе, национални системи постају и део глобалних организација које се баве контролом промета животиња и њихових производа. Основни разлог успостављања ових система је заштита од заразних болести, безбедност хране и контрола свих производа животињског порекла.

Епизоотиолошки подаци се добијају практично из свих расположивих извора. У неким државама, ветеринарска служба је довољно развијена па се подаци рутински уносе од стране не само ветеринара (амбуланте, станице, институти, управа), већ и од стране осталих који су у било ком контексту везани за узгој животиња и њихов поромет (власници фарми, транспортне организације, кланице, прерађивачка индустрија, зоолошки вртови итд.). У таквим случајевима, подаци могу да се нађу у банкама података Управе.

Ветеринарска управа (служба) неке државе, сакупља информације од националног интереса, а пре свега у односу на инфективне болести и безбедност намирница анималног порекла. У систему се најчешће налазе и дијагностичке лабораторије. На тај начин се добијају подаци који су са једне стране корисни за дату државу, а са друге стране, употребљавају се приликом подношења редовних извештаја организацији која је задужена за глобално праћење кретања заразних болести (OIE).

Када се говори о изворима података, треба да се нагласи да се најпоузданији подаци добијају од ветеринарских организација, било ког нивоа (теренска служба). У развијеним земљама постоји ветеринарска инфраструктура која омогућава да се разноврсне информације добију практично током рада службе. У земљама и/или регионима где ветеринарска служба није на високом нивоу, проблеми могу да настану како на терену тако и током преноса и анализовања информација.

Информације које користе епизоотиологи су пре свега настале током рада ветеринарске службе, а на пољу праћења заразних болести или обављања дијагностичких испитивања у акредитованим лабораторијама. Ови подаци могу да буду подложни системској грешци (бијас) ако је на пример, слање узорака у лабораторију на добровољној основи пошто у таквим случајевима узорак шаље заинтересовано лице (ветеринар). Подаци могу да се сакупљају када постоји систематска, најчешће периодична контрола па тако на пример, постоји обавеза да се једном годишње шаљу на преглед узорци серума у циљу испитивања преваленције бруцелоза. Међутим, често се ове врсте информација сматрају поверљивима па је неопходно да се добије дозвола за њихову употребу и анализу.

Епизоотиолошки подаци могу да се сакупљају од теренске службе ветеринарске медицине (амбуланте, станице), прегледача мяса, кланица (било ког типа), евиденције породичних газдинстава и имања, фармацеутских компаније и дистрибутера лекова и биолошких препарата, произвођача хране за животиње (љубимце или сточне хране), зоолошких вртова, пољопривредне стручне службе и организација (задруге на пример). Нарочито се значајни подаци могу да добију од организација и система који су организовани као удружења сточарске производње (свињарска индустрија, удружења млекарске индустрије итд), од ловачких организација или репродуктивних центара (центри за вештачко осемењавање или служба лиценцирања).

Основни ниво пристоуре не мора да се односи на активност ветеринара односно, епизоотиолога. Подаци могу да се сакупљају на нивоу фарме при чему власник пољопривредног газдинства пре свега обраћа пажњу на утицај болести на продуктивност животиња и на болести које може сам да контролише.

У случају да се информације планирају да сакупљају од теренске ветеринарске службе, постоји могућност да власници животиња не доводе оболеле животиње на преглед, не пријављују болест или ветеринарске амбуланте и станице не желе да деле информације са другима. У случају да се подаци сакупљају на кланицама, постоји могућност грешке с обзиром да се на клање обично шаљу клинички здраве животиње. Уопштено говорећи, подаци који се добијају са кланица пре свега служе за анализу информација које се односе на намирнице анималног порекла или на хронична обољења животиња као што је то на пример, ехинококоза.

Приликом планирања сакупљања информација треба да се рачуна са мотивацијом различитих аматерских (у односу на ветеринарску медицину) организација као што су то на пример савез пчелара или ловачки савез. Искуство говори да чланови оваквих и сличних организација, упркос чињеници да се не ради о ветеринарима, односно епизоотиолозима, могу да значајно допринесу броју и квалитету података.

Посебно значајне информације могу да се добију из банака серума. Ради се о серумима који су због неког разлога сакупљани у прошлости, а нарочито за потребе праћења имунског статуса популација различитих врста. Гледајући из историјског аспекта, клинички случајеви појединих инфективних обољења у ветеринарској медицини указали су на потребу да се испита сероконверзија на пример, на парвовирусну инфекцију паса. Прегледима и анализом серума паса из банака серума, установљена је сероконверзија у неким узорцима знатно раније у односу на клиничко испољено обољење и практично панзоотију крајем осамдесетих година 20. века.

Банке серума се оснивају у циљу установљавања проблема здравственог статуса, успостављања приоритета и евалуације имунопрофилактике, стицања увида у дистрибуцију и периодичност појављивања неког обољења, доказивања присуства неког новог обољења и бољег познавања етиолошких чинилаца болести као и ради процене економских губитака као последице обољевања. Банке серума добијају узорке од ветеринара (посете фармама) из амбуланти и дијагностичких лабораторија, са кланица и током транспорта животиња као и од самих фармера. Сваки од начина добијања серума има своје недостатке и предности. Тако ће на пример, узорак серума узет на фарми да буде релативно скуп, а узимање релативно тешко. Међутим, документација која прати узорак ће да буде потпуна. Са друге стране, узимање серума на кланици је јевтино али се у том случају не може да очекује висок стандард пратеће документације. Било о ком начину добијања узорка серума је реч, треба имати на уму да вредност и употребљивост добијених резултата серолошких испитивања зависи од карактеристика тј. валидности серолошког

теста (осетљивост и специфичност), квалитета дизајна епизоотиолошке студије и на крају од степена деградације серума током чувања.

У контексту питања одржавања узорача серума у банкама серума треба да се напомене да је увек боље серум аликвотирати у онолико појединачних под-узорача истог серума колико се предвиђа анализа да се обави, а често и већи број. Наиме, серуми се чувају замрзнути, а њиховим суцесивним одлеђивањем и залеђивањем, имуноглобулини се деградирају, а самим тим се и губе оне карактеристике серума због којих се и чувају.

Присмотра може да се обавља током пописа и током јасно дефинисаних студија. Она може да буде на добровољној основи, на основу приписаних мера, током епизоотије као и током испитивања животиња које смо означили као индикаторе присуства неког обољења (сентинел). Ови механизми присмотре се користе за формирање мреже чији је циљ боље разумевање врсте и типа обољења (ензоотија или епизоотија) и броја обољења која се испитују (скенирање популације и циљна присмотра). Исто тако, присмотром се обухвата одређена површина која може да буде локална (регионална) или на нивоу државе уз јасно дефинисан начин узорковања (попис, случајно узорковање, добровољно, сентинел) као и метод сакупљања података (пасивно или активно). Начин управљања мрежом присмотре може да буде интегрисан (током контроле болести или спровођења мера профилаксе) или аутономан (који се развија независно од система надзора које спроводи државна ветеринарска служба).

У данашње време постоје бројни примери мреже епизоотиолошке присмотре. Оне се примењују у развијеним земљама, а циљ је праћење појављивања различитих поремећаја здравља у популацијама пријемчивих врста. По правилу, ове су мреже део ветеринарских информационих система у оквиру ветеринарске службе дате земље. Паралелно са присмотрама на националним нивоима, информације које се добијају постају и део глобалне присмотре која се обавља у оквиру програма ОИЕ-а.

Обољења, а нарочито инфективне етиологије не познају границе. Током историје, постојала су значајна техничка ограничења транспорта животиња и њихових производа, а најчешће су се епизоотије појављивале у време великих покрета народа за време ратова. Данас су начини путовања разноврсни и брзи па се често чује да је време потребно за пренос једне епизоотије са једног краја света на други, равно брзини путовања авиона од једне локације до друге. Из тог разлога, региони са развијеном ветеринарском службом, са пажњом прате присуство појединих обољења у деловима света где се на пример, слинавка и шап, куга говеда или куга коња, појављују ензоотски.

Недовољна развијеност ветеринарске службе, а самим тим и отежана присмотра може да буде последица недостатка ветеринара, ниског нивоа образовања током студија, недоступности терена или сиромаштва и непросвећености људи. У таквим околностима, а у односу на сваку од наведених „слабих карика“ неопходно је да се учине напори да би се стекли услови за правилно обављање епизоотиолошке присмотре на целој територији државе. Да би се са успехом могла да прати епизоотиолошка ситуација где се неко обољење појављује ензоотски, а самим тим и да би се популација пријемчивих врста животиња заштитила, од нарочитог је значаја укључивање локалног становништва у цео процес присмотре. Током епизоотиолошке присмотре, у таквим случајевима потребно је да се структуре употника мењају, да се прилагођавају при чему треба да се рачуна и са значајним нивоом импровизације од стране анкетара. То изимеђу осталог значи да ће бити некада неопходно да се епизоотиолог упозна са социјалним и културолошким разликама и локалним обичајима, а све у циљу добијања што детаљнијих и квалитетнијих података.

Захвалница

Рад је финансиран средствима пројеката Министарства науке и технолошког развоја, Р. Србије (ТР37015 и ТР31088).

Литература

1. Blancou, J. (2003) History of the surveillance and control of transmissible animal diseases. OIE, Paris. 2. FAO (1999) Manual on livestock disease surveillance and information systems. FAO Animal health manual No. 8. FAO, Rome. 3. Jebara, K.B. (2004) Surveillance, detection and response:

managing emerging diseases at national and international levels. *Revue Sci. Tech. OIE*, 23,709-715. **4.**Jewel, N.P. (2004) *Statistics for epidemiology*, Ed. Chapman & Hall/CRC. **5.**King, L.J. (1985) Unique characteristics of the National animal disease surveillance system. *JAVMA*, 186, 35-39. **6.**Lehtien, M. et al (2002) Herpes simplex virus and risk of cervical cancer: A longitudinal, nested case-control study in the Nordic countries. *Am. J. Epidemiology* 156, 687-692. **7.**Martin, S.W. et al (1987) *Veterinary epidemiology. Principles and methods*. Iowa State Univ. Press, Ames, IA, USA. **8.**Moorhouse, P.D. and Hugh-Jones, M. E. (1981) Serum banks. *Vet. Bull.*, 51,277-290. **9.**Radunz, B. (2006) Surveillance and risk management during the later stages of eradication. Experiences from Australia. *Vet. Microbiol.*, 112, 283-290. **10.**Rossana Bruno and Alessio Lorusso (2015) BTV control/regulation within EU: the influence of the Italian experience. *BT Forum*, Budapest 19. may, 2015. **11.**Salman, M. D. (2003) *Animal disease surveillance and survey systems*. A Blackwell Publ. Professional, Ames, Iowa, USA. **12.**Schwabe, C.W. (1984) *Analytical epidemiology and veterinary economics. Veterinary medicine and human health*, 3rd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 430-447. **13.**Smith, R.D. (1995) *Veterinary clinical epidemiology: A problem-oriented approach*. 2nd Ed. CRC Press. **14.**Thrusfield M.V. et al (1998) Acquired urinary incontinence in bitches: its incidence and relationship to neutering practices. *J. Small Anim. Pract.* 39,559-566. **15.**Thrusfield, M. (2007) *Veterinary epidemiology*. 3rd Ed. Blackwell Science.

НАЛАЗ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕСТИ КВРГАВЕ КОЖЕ КОД
ВАКЦИНИСАНИХ КРАВА И ЊИХОВЕ ТЕЛАДИ

*DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST LUMPY SKIN DISEASE
VIRUS IN VACCINATED COWS AND THEIR CALVES*

*Милена Самојловић¹, Тамаш Петровић¹, Владимир Полачек¹, Љубица Џигурски², Диана
Лупуловић¹, Госава Лазих¹, Биљана Ђурђевић¹, Марко Пајић¹, Сава Лазих¹*

¹Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад;

²Ветерина ДОО, ПИК Бечеј

Кратак садржај

У литератури је мало података о имунолошком одговору вакцинисаних крава против болести квргаве коже, као и о пасивном имунитету телди, која потичу од вакцинисаних крава. Пасивни имунитет код телди зависи првенствено од количине абсорбованих антитела присутних у колоструму. Циљ овог рада је да се прикажу налази антитела у крвном серуму и колоструму вакцинисаних крава, као и у крвном серуму телди која потичу од вакцинисаних крава.

Истраживањима је обухваћено укупно 15 крава и 15 телди са једне фарме. Узорковање крви и колострума код крава вршено је непосредно после партуса, а вакцинација крава је спроведена током августа месеца 2016. и 2017. године. Узорковање крви код телди вршено је двократно, 30 и 60 дана након рођења. Присуство антитела у крвним серумима и колострумима вршено је комерцијалним ELISA сет китом по упутству произвођача („*Dvet*“). Антитела у крвном серуму су утврђена код 9 крава (60%), а у колоструму код 13 крава (86,67%). Код телди, 30 дана након рођења присуство антитела је утврђено је код 13 јединки (86,67%), а 60 дана након рођења код 6 јединки (40%).

Већи број позитивних налаза антитела у колоструму крава, него у крвном серуму потврђује чињеницу високе концентрације антитела у колоструму, која не могу увек да се утврде у серуму. Перзистенција матерналних антитела је битан фактор који утиче на ефикасност вакцинације телди. Неопходно је наставити са оваквим истраживањима, како би се утврдило оптимално време вакцинације телди против болести квргаве коже, која потичу од вакцинисаних крава.

Кључне речи: Болест квргаве коже, антитела, матернална антитела, ELISA, вакцинација

Захвалница: Истраживања су реализована према пројектима технолошког развоја ТР31084 и ТР31071, финансираних од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

**КОИ ХЕРПЕСВИРОЗА И ПРОЛЕЋНА ВИРЕМИЈА ШАРАНА –
АКТУЕЛНИ ПРОБЛЕМ ШАРАНСКОГ РИБАРСТВА У СРБИЈИ**

**KOI HERPESVIRUS DISEASE AND SPRING VIREMIA OF CARP –
CURRENT CHALLENGE OF CYPRINIDS AQUACULTURE IN SERBIA**

**Николина Новаков¹, Драган Розан¹, Сава Лазих², Ненад Стојанац¹,
Бојана Видовић¹, Милош Пелић², Мирослав Ћирковић²**

¹Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду;

²Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“ у Новом Саду

Кратак садржај

Кои херпесвируса (КХ) и пролећна вiremија шарана (ПВШ) су веома контагиозне, акутне вирусне болести ципринидних риба, првенствено шарана. КХ је узрокована херпес вирусом (Кои херпесвирус (КХВ), циприни херпесвирус 3 (CyHV-3)). Први пут је утврђена 1998. године у Израелу и САД, а касније у великом броју земаља у Азији и Европи. Нерегулисана трговина кои шараном је допринела ширењу вируса током деведесетих година прошлог века. Ово је учинило кои херпесвиросу једном од најразорнијих болести за шаранску аквакултуру. Тренутно су само Јужна Америка, Аустралија и северна Африка подручја слободна од CyHV-3. ПВШ изазива *Rhabdovirus caprio*. Обољење се карактерише генерализованом вiremијом и крварењима у трбушној дупљи и мишићима шарана и других ципринида. Експанзија интензивне производње шаранских врста риба довела је до брзог ширења вируса ПВШ. У Србији КХ је присутна од 2015. године а ПВШ од 2016. године, а имајући у виду да могу изазвати озбиљна угинућа и економске губитке, Законом о ветеринарству, као и Правилницима о програму мера здравствене заштите животиња, који се доносе сваке године, прописано је да се континуирано прати здравствено стање шаранских врста риба на ове болести. Будући да је исорењивање вируса веома отежано, највећи изазов представља даље заустављање ширења болести.

Кључне речи: кои херпесвируса, пролећна вiremија шарана, шаран, епизоотиологија, Србија

Увод

Кои херпесвируса је болест шарана и кои шарана узрокована херпес вирусом, познатијим и као кои херпесвирус (КХВ), односно ципринидни херпесвирус 3 (CyHV-3). Први пут је утврђена 1998. године у Израелу и САД (1,2), а касније у великом броју земаља у Азији и Европи (3). Нерегулисана трговина кои шараном је допринела ширењу вируса током деведесетих година прошлог века. Ово је учинило КХ једном од најразорнијих болести за шаранску аквакултуру. Епидемије ове болести се јављају у дивљим или гајеним популацијама у пролеће и лето када је температура воде 18-28°C са губицима који понекад прелазе 90% (4,5). У зависности од фазе инфекције, присутни су различити клинички знаци као што су хиперемија, нарочито у основама пераја и по абдомену; бледа подручја на кожи неправилног облика, хиперсекреција слузи у почетној фази инфекције, те отпадање мртвог епитела и недостатак слузи у каснијој фази инфекције; површина епидермиса постаје груба и храпава, налик шмиргл-папиру (6,7,8). У случају појаве кои херпесвиросе препоручује се депопулација објекта и свеобухватна дезинфекција. При томе треба водити рачуна о чињеници да се у појединим државама користи жива, атенуирана, вакцина, па у тим случајевима није могуће разликовати да ли је имуни одговор настао услед природне инфекције или као последица вакцинације.

ПВШ је акутна, системска, заразна болест чији је узročник *Rhabdovirus carpio* и представља обољење од велике економске важности јер болест узрокује озбиљне губитке на рибањацима централног и источног подручја Европе (9,10). У Европи вирус ПВШ углавном напада шаране, али и неколико других врста слатководних риба могу бити заражене овим вирусом (9,10,11,12). У шарана најчешћи спољашњи знаци су хеморагије по кожи, егзофталмија, абдоминална дистензија, те енем и инфламација аналног отвора. Унутрашњи знаци ове болести су перитонитис, асцитис, катарални и хеморагични ентеритис, едематозни унутрашњи органи и петехијална крварења унутрашњег зида рибљег мехура и скелетне мускулатуре (13,14,15,8). На појаву болести утичу фактори животне средине, као и имунолошки статуси јединки, што зависи од неспецифичног и специфичног имунитета. Обољење са високим mortalитетом и карактеристичном клиничком сликом јавља се најчешће при температури воде од 15-18°C. При температури воде изнад 20°C клинички манифестно обољење није присутно (8).

Основни циљ овог истраживања је да се истакне значај КХ и ПВШ, да се да преглед стања у Србији и региону и укаже на превентивне мере које је неопходно спроводити како би се смањило и зауставило даље ширење ових опасних вируса.

Вирус КХ и ПВШ

СуHV-3 је припадник рода *Cyprinivirus*, породице *Alloherpesviridae*, реда *Herpesvirales*, и има структуру типичну за припаднике овог реда. Икосаедарни капсид садржи геном који се састоји од линеарне, дволанчане ДНК. Капсид је покривен тегументом, окруженим липидним омотачем који садржи вирусне гликопротеине. Пречник СуHV-3 износи 170-200 nm. Геном је линеаран, дужине 295 kb, што га чини највећим геном међу познатим херпесвирусима (1, 16). Три соја СуHV-3, изолована у Израелу (СуHV-3 И), Јапану (СуHV-3 Ј), и САД (СуHV-3 У), су у целости секвенционирани. Упркос географском пореклу, утврђена је велика подударност секвенци ових сојева, а мали диверзитет секвенци међу сојевима је вероватно карактеристика овог вируса. Упркос томе, идентификовано је 9 генотипова (7 из Европе и 2 из Азије) (17,18).

Rhabdovirus carpio (познат и као вирус Пролећне виремије шарана, ПВШВ) је класификован у род *Sprivirus*, фамилија *Rhabdoviridae*, ред *Mononegavirales*. ПВШВ је 60-90 nm широк и 80-180 nm дуг, типичним обликом пушчаног зрна. Геном се састоји од линеарне, негативно-оријентисане, једноланчане РНК. Филогенетском анализом ПВШВ и сродних рабдовируса идентификоване су четири геногрупе (I до IV), а ПВШВ је сврстан у геногрупу I, која је подељена на четири подгрупе. У подгрупу Ia су сврстани изолати вируса из Азије, САД и Канаде, подгрупе Ib и Ic чине источно-европски изолати (Молдавија, Украјина и Русија), док подгрупу Id сачињавају западно-европски изолати (19,20,8). Ови подаци указују да је вирус независно еволуирао у различитим географским подручјима.

Географска распрострањеност

Након појаве у Сједињеним Државама, Немачкој и Израелу, КХВ је утврђен широм Европе, Јужне Африке, Јапана, Индонезије, Тајланда, Тајвана, Кине, Канаде и Малезије. У већини западноевропских земаља, укључујући Аустрију, Белгију, Данску, Француску, Италију, Луксембург, Румунију, Словенију, Шпанију, Шведску, Швајцарску и Холандију је детектовано присуство СуHV-3 (3). Болест је присутна и у нашим суседним земљама, а најновији случајеви забележени су у Хрватској, у Чешкој 2016. и у Румунији 2017. године (3). Претпоставка да је вирус присутан у популацији шарана у Србији датира од 2004. године, када је утврђен висок mortalитет једногодишњих и двогодишњих шарана на три рибањака на територији Републике Србије, а од 2015. године забележени су нови случајеви КХ.

Дуги низ година, пролећна виремија шарана се јављала готово искључиво у Европи: у бившој Југославији, Мађарској, Пољској, Аустрији, Бугарској, Француској, Немачкој, Румунији, Шпанији, Великој Британији и бившем Совјетском Савезу (3). ПВШВ је 2002. године први пут изолован у Сједињеним Америчким Државама из кои шарана у Северној Каролини, а затим и из шарана у Висконсину (21). У 2004. години, присуство болести је потврђено и у Кини. У Канади је присуство вируса утврђено 2006. године, код шарана из језера Онтарио (3). Из тога се може

закључити да је ПВШВ сада присутан широм света. У Србији је 2016. године забележена појава ПВШ на нашим топловодним рибањацима, а присутна је и током 2017 и 2018. године.

Епизоотиологија и патогенеза

У ранијим извештајима научници су сугерисали да су шкрге главни портал за улазак вируса у тело шарана (22,23,7). Међутим, скорије експерименталне студије показале су да кожа која покрива пераје и тело шарана представља главна врата за улазак КХВ-а (24). Постојало је системско ширење вируса са коже и шкрга на унутрашње органе (22, 7). Састав и морфогенеза КХВ-а у инффицираним ћелијама су описани и код других херпесвируса. Хипер-секреција мукуса је врло очигледна у раним стадијумима КХ инфекције, а КХВ ДНК је откривена у високим нивоима и у слузи узрокованој од експериментално инффицираних шарана (23). Ово је додатни доказ за активно укључивање коже у вирусну патогенезу и важну локацију за ширење вируса. Излучивање вируса путем урина и фецеса такође може бити важан механизам за ширење вируса. Високи нивои КХВ ДНК откривени су у цревима и бубрежном ткиву, а инфективни вирус је откривен у фецесу узоркованом од заражених шарана (22,23). Начин преноса КХВ-а је хоризонталан тј. директно од заражене рибе или преко контаминираних воде до пријемчивих риба. Уклањање слузи са коже и епидермалних лезија олакшава улазак вируса у домаћина (25). Период инкубације након уласка вируса у домаћина варира између 7 и 10 дана пре почетка клиничких симптома. Масивна угинућа се јављају у оквиру 7 дана од појаве клиничких симптома са стопом смртности која достиже 80-100%. (26). На температурама воде изнад 30°C или спод 13°C, КХВ постаје неактиван и клинички знаци генерално престају (4). Вирусна ДНК се може детектовати у крви и бубрезима један дан након експозиције вирусом. Последице, ДНК се може открити у шкргама, цревима, слезини и јетри, али не и у мозгу. КХВ ДНК је откривен у води пре, током и након избијања инфекције. После изласка из домаћина, вирус може остати повезан са планктоном и он може потенцијално бити укључен у пренос вируса (27). Вода је главни абиотски вектор. Међутим, анимални вектори (нпр. друге врсте риба, паразитски бескичмењаци као и неке птице и сисари) такође могу бити укључени у пренос КХВ. Постоје све већи докази да водени бескичмењаци могу бити јако добри КХВ вектори. Студије у Јапану откриле су КХВ ДНК у узорцима планктона, а нарочито у роду *Rotifera* (28).

Инфекција вирусом ПВШ настаје током зиме када је температура воде ниска, а имунитет домаћина супресиран. У пролеће, кад температуре прелазе 10°C, код рибе се појављују клинички знаци ПВШ. Обољење са високим морталитетом и карактеристичном клиничком сликом се јавља најчешће при температурама воде од 15 до 18°C. При температури воде изнад 20°C клинички манифестно обољење није присутно (10). Појава масовног угинућа се може очекивати у пролеће и почетком лета, ретко у јесен и зиму. Осетљиве су све старосне категорије, али је болест најтежег тока код млађи. Популације слабије здравствене кондиције након презимљавања су подложније појави обољења. Смртност најчешће износи од 30% до 70% (29). Инфекција је хоризонтална и настаје контактом пријемчивих врста са зараженим фецесом или слузи. Претпоставља се да је могуће вертикално преношење болести, али то није значајан извор инфекције (10). Јединке које преживе клиничко обољење могу постати асимптоматски носиоци вируса. ПВШВ улази у организам домаћина кроз шкрге у којима се вирус умножава, а онда се шири путем крвотока. Примарна виремија постаје очигледна 6 дана после инфекције. Циљни органи су бубрег, јетра, слезина, срце, и пробавни тракт. Клиничка болест је видљива 7 дана након инфекције, а вирус се шири путем цревне слузи и фецеса (10, 29).

Превенција и контрола

Мере биосигурности треба да укључе осигурање да новоуведене рибе у ринњак буду из извора слободног од болести и да прођу карантин где се могу држати на температури одговарајућој за репликацију вируса. Хигијенске мере на терену треба да укључују дезинфекцију јаја, редовну дезинфекцију када, хемијску дезинфекцију опреме, пажљиво руковање рибом како би се избегао стрес и нешкодљиво одлагање мртвих риба. Вома је значајна сама локација рибањака као и могуће везе са великим површинским водама и рекама, што треба онемогућити како се не би појавили могући вектори вируса ПВШ у самом рибању. Доказана је различита резистенција на

КХВ код различитих врста и хибрида шарана. У нешто скоријем истраживању отпорности, 96 потомака насталих од укрштања четири европско азијска варијетета шарана, експериментално је изложено КХВ-у. Стопа преживљавања четири најрезистентније линије у финалном излагању вирусу варијало је од 42.9-53.4% (30). Генетска манипулација и хибридизација шарана није дала позитивне резултате у смањењу појаве вируса ПВШ у јатима шарана (31).

У поступку вакцинације против КХ може се користити вакцина која садржи живи атенуирани вирус. Вакцинација се спроводи потапањем риба у воду са суспензијом вируса у трајању од 30 минута, након чека наредна 2-3 дана риба мора бити држана на температурама воде које не доводе до репликације вируса (32). Вакцина изазива стварање антитела против вируса и трајање заштите од најмање 8 месеци (33). Вакцина је била лиценцирана за хитну употребу у Израелу и широко се користила на фармама шарана широм те земље.

Ефикасна и сигурна имунопрофилакса ПВШ још увек није установљена (34). Међутим орална вакцинација шарана у јесен са живим вирусом, може развити солидну отпорност која може трајати неколико месеци укључујући и период током зиме (35,10).

Закључак

КХ и ПВШ су због стопе морталитета и лаког ширења на подручју читавог света препознате као изузетно значајан проблем шаранског рибарства. Присуство КХ и ПВШ у нашим водама може имати и велике негативне ефекте на извоз рибе на међународном тржишту. Неопходно је вршити адекватну и континуирану контролу на присуство КХВ и ПВШВ и све позитивне случајеве оболења пријавити Министарству. Ситуација дугорочно, по питању ове болести није нимало позитивна. Можемо очекивати огромне материјалне штете, које ће се одразити на рад и финансијско пословање ионако уздрманих рибњака.

Захвалница

Приказани резултат део је рада на пројекту ТР 31011, који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Литература

1.Hedrick RP, Gilad O, Yun S, Spangenberg JV, Marty GD, Nordhausen RW, Kebus MJ, Bercovier H, Eldar A, 2000, A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult Koi, a strain of a Common carp. *J Aquat Anim Health*. 12, 44–57. 2.Perelberg A, Smirnov M, Hutoran M, Diamant A, Bejerano Y, Kotler M, 2003, Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *Israel J Aquac (Bamid)*. 55, 5–12. 3.International Database on Aquatic Animal Diseases (IDAAD) www.cefas.defra.gov.uk/idaad. 4.Cheng L, Chen CY, Tsai MA, Wang PC, Hsu JP, Chern RS, Chen SC, 2011, Koi herpesvirus epizootic in cultured carp and Koi, *Cyprinus carpio* L., in Taiwan. *J Fish Dis*. 34, 547–54. 5.Walster C, 1999, Clinical observations of severe mortalities in Koi carp, *Cyprinus carpio*, with gill disease. *Fish Vet J*. 3, 54–8. 6.Haenen OLM, Way K, Bergmann SM, Ariel E, 2004, The emergence of Koi herpesvirus and its significance to European to aquaculture. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*. 24, 293–307. 7.Pikarsky E, Ronen A, Abramowitz J, Levavi-Sivan B, Hutoran M, Shapira Y, Steinitz M, Perelberg A, Soffer D, Kotler M, 2004, Pathogenesis of acute viral disease induced in fish by carp interstitial nephritis and gill necrosis virus. *J Virol*. 78, 9544–51. 8.Novakov N, Radosavljević V, Ćirković M, 2015, Bolesti slatkovodnih riba, Feljton, Novi Sad. 1-167. 9.Fijan N, 1972, Infectious dropsy in carp - a disease complex. In: Mawdesley-Thomas LE, editor, *Diseases of fish*, Symposia of the Zoological Society of London, London. 39–51. 10.Fijan N, 1999, Spring viremia of carp and other viral diseases of warm-water fish. In: Woo PTK, Bruno DW, editors, *Fish diseases and disorders*, Vol 3, CAB International, Oxon. 177–244. 11.Fijan N, 1988, Vaccination against SVCV. In: Ellis AE, editor, *Fish vaccination*, Academic Press, London. 204–215. 12.Wolf K, 1988, Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, Ithaca, NY. 13.Fijan N, Petrinc Z, Sulimanovic O, Zwillenberg LO, 1971, Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp. *Vet Arh*. 41, 125–38. 14.Ahne W, Wolf K, 1977, Spring viremia of carp. US Department of Interior, Fish Disease Leaflet. *Fish Wildl Serv*. 51, 1–11. 15.Negele RD, 1977, Histopathological changes in some organs of experimentally infected carp fingerlings with Rhabdovirus *carpio*. *Bull Off Int Epizoot*. 87,

449–50. **16.** Ilouze M, Davidovich M, Diamant A, Kotler M, Dishon A, 2011, The outbreak of carp disease caused by CyHV-3 as a model for new emerging viral diseases in aquaculture: a review. *Ecol Res.* 26, 885–92. **17.** Aoki T, Hirono I, Kurokawa K, Fukuda H, Nahary R, Eldar A, Davison AJ, Waltzek TB, Bercovier H, Hedrick RP, 2007, Genome sequences of three Koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening Koi and Common carp worldwide. *J Virol.* 81, 5058–65. **18.** Bigarre L, Baud M, Cabon J, Antychowicz J, Bergmann SM, Engelsma M, Pozet F, Reichert M, Castric J, 2009, Differentiation between cyprinid herpesvirus type-3 lineages using duplex PCR. *J Virol Methods.* 158, 51–7. **19.** Walker PJ, Benmansour A, Calisher CH, Dietzgen R, Sothers, 2000, Family Rhabdoviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB and 7 others editors, *The Seventh Report of the International Committee for Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego, CA, 563–83. **20.** Bjorklund HV, Higman KH, Kurath G, 1996, The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hiram rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses. *Virus Res* 42, 65–80. **21.** Goodwin AE, 2002, First report of spring viremia of carp virus (SVCV) in North America. *J Aquat Anim Health.* 14, 161–164. **22.** Dishon A, Perelberg A, Bishara Shieban J, Ilouze M, Davidovich M, Werker S, Kotler M, 2005, Detection of carp interstitial nephritis and gill necrosis virus in fish droppings. *Appl Environ Microbiol.* 71, 7285–91. **23.** Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara FJ, Bercovier H, Hedrick RP, 2004, Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis Aquat Org.* 60, 179–87. **24.** Costes B, Stalin Raj V, Michel B, Fournier G, Thirion M, Gillet L, Mast J, Loeffrig F, Bremont M, Vanderplasschen A, 2009, The major portal of entry of koi herpesvirus in *Cyprinus carpio* is the skin. *J Virol.* 83, 2819–30. **25.** Raj VS, Fournier G, Rakus K, Ronsmans M, Ouyang P, Michel B, Delforges C, Costes B, Farnir F, Leroy B, Wattiez R, Melard C, Mast J, Loeffrig F, Vanderplasschen A, 2011, Skin mucus of *Cyprinus carpio* inhibits cyprinid herpesvirus 3 binding to epidermal cells. *Vet Res.* 42, 2–9. **26.** Yuasa K, Ito T, Sano M, 2008, Effect of water temperature on mortality and virus shedding in carp experimentally infected with Koi herpesvirus. *Fish Pathol.* 43, 83–5. **27.** Gray WL, Mullis L, LaPatra SE, Groff JM, Goodwin A, 2002, Detection of Koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J Fish Dis.* 25, 171–8. **28.** Minamoto T, Honjo MN, Yamanaka H, Tanaka N, Itayama T, Kawabata Z, 2010, Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Res Vet Sci.* 90, 530–2. **29.** Ahne W, Björklund HV, Essbauer S, Fijan N, Kurath G, Winton JR, 2002, Spring viremia of carp (SVC). *Dis Aquat Org.* 52, 261–72. **30.** Dixon PF, Joiner CL, Way K, Reese RA, Jeney G, Jeney Z, 2009, Comparison of the resistance of selected families of common carp, *Cyprinus carpio* L., to koi herpesvirus: preliminary study. *J Fish Dis.* 32, 1035–9. **31.** Kirpichnikov VS, Iliasov JJ, Schart LA, Ganchenko IV, 1987, Selection of carp strains resistant to dropsy. *Proc Zool Inst USSR Acad Sci.* 171, 35–46. **32.** Perelberg A, Ilouze M, Kotler M, Steinitz M, 2008, Antibody response and resistance of *Cyprinus carpio* immunized with cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3). *Vaccine.* 26, 3750–6. **33.** Ronen A, Perelberg A, Abramowitz J, Hutoran M, Tinman S, Bejerano I, Steinitz M, Kotler M, 2003, Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine.* 21, 4677–84. **34.** Emmenegger J, Kurath G, 2008, “DNA vaccine protects ornamental koi (*Cyprinus carpio* koi) against North American spring viremia of carp virus.” *Vaccine.* 26, 6415–21. **35.** Fijan N, 1988, Vaccination against SVCV. In: Ellis AE, editor, *Fish vaccination.* Academic Press, London. 204–15.

ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ III

**РЕЗИСТЕНЦИЈА НА ЛЕКОВЕ,
ГЛОБАЛНИ ПРОБЛЕМ У
МЕДИЦИНИ**

САВРЕМЕНИ АСПЕКТИ МОНИТОРИНГА И
КОНТРОЛЕ АНТИМИКРОБНЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ

MODERN APPROACHES TO THE ANTIMICROBIAL
RESISTANCE MONITORING AND CONTROL

Дејан Крњић¹, Гордана Жугић², Татјана Лабус³

¹Катедра за микробиологију, Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду

²Ветеринарског сектора Агенције за лекове и медицинска средства Републике Србије.

³Управа за ветерину, Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије

Кратак садржај

Увођење антимикробних средстава у хуману клиничку медицину и сточарску производњу представља једно од најзначајнијих достигнућа двадесетог века. Током претходних деценија сведоци смо на глобалном нивоу драматичног повећања резистенције према антибиотицима код већине најчешћих узročника бактеријских инфекција људи и животиња. Појава резистентних бактерија, било мутацијом или стицањем мобилних генетичких елемената који носе гене резистенције, може се одвијати без обзира на присуство антимикробних средстава. Изложеност антибиотицима обезбеђује неопходан селективни притисак за раст и ширење резистентних сојева бактерија. Стога, покретачка снага за повишење нивоа резистенције је прекомерна и непотребна употреба антибиотика у хуманој и ветеринарској медицини.

Европска агенција за безбедност хране (ЕФСА) објавила је неколико предлога за усклађивање мониторинга и извештавања о појави резистентних бактерија код животиња и дуж ланца производње хране, а који се односе на: (а) усаглашену листу антибиотика обухваћених планом мониторинга, (б) спровођење циљане појачане контроле антимикробне резистенције код одређених врста бактерија, (ц) спровођење активног програма мониторинга антимикробне резистенције код здравих животиња, и (д) граничне вредности минималних инхибиторних концентрација (МИК).

Контрола антимикробне резистенције код животиња требало би да обухвати следеће мере којима би се ограничило појављивање и ширење резистентних бактерија: (а) ограничавање изузев терапијских других примена антибиотика, (б) побољшање биосигурности на фармама као и хигијенских услова и праксе, (ц) развој образовних програма усмерених на ветеринаре и фармере, и (д) повезивање система надзора антимикробне резистенције бактерија код људи и код животиња.

Имајући у виду антимикробну резистенцију, један од најважнијих приоритета у Републици Србији је доношење националног акционог плана, који би се заснивао на ширем концепту јединственог здравља и обухватио здравље људи, здравље животиња и очување животне средине. У циљу побољшања контроле антимикробне резистенције код животиња у Републици Србији неопходно је предузети следеће: (а) усвојити и применити Национални програм и акциони план за контролу резистенције бактерија на антибиотике, (б) изградити и имплементирати смернице одговорне употребе антимикробних средстава у ветеринарској медицини, и (ц) успоставити систем надзора потрошње антимикробних средстава и антимикробне резистенције.

Кључне речи: домаће животиње, антимикробна резистенција, мониторинг, контрола

Summary

The introduction of antimicrobial agents to human clinical medicine and animal husbandry has been one of the most significant achievements of the 20th century. In the previous decades we have

witnessed a dramatic increase of antibiotic resistance in the most common human and animal bacterial infections globally. The emergence of resistant bacteria, either by mutations or the acquisition of mobile genetic elements carrying resistance genes, may take place irrespective of the presence of antimicrobial agents. It is the exposure to antibiotics that provides the necessary selective pressure as regards the rise and spread of resistant bacterial strains. Therefore, the driving force behind the increasing rate of resistance can ultimately be found in the abuse and misuse of antibiotics either in human or veterinary medicine.

Several proposals have been made by the European Food Safety Authority (EFSA) for the harmonization of monitoring and reporting of resistant bacteria in animals and throughout the food production chain, and these include: (a) uniform comprehensive set of antibacterial agents to be included in the monitoring plans, (b) performance of antimicrobial resistance monitoring in sentinel bacteria, (c) performance of active antimicrobial resistance monitoring programmes in healthy animals and (d) harmonisation of MIC breakpoints.

Control of antimicrobial resistance in animals should include the following interventions to limit the emergence and spread of resistant bacteria: (a) limiting antibiotic use for nontherapeutic applications, (b) improving farm biosecurity and developing and increasing hygienic conditions and practices, (c) developing educational programmes intended for veterinarians and farmers, and (d) linking surveillance systems on antibiotic resistance in both humans and animals.

Having in mind antimicrobial resistance, one of the most important priorities in the Republic of Serbia is development of the national action plan that would adopt a broader 'one-health' approach covering human health, animal health and environmental protection. In order to improve the control of animal antimicrobial resistance in the Republic of Serbia it is necessary to undertake the following: (a) adopt and apply the national program and action plan on antimicrobial resistance (b) develop and implement guidelines on the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine (c) establish a monitoring system for antimicrobial consumption and antimicrobial resistance.

Key words: domestic animals, antimicrobial resistance, monitoring, control

АНТИМИКРОБНА РЕЗИСТЕНЦИЈА КАО ГЛОБАЛНА ПРЕТЊА

Антимикробна средства представљају једно од најзначајнијих достигнућа двадесетог века и "камен темељац" терапије инфективних обољења. Способност излечења без штетног деловања по организам људи и животиња доприноси њиховој употреби као магичног оружја у хуманој и ветеринарској медицини. Применом антибиотика смањен је проценат смртности људи и животиња код инфективних обољења и глобално побољшано здравље, продужен животни век људи за осам година, унапређена безбедност и довољност хране.

Почетком седамдесетих година прошлог века из највиших научних нивоа изнета су мишљења да је применом антимикробних средстава и вакцина затворена књига инфективних болести. На жалост ова оптимистичка уверавања нису саставни део нашег реалног живота. Данас смо сведоци и могуће жртве инфекција изазваних мултирезистентним или панрезистентним сојевима бактерија за које не постоји ефикасна терапија применом препарата из целокупне палете антибиотика и хемиотерапеутика. Бројна научна истраживања указују на континуирано појављивање и ширење резистенције код бактерија, што оправдава страховања о повратку човечанство у доба преантибиотске ере и појави фаталних инфективних обољења без могућности ефикасне антимикробне терапије (Крњић, 2000).

Имајући у виду начине преношења резистенције, пре свега путем плазмида, способност стицања отпорности бактерија према антимикробним средствима представља веома динамичну и непредвидљиву појаву која доводи до неефикасности терапије инфективних обољења. Појава и ширење резистентних бактерија или гена резистенције присутно је и на локалном и глобалном нивоу, чиме се доприноси употреби истих или хемијски сличних антимикробних средстава код људи, животиња и биљака. Антибиотици и хемиотерапеутици су по много чему јединствена терапијска средства јер не утичу само индивидуално на пацијента него шире на околину и на целу животну заједницу. Свака појединачна употреба доприноси тоталној експозицији природне заједнице према антимикробним средствима. Примена антибиотика обезбеђује селективни

притисак за раст и ширење резистентних сојева бактерија, а до повишења преваленције резистенције доводи прекомерна и непотребна употреба антибиотика у хуманој и ветеринарској медицини.

Директне последице антимикробне резистенције су неуспешно лечење инфекција људи и животиња праћено већим морталитетом, појава болести тежег или дужег тока, већи губици у сточарској производњи, смањење прихода и средстава за живот пољопривредника, као и угроженост довољности хране. Предиктивном аналитиком утврђено је да ће ширење резистенције бактерија повећати број услед неефикасне антибиотске терапије смртних случајева људи у свету годишње са садашњих 700.000 на 10 милиона 2050. године, и да ће доћи до смањења светског бруто производа за 2 до 3.5% или за 100 милиона долара (O'Neill OJ, 2014).

Како се резистентне бактерије могу ширити од особе до особе, од једне животиње до друге, као и од животиња до човека, свака појединачна употреба антибиотика повезана је са ефикасношћу антибиотика и код друге јединке односно индивидуе. Ваша употреба утиче на сврсисходност употребе антибиотика и код нас, а сама примена дугосежно утиче у будућности и на терапијску успешност антимикробних средстава и код нових генерација људи и животиња. Антибиотици представљају светско опште добро за чије очување мора се успоставити заједничко друштвено поверење, и није прихватљиво да једна група људи злоупотреби ово поверење у сврху економске предности док наноси штету свим другим (Spellberg, 2016).

На 71. генералној скупштини Уједињених нација одржаној 21. септембра 2016. године од стране светских лидера усвојена је политичка декларација о растућој опасности од резистентних микроорганизама према антимикробним средствима и неопходности предузимања опсежних и координисаних активности у решавању овог горећег глобалног проблема, а који дотиче здравље људи, здравље животиња и производњу хране (United Nation General Assembly, 2016). Председници и премијери су исказали своје опредељење да свака земља развије национални акциони план о антимикробној резистенцији, који треба да се заснива на раније усвојеним: глобалном плану Светске здравствене организације – СЗО (World Health Organization - WHO, 2015), акционом плану Организације за храну и пољопривреду Уједињених нација – ФАО (Food and Agriculture Organization - FAO, 2016) и стратегијом Светске организације за здравље животиња – ОИЕ (World Organisation for Animal Health - OIE, 2016).

Због тога у многим државама света постоји усвојен акциони план и успостављени мониторинг и контрола антимикробне резистенције који обухватају испитивање настанка и раширеност резистенције код бактерија као и праћење коришћења антимикробних средстава у хуманој и ветеринарској медицини.

УПОТРЕБА АНТИМИКРОБНИХ СРЕДСТАВА КОД ЖИВОТИЊА

Фармацеутске компаније на годишњем нивоу произведу и пласирају на светско тржиште антимикробна средства укупне вредности око 45 милијарди долара. Имајући у виду финансијски аспект, промет антибиотика код животиња је вишеструко нижи него у хуманој медицини, али без обзира на то представља великим фармацеутским кућама значајан извор прихода, који на глобалном нивоу износи око 5 милијарди долара, од чега отпада у Сједињеним Америчким Државама око 2 милијарде и у Европи око 1.25 милијарде долара.

Када је у питању количина самих антибиотика у Сједињеним Америчким Државама се преко 70% употреби код животиња, а и у Кини потрошња антибиотика код животиња је премашила ону код људи. На светском нивоу између 2010. и 2030. године очекује се за 67% повећање потрошње антимикробних средстава у сточарству. Прекомерна и непотребна употреба антимикробних лекова и последично висока преваленција антимикробне резистенције бактерија представљају озбиљну претњу широм света, а анализе показују да је само половина количине антибиотика утрошено правилно и са оправданим разлогом.

Од почетка четрдесетих година прошлог века антимикробна средства користила су се код животиња у циљу терапије за лечење болести, контроле и превенције инфекција, стимулације раста и побољшања ефикасности производње. Иако се терапија може примењивати на индивидуалном нивоу, само код одређених јединки, често је изводљивије и ефикасније лечење читавих група животиња апликацијом лекова путем хране или воде.

Метафилакса представља примену антибиотика у случају када су неке животиње у запату/стаду клинички оболеле, док су друге супклинички инфициране или су у инкубацији, односно када постоји висок ризик од њихове инфекције. Третирање датог запада се врши са намером контроле односно спречавања даљег ширења болести унутар дате групе јединки.

Током узгоја животиња постоје високоризични периоди за појаву болести, на пример одлучење прасади или транспорт животиња. Профилактичка примена антимикробних средстава примењује се дужи низ деценија у тим критичним периодима ради превенције појаве болести односно смањења ризика од настанка истих. Антибиотици и хемиотерапеутици се и данас користи у профилакси инфекција широм света, а у државама чланицама Европске Уније од 2012. године ограничена је њихова примена, која није могућа без претходне сагласности ветеринара утемељене на клиничком налазу и по могућству спроведеној епизоотиолошкој анализи.

Од 1951. године када је у САД одобрена прва употреба антибиотика као адитива храни за животиња, у интезивном начину узгоја домаћих животиња применом антимикробних средстава у суптотерапијским дозама редукована је појава болести, побољшана конверзија хране и прираст животиња. Њихова примена као стимулатора или промотера раста доприносила је повећању производње, а ова контраверзна употреба антибиотика и хемиотерапеутика критикована је од стране научних кругова и шире јавности управо због ризика од појаве и ширења резистентних бактерија. У свету се у периоду од 1960. до 1990. године у ове сврхе користило између 40% и 50% целокупне количине произведених антимикробних средстава. Након доношења уредбе Европског парламента и Савета Европске Уније 1831/2003 забрањена је у земљама чланицама од 01.01.2006. године употреба антибиотика код животиња као стимулатора раста.

Антибиотици и хемиотерапеутици су јединствена фармаколошка средства која не утичу само на пацијента него и на животну средину, тако да се последице прекомерне и често непотребне примене антимикробних средстава у ветеринарској медицини огледају у:

- појави резистентних сојева бактерија код домаћих животиња;
- директном или индиректном преношењу резистентних патогених сојева бактерија од животиња на људе;
- хоризонталном преношењу гена резистенције од бактерија од животиња у патогене бактерије људи;
- повећању броја инфекција људи изазваних резистентним сојевима бактерија; и
- неефикасности антимикробне терапије код људи и животиња.

Савремена одговорна примена антибиотика мора се одликовати максималним антимикробним ефектом и минималним утицајем на појаву и ширење резистенције код микроорганизама.

АКТУЕЛНА ДЕШАВАЊА НА СВЕТСКОМ НИВОУ

Прошло је више од 40 година када је Levy са сарадницима објавио студију која је указала на директну везу између употребе антибиотика на фармама и појаве антимикробне резистенције код људи. У наредним деценијама објављени су бројни научни радови који пружају додатне доказе о ширењу резистентних микроорганизама у ланац исхране и последично људе.

Човечанство се суочава са великом кризом антимикробне резистенције и Светска здравствена организација, Центар за контролу и превенцију болести САД, Европски центар за превенцију и контролу болести, Европска агенцију за лекове и Светски економски форум су се огласили указивајући на глобалну претњу јавном здрављу.

У САД током 2014. године употребљено је 15,4 милиона килограма антимикробних средстава код животиња, што је четири пута више него код људи (3,5 милиона килограма). Упркос упозорењима о кризи антимикробне резистенције у САД укупна потрошња антимикробних средстава код животиња повећала се за преко 20% током периода од 2011. до 2015. године (Spellberg, 2016).

Бактерије резистентне на антибиотике пореклом од животиња, прелазе у земљиште и у воду, директно контаминирају особе које су у контакту са њима, а индиректно преко предмета или преко хране животињског порекла се могу ширити у популацију људи.

Током деведесетих година прошлог века у Шпанији након примене флуорохинолона код животиња забележено је огромно повећање инфекција људи изазваних бактеријама из фамилије *Enterobacteriaceae* резистентним према овим хемиотерапеутицима. Идентичан узрочно последични феномен забележен је и у САД који је допринео забрани примене флуорохинолона код животиња 2005. године. У истраживању које је 2014. године спровела Управа за храну и лекове Сједињених Америчких Држава (ФДА) код сојева бактерија изолованих од живине није више утврђена резистенција према датом антимикуробном средству (FDA, 2016). У истом истраживању утврђен је пад преваленције резистенције *Salmonella* према цефтриаксону, чија је употреба код животиња забрањена у САД 2012. године, што несумњиво потврђује повезаност употребе антибиотика код животиња и појаву резистентних сојева бактерија не само код животиња него и код људи.

Преознавајући антимикуробну резистенцију као горући глобални проблем јавног здравља, Светска здравствена организација је у мају 2015. године усвојила на 68. скупштини резолуцију о Глобалном акционом плану за контролу резистенције на антибиотике и позвала по овом питању, у контексту концепта "Јединственог здравља", на блиску сарадњу Организацију за храну и пољопривреду Уједињених нација (ФАО), Светску организацију за здравље животиња (ОИЕ) и Светску здравствену организацију (СЗО).

Намера Глобалног акционог плана СЗО је да обезбеди, колико год је то могуће, континуитет успешне терапије и превенције инфективних болести применом ефикасних антимикуробних лекова, уз њихову одговорну примену и доступност свима којима су потребни. У складу са Глобалним планом до средине 2017. године државе су требале да развију своје сопствене националне акционе планове о антимикуробној резистенцији.

Ради очувања ефикасности антимикуробних средстава, Глобални акциони план СЗО поставио је пет стратешких циљева:

- (1) јачање јавне позорности и познавања проблема антимикуробне резистенције;
- (2) боље разумевање феномена резистенције путем епидемиолошког надзора и истраживања;
- (3) смањење инциденције инфекција;
- (4) оптимизовање употребе антимикуробних средстава у хуманој и ветеринарској медицини;
- и
- (5) обезбеђивање одрживих улагања у борбу против антимикуробне резистенције.

Организација за храну и пољопривреду Уједињених нација (ФАО) и Светска организација за здравље животиња (ОИЕ) узели су активно учешће у изради Глобалног акционог плана Светске здравствене организације, који наглашава потребу за ефикасним приступом "јединственог здравља" у чијој реализацији је неопходна блиска координација између бројних међународних сектора и актера, укључујући представнике из хумане и ветеринарске медицине, пољопривреде, финансија, заштите животне средине као и удружења потрошача.

Организација за храну и пољопривреду Уједињених нација (ФАО), схватајући све озбиљнију претњу јавном здрављу и одрживој производњи хране, у јуну 2015. године усвојила је резолуцију о антимикуробној резистенцији. Акциони план ФАО за антимикуробну резистенцију односи се на:

побољшање позорности јавности о антимикуробној резистенцији и ризицима који овај глобални проблем доноси;

развијање адекватних система надзора и мониторинга антимикуробне резистенције и употребе антимикуробних средстава у пољопривреди и дуж ланца производње хране;

унапређење контроле употребе антимикуробних средстава и праћења антимикуробне резистенције; и увођење добре произвођачке праксе у пољопривреду и прехранбену индустрију, као и одговорне употребе антимикуробних средстава.

Акциони план ФАО подржава СЗО Глобални акциони план за контролу резистенције на антибиотике, а циљ је пружање помоћи при изради мултисекторских националних акционих планова за борбу против антимикуробне резистенције.

На 83. генералној скупштини Светске организације за здравље животиња (ОИЕ) 2015. године, свих 180 држава чланица пружило је подршку Глобалном акционом плану СЗО за

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

контролу резистенције на антибиотике и неопходности развоја националних акционих планова. Годину дана касније, на 84. генералној скупштини ОИЕ-а усвојена је стратегија која је обухватила све активности које треба да се спроводе у борби против антимикробне резистенције, обухватајући и имплементацију истих код животиња.

ОИЕ стратегија антимикробне резистенције има четири главна циља (ОИЕ, 2016):

- побољшање позорности и разумевање озбиљности проблема;
- унапређење знања о антимикробној резистенцији јачањем епизоотиолошког надзора и истраживања;
- успостављање доброг система управљања и обезбеђивање адекватних капацитета; и
- примену међународних стандарда.

ОИЕ је усвајањем и израдом већег броја резолуција и смерница омогућио (ОИЕ, 2015):

- хармонизацију националних програма епизоотиолошког надзора и мониторинга антимикробне резистенције, као и мониторинга употребе антимикробних средстава;
- увођење одговорне и мудре употребе антимикробних средстава код животиња,
- анализу ризика од појаве и ширења антимикробне резистенције услед коришћења антибиотика и хемиотерапеутика у ветеринарској медицини;
- стандардизацију лабораторијске методологије испитивања осетљивости бактерија према антимикробним средствима; и
- формирање листе антимикробних средстава од значаја у ветеринарској медицини.

Као што је и раније у тексту наведено, на генералној скупштини Уједињених нација одржаној 21. септембра 2016. године усвојена је декларација о растућој опасности од резистентних микроорганизама према антимикробним средствима и неопходности израде у складу са Резолуцијом СЗО националних мултисекторских акционих планова и програма. Да би се омогућила и адекватна имплементација датих планова, потребно је извршити процену потребних ресурса и неопходних техничких и финансијских улагања у истраживања, надзор, мониторинг и контролу, у побољшање капацитета лабораторија и регулаторних тела, као и стручно образовање и обуку.

АКТУЕЛНА ДЕШАВАЊА У ЕВРОПСКОЈ УНИЈИ

У државама чланицама Европске Уније антимикробна резистенција је одговорна за око 25.000 смртних случајева људи годишње, а процењује се да додатни трошкови здравствене заштите људи и животиња као и губици у сточарској производњи износе око 1,5 милијарди евра годишње.

Европска унија је прва препознала неопходност суочавања са феноменом антимикробне резистенције, што и показује доношење стратегије по овом питању 2001. године, која је додатно ојачана акционим планом донетим 2011. годину. Нови и свеобухватни акциони план антимикробне резистенције ЕУ усвојен је 29. јуна 2017. године, и који се заснива на евалуацији и имплементацији претходног плана, повратним информацијама од стране Европске комисије и јавног мњења. Нови акциони план ЕУ пружа оквир за наставак и обимније активности за смањење појаве и ширења резистенције на антибиотике, као и развоја нових ефикасних антимикробних средстава.

У Европској унији мониторинг и извештавање о антимикробној резистенцији коменсалних и зоонотских бактерија код домаћих животиња, укључујући свиње, живину и говеда, регулисани су Одлуком 2013/652/EU (European Commission, 2013). Овом одлуком прописује се обим мониторинга и усклађује прикупљање података, наводе се врсте бактерија и порекло датих изолата (врста животиња и хране), као и технички захтеви узорковања, панела антибиотика према којима се испитује резистенција, примењиване лабораторијске методе испитивања, критеријума за читавање резултата као и извештавања. Државе чланице ЕУ су дужне да редовно извештавају о добијеним резултатима испитивања осетљивости према антибиотцима репрезентативног броја изолата *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* и *Escherichia coli* укључујући ESBL (β -лактамазе проширеног спектра деловања), AmpC β -лактамаза и карбапенемаза продукујуће сојеве *E.coli*.

Осим тога, државе чланице на добровољној основи прикупљају и прослеђују податке о антиминобрној резистенцији *Campylobacter coli*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*. У зависности од врсте и категорије животиња (коке носиље, товни пилићи, ћурке, товљеници и јунад) изолација сојева наведених врста бактерија врши се из различитих узорака: фецеса, брисева објеката, садржаја црева, трупова или меса.

Државе чланице ЕУ систематски узоркују, спроводе лабораторијске анализе и достављају резултате испитивања осетљивости бактерија према прописаној палети антибиотика и то: 2014, 2016, 2018 и 2020. године код кока носиља, товних пилића, свежег пилећег меса и ћурки, а 2015, 2017 и 2019. године код товљеника, јунади, свињског и јунећег меса. Испитивањем осетљивости треба да буде обухваћено по 170 изолата наведених бактерија из одговарајућих узорака, мада државе чланице које имају малу производњу пилећег или свињског меса (мање од 100.000 тона) могу да испитају за дате врсте узорака по 85 изолата.

Европска агенција за безбедност хране (ЕФСА), ради усклађивање мониторинга и извештавања о појави резистентних бактерија код животиња и дуж ланца производње хране у државама чланицама, објавила је неколико предлога односно смерница који су се односили на:

- (а) усаглашену листу антибиотика обухваћених планом мониторинга;
 - (б) спровођење циљане појачане контроле антиминобрне резистенције код одређених врста бактерија;
 - (ц) спровођење активног програма мониторинга антиминобрне резистенције код здравих животиња; и
 - (д) граничне вредности минималних инхибиторних концентрација (МИК).
- Контрола антиминобрне резистенције код животиња требало би да обухвати следеће мере којима би се редуковало појављивање и ширење резистентних бактерија:
- (а) ограничавање изузев терапијских других примена антибиотика;
 - (б) побољшање биосигурности на фармама као и хигијенских услова и праксе;
 - ц) развој образовних програма усмерених на ветеринаре и фармере; и
 - д) повезивање система надзора антиминобрне резистенције бактерија код људи и код животиња.

Европски центар за превенцију и контролу болести (European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC), Европска агенција за безбедност хране (EFSA) и Европска агенција за лекове (European Medicines Agency – EMA) публиковали су 2017. године заједничко мишљење о кључним индикаторима праћења количине употребљених антибиотика као и антиминобрне резистенције код људи и животиња (ECDC, EFSA и EMA, 2017).

Предложени су следећи индикатори праћења потрошње антибиотика код животиња:

примарни индикатор - укупна продаја антибиотика у милиграмима активних супстанци по килограму тежине животиња (користи се при обрачунау population correction unit - PCU - коригована вредност просечне тежине животиња при лечењу - mg/PCU);

- секундарни индикатори
- продаја цефалоспорина треће и четврте генерације у милиграмима по килограму тежине животиња (mg/PCU);
- продаја хинолона у милиграмима по килограму тежине животиња (mg/PCU), прецизирајући проценат флуорохинолона;
- продаја полимиксина у милиграмима по килограму тежине животиња (mg/PCU).

Следећи индикатори су предложени за праћење антиминобрне резистенције бактерија код животиња:

- примарни индикатор – проценат сојева *E. coli* изолованих од товних пилића и ћурака, товљеника и телади током спровођења мониторинга према Одлуци 2013/652/EU који су осетљиви на све антибиотике испитиваног панела;
- секундарни индикатори
- проценат товних пилића и ћурака, товљеника и телади код којих је утврђено присуство ESBL/ AmpC/ карбапенемаза *E. coli* током спровођења мониторинга према Одлуци 2013/652/EU;

- проценат сојева *E. coli* изолованих од товних пилића и ћурака, товљеника и телади током спровођења мониторинга према Одлуци 2013/652/EU који су резистентни на најмање три антибиотика испитиваног панела;
- проценат сојева *E. coli* изолованих од товних пилића и ћурака, товљеника и телади током спровођења мониторинга према Одлуци 2013/652/EU који су резистентни на ципрофлоксацин.

Комитет за ветеринарске лекове Европске агенције за лекове (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use - CVMP ЕМА) објавио је за период 2016. до 2020. године стратегију регистрације и рационалне употребе антимикробних средстава код животиња, а која садржи следећих шест циљева (ЕМА, 2016):

- Ради безбедне и одрживе примене антимикробних лекова у ветеринарској медицини потребно је пре регистрације израдити мишљење о ефективности препарата и потребним мерама које исту обезбеђују;
- Пре одобравања употребе антимикробних средстава код животиња потребно је извршити процену ризика дате примене по јавно здравље, као и могућности ширења гена резистенције од животиња у природу или људе;
- Код раније регистрованих антимикробних средстава мора се спроводити мониторинг и вршити анализа продаје и употребе истих, укључујући и епизоотиолошки надзор резистенције одређених патогена укључујући и узрочника зооноза. По потреби треба извршити преиспитивања одобрене регистрације;
- Треба усмерити истраживања на проналажење нових антимикробних средстава као и потенцијалних алтернатива антибиотика;
- Промовисање одговорне употребе антибиотика;

Успостављање блиске и сталне сарадње са Европском Комисијом као и њеним агенцијама, надлежним телима у државама чланицама, организацијама за здравље људи и здравље животиња, фармацеутским компанијама као и представницима сектора пољопривреде и производње хране. Заједнички треба припремити смернице за одговорну употребу антимикробних средстава код животиња.

У стратегији Комитета за ветеринарске лекове Европске агенције за лекова, између осталог, обухваћена је следећа проблематика:

- Примена антимикробних средстава у метафилактичне сврхе и код превенције болести. Подаци утрошених лекова у ветеринарској медицини током 2013. године у ЕУ показују да је 91.5% антимикробних средстава код животиња апликовано орално, путем премикса, прашка или течности. Потребно је допунити смерницу и прецизно дефинисати обим и ограничења, као и поступак за одобравање примене антибиотика у метафилакси и профилакси код животиња;
- Утврђивање листе антимикробних средстава који се чувају искључиво за терапију људи, као и активно учешће у изради нове ЕУ регулативе о ветеринарским лековима;
- Употреба антимикробних средстава само на основу рецепта издатог од стране ветеринара; и
- Израда националних и регионалних смерница примене одговарајућих антимикробних средстава код најзначајнијих инфективних болести животиња, имајући у виду присуство и раширеност резистенције, ризике по здравље људи и животиња, као и доступност регистрованих лекова на тржишту.

Европска комисија је 11.09.2015. године објавила смерницу за одговорну употребу антимикробних средстава у ветеринарској медицини (European Commission, 2015). Имајући у виду израду нове ЕУ уредбе о ветеринарским лековима, постоји велика вероватноћа да ће одређени ставови Европске комисије из смернице бити преточени у обавезне захтеве нове регулативе. Кључни циљ смернице је минимализовање потребе за коришћењем антимикробних средстава код превенције болести животиња, а које се првенствено могу отклонити применом добре произвођачке праксе, доброг менаџмента и адекватних мера биосигурности, као и имплементацијом интегрисаних програма контроле болести.

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

У датом ЕУ смерници наведени су следећи принципи одговорне употребе антимикробних средстава у ветеринарској медицини:

- Прописивање и дозирање антимикробних средстава морају бити оправдани постављањем дијагнозе и у складу са важећим научним сазнањима;
- Прописивање антимикробног средства требало би да се заснива на клиничком прегледу животиње од стране ветеринара који и прописује лек. Уколико је изводљиво, испитивање осетљивости према антибиотцима требало би да се спроведе ради избора адекватног антибиотика;
- Метафилакса антибиотцима треба да буде прописана у случајевима неопходне терапије, а ветеринар треба да оправда и документује ширење инфекције у запату/стаду. Метафилакса никада не би требала да се примењује уместо доброг менаџмента;
- Рутинска профилакса антибиотцима мора се избећи и примењивати само у изузетно специфичним околностима;
- Оболеле животиње треба одвојити и индивидуално лечити, избегавајући примену антибиотика код целог запата/стада;
- Све релевантне информације о животињама, узрочнику и природи инфекције као и избору доступних антимикробних средстава треба узети у обзир пре доношења одлуке о лечењу;
- Антибиотици уског спектра увек треба да буду први избор, осим ако је претходним испитивањем утврђено да су код дате јединке или стада били неефикасни. Треба избегавати коришћење антибиотика широког спектра као и комбинација антибиотика, са изузетком ако исте постоје у регистрованим препаратима;
- Уколико животиња или група животиња имају рецидивне инфекције које захтевају антибиотску терапију, треба утврдити разлог и по потреби променити услове производње, држања животиња и/или менаџмент;
- Треба минимализовати употребу антибиотика који доводе до ширења трансмисибилне резистенције;
- Одређена антимикробна средства се налазе на СЗО листи критично значајних лекова регистрованих за употребу само код људи. Како они нису регистровани за употребу у ветеринарској медицини изузетно у одређеним ситуацијама се могу користити код животиња ако је дата супстанца наведена у Табели 1 анекса Уредбе Комисије (ЕУ) бр. 37/2010;
- Off-label употребу (изван регистрације лека) антимикробних средстава код кућних љубимаца треба избегавати и применити је само у случају да лабораторијски резултати потврђују да нема других ефикасних антибиотика;
- Антибиотска терапија мора бити спроведена у складу са инструкцијом ветеринара који је прописао лек;
- Потребу за антибиотском терапијом треба редовно преиспитивати ради избегавања непотребног лечења;
- Постоперативна употреба антибиотика може се минимализовати применом асептичних техника;
- Када је могуће, треба примењивати алтернативне стратегије контроле болести, на пример вакцинацију;
- Треба користити систем фармаковигилансе ради прикупљања информација о нежељеним ефектима лекова и уочавања одсуства очекиваног терапијског ефекта односно појаве резистенције код постојећих, нових или алтернативних опција лечења;
- Треба организовати мрежу лабораторија која може изводити испитивања осетљивости према антибиотцима коменсалних и зооноотских микроорганизама као и одређених патогена животиња (поред оних прописаних у Одлуци 2013/652/EU пре свега метацилин резистентни *Staphylococcus aureus*).

АКТУЕЛНА ДЕШАВАЊА У РЕПУБЛИЦИ СРБИЈИ

У Републици Србији од 2010. године антибиотици се код домаћих животиња користе искључиво у терапијске и метафилактичке сврхе и забрањена је њихова примена као стимулатора раста.

Агенција за лекове и медицинска средства Србије (АЛИМС) је надлежна да, на основу увида у комплетан СТД или Европски досије, издаје националну дозволу за стављање у промет лекова. Процедуре издавања дозволе за стављање у промет лека усклађене су са директивама ЕУ и смерницама Добре регулаторне праксе.

АЛИМС, сходно обавезама које су утврђене Законом о лековима и медицинским средствима, прикупља и обрађује податке о промету лекова, са циљем да омогући увид у обим и врсте лекова који су коришћени у Републици Србији.

Према подацима АЛИМС-а, у Републици Србији током 2014, 2015 и 2016. године био је највећи промет следећих антимикробних лекова (количине исказане као кг активних супстанци) (АЛИМС, 2018):

стрептомицин	12426.12, 10223.27 и 11562.79;
сулфадимидин	8462.84, 8185.97 и 5717.79;
окситетрацилин	7888.79, 8327.79 и 7805.75;
амоксицилин	7783.12, 7848.15 и 10023.60;
доксциклин	7469.81, 6744.38 и 6012.09;
неомицин	4061.07, 4567.77 и 3052.47;
тиамулин	3702.65, 3025.29 и 3442.65;
хлортетрацилин	3668.63, 4047.03 и 4461.19;
енрофлоксацин	3533.29, 4571.69 и 4272.33;
тилозин	3164.12, 3665.74 и 3619.60;
бензилпеницилин-прокаин	2561.55, 2376.98 и 2626.52;
дихидрострептомицин	2344.08, 2041.70 и 2310.55;
флорфеникол	2195.76, 2607.09 и 2583.59;
колистин	1588.53, 2513.27 и 2765.64.

Укупан промет антимикробних средстава у Републици Србији 2014. године износио је 76475.61, 2015. године 76481.06 и 2016. године 75520.41 килограма активних супстанци. Током овог периода на годишњем нивоу промет клоксацилина износио је 48.48- 61.42, цефтиофура 50.48 - 97.35, линкомицина 635.08 - 894.04, гентамицина 486.68 - 535.61, спектиномицина 325.21 - 431.61, флумеквина 226.47 - 317.28 и триметоприма 457.14 - 631.53 килограма активне супстанце.

Иако је планирано у Управи за ветерину 2006. године увођење информационог система и формирање база података производње и промета лекова до данас није дошло до реализације овог пројекта. Имплементацијом истог обезбедила би се следљивост промета и коришћења лекова, укључујући и антимикробних средстава, и омогућила анализа прикупљених података и примена одговарајућих мера у циљу спречавања ширења резистенције на антибиотике.

Данас се на основу броја животиња може утврдити само промет антимикробних средстава у милиграмима активних супстанци по килограму тежине животиња (mg/PCU), без могућности прецизније анализе употребе антибиотика код одређених врста и категорија животиња.

Попут праћења потрошње антибиотика код животиња, у Републици Србији није до данас ни успостављен мониторинг антимикробне резистенције бактерија код животиња на репрезентативном броју изолата *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Campylobacter coli*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*. Иако постоји већи број истраживања који се односе на присуство, раширеност и карактеризацију механизма резистенције бактерија на антибиотике (Крњаић, 2000; Крњаић и сар, 2005; Тодоровић и сар, 2015; Тодоровић и сар, 2018), никада није у Републици Србији спроведено испитивање у складу са захтевима Одлуке 2013/652/EU, а последично и не постоје релевантни подаци о раширености резистенције нити могућност одређивања индикатора праћења антимикробне резистенције бактерија код животиња.

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

Током 2017-2018. године израђен од стране мултидисциплинарног тима стручњака, чланова Посебне радне групе за рационалну употребу антибиотика Министарства здравља Републике Србије, Национални програм и акциони план за контролу резистенције бактерија на антибиотике за период 2018–2022. године, и чије се усвајање очекују у наредним месецима.

Национални програм за контролу резистенције бактерија на антибиотике одређује циљеве, план активности и поступке који ће се у Републици Србији спроводити како би се зауставило ширење резистенције бактерија на антибиотике у хуманој и ветеринарској медицини, а општи циљеви су смањење употребе антибиотика и смањење антимикробне резистенције.

Програм и акциони план одржавају потребе, проблеме и приоритетне циљеве сходно ситуацији у Републици Србији, а ослањају се и у сагласности су са СЗО Глобалним акционим планом за контролу резистенције на антибиотике.

Према акционом плану очекује се:

- формирање Националне мултисекторске координационе групе са одобреним задацима и функцијама у првом кварталу 2019. године;
- обезбеђивање (прикупљање и анализа) података о резистенцији бактерија изолованих од животиња до краја 2022. године;
- обезбеђивање (прикупљање и анализа) података о резистенцији бактерија изолованих из хране животињског порекла у складу са законском регулативом од краја 2022. године;
- развој софтверског решења за праћење резистенције код животиња и повезивање са постојећим базама података у ветеринарској медицини (научни и специјалистички ветеринарски институти) до краја 2020. године;
- именовање лабораторија које ће вршити испитивање на антимикробну резистенцију референтним методама, дефинисање њихових активности и јачање капацитета до краја 2020. године;
- овлашћивање односно одређивање националне референтне лабораторије до краја 2021. године;
- прикупљање података о промету антибиотика (подаци о продаји) у ветеринарској медицини. Развој софтвера (електронски систем за праћење промета антибиотика у ветеринарској медицини) до краја 2020. године;
- унапређење прикупљених података (подаци о продаји) према врстама животиња до краја 2022. године;
- промоција метода за превенцију болести и промоција вакцинације – континуирано;
- промоција биосигурносних мера на газдинствима/фармама – континуирано;
- дефинисање листе ветеринарских лекова за животиње које се користе за производњу хране, у складу са ОИЕ препорукама до краја 2019. године;
- успостављање законодавства за спречавање загађења животне средине антибиотикима до краја 2022. године;
- успостављање система и јачање капацитета за уклањање/одлагање неискоришћених антибиотика који се користе у ветеринарској медицини, у складу са посебним прописима до краја 2022. године;
- припрема националних водича за употребу антибиотика у ветеринарској медицини до краја 2019. године;
- кампања за рационалну употребу антибиотика - континуирано информисање и едукација стручне јавности о рационалној употреби антибиотика у хуманој и ветеринарској медицини – континуирано;
- кампања за рационалну употребу антибиотика - континуирано информисање и едукација опште јавности о рационалној употреби антибиотика у хуманој и ветеринарској медицини – континуирано;
- континуирано информисање и едукација за докторе ветеринарске медицине, власнике фарми, узгајиваче животиња о рационалној употреби антибиотика – континуирано;
- ажурирање наставних планова и програма факултета који укључују и рационалну употребу антибиотика и антимикробне резистенције до краја 2022. године;

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

- студија за процену знања и свесности међу здравственим радницима у хуманој и ветеринарској медицини о употреби антибиотика до краја 2019. године;
- континуирана едукација здравствених радника у хуманој и ветеринарској медицини са мерама за прописивање, издавање и употребу антибиотика, мере превенције и контроле инфекција – континуирано;
- едукација ветеринара, власника и одгајивача животиња о важности правилног одлагања неискоришћених и антибиотика након истека рока до краја 2022. године;
- сарадња са европским и глобалним мрежама за праћење антимикробне резистенције у ветеринарској медицини, као и Светском организацијом за здравље животиња (ОИЕ) – континуирано;
- прикупљање података и извештавање о антимикробној резистенцији према EFSA до краја 2022. године;
- учешће установа из Србије у међународним клиничким студијама и истраживањима у области хумане и ветеринарске медицине – континуирано.

ЗАКЉУЧАК

Имајући у виду антимикробну резистенцију, један од најважнијих приоритета у Републици Србији је усвајање Националног програма и акционог плана за контролу резистенције бактерија на антибиотике као и формирање Националне мултисекторске координационе групе.

Према акционом плану за контролу резистенције бактерија на антибиотике у периоду од 2018. до 2022. године у Републици Србији планиран је велики број активности, а истакали би да је у циљу побољшања контроле антимикробне резистенције код животиња неопходно предузети пре свега следеће:

- (а) усвојити и применити Национални програм и акциони план за контролу резистенције бактерија на антибиотике;
- (б) израдити и имплементирати смернице одговорне употребе антимикробних средстава у ветеринарској медицини;
- (ц) успоставити систем надзора потрошње антимикробних средстава; и
- (д) успоставити мониторинг антимикробне резистенције коменсалних и зоонотских бактерија код домаћих животиња у складу са захтевима Одлуке 2013/652/EU.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агенција за лекове и медицинска средства Србије, 2018, Промет ветеринарских лекова 2014-2016, COBISS.SR-ID 262840076. 2. ECDC, EFSA, EMA, Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals, 2017, EFSA Journal, 15(10), 5017 <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5017>. 3. European Commission, 2013, Commission Implementing Decision on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria, 2013/652/EU, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013D0652&from=EN>. 4. European Commission, 2015, Commission Notice Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine, 2015/C. 299/04 https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/2015_prudent_use_guidelines_en.pdf. 5. European Medicines Agency, 2016, CVMP strategy on antimicrobials 2016-2020, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/10/WC500214901.pdf. 6. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2016, The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020, ISBN 978-92-5-109392-4, <http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>. 7. Food and Drug Administration, 2016, FDA NARMS retail meat interim report for Salmonella shows encouraging early trends continue; includes whole genome sequencing data for the first time. <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm498038.htm>; <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM498134.pdf>. 8. Крњаић Д, 2000, Испитивање резистенције бактерија изолованих од домаћих животиња према хемотерапијским средствима, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, докторска дисертација. 9. Krnjaic D, Mistic D, Asanin R, 2005, Investigation of sensitivity and

resistance to antibiotics and chemotherapeutics in *E. coli* strains isolated from animals bred in intensive farming conditions, *Acta Veterinaria*, Vol 55, No 5-6 ,pp 501-509. **10.** O'Neill OJ, 2014, Antimicrobial Resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf. **11.** Spellberg B, Hansen GR, Kar A, Cordova CD, Price LB, Johnson JR, 2016, Antibiotic resistance in humans and animals. Discussion Paper, National Academy of Medicine, Washington, DC. <http://www.nam.edu/antibiotic-resistance-in-humans-and-animals>. **12.** Todorović D, Velhner M, Grego E, Vidanović D, Milanov D, Krnjaić D, Kehrenberg C, 2018, Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Bovine Clinical Mastitis and Pigs in the Vojvodina Province, Serbia. *Microb Drug Resist*, Vol 24, No 1, pp 95-103. doi:10.1089/mdr.2017.0016. **13.** Todorović D, Velhner M, Milanov D, Videnović D, Suvajdžić Lj, Krnjaić D, 2015, Characterization of tetracycline resistance of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Infantis* isolated from poultry in the northern part of Serbia, *Acta Veterinaria*, Vol 65, No 4, pp 548-556. **14.** United Nation General Assembly, 2016, Political Declaration of the High-Level Meeting of the General Assembly on Antimicrobial Resistance A/RES/71/3 https://digitallibrary.un.org/record/845917/files/A_RES_71_3-EN.pdf. **15.** World Health Organization, 2015, Global Action Plan on Antimicrobial Resistance Document A68/20, ISBN 978 92 4 150976 3, http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf. **16.** World organisation for Animal Health, 2015, OIE Standards, Guidelines and Resolution on antimicrobial resistance and the use of antimicrobial agents, ISBN: 978-92-95108-16-5, http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN-book-AMR.PDF. **17.** World organisation for Animal Health, 2016, The OIE Strategy on Antimicrobial Resistance and the Prudent Use of Antimicrobials, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdf

ANTHELMINTIC MODES OF ACTION AND DRUG RESISTANCE

Alan P. Robertson

Department of Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA

Abstract

Helminth parasites from the nematode and platyhelminth phyla cause significant disease in both production and companion animals. Anthelmintic drugs are some of the most widely used compounds in veterinary medicine. Unfortunately, the anthelmintic pharmacopeia is limited and long term repeated use has led to drug resistance in many helminth species. Here we review the mechanism of action of existing anthelmintic drugs and potential new compounds. Our knowledge of drug resistance mechanisms is limited: some benzimidazole resistant isolates have arisen from a single amino acid change in the tubulin protein while resistance to other classes of drug is less well understood and likely to be polygenic in nature. We will review the current knowledge of mechanisms of resistance and strategies for treating resistant parasites where available.

Benzimidazoles

This group of compounds are some of the oldest and most commonly used anthelmintics. Thiabendazole was introduced in 1961 followed by mebendazole, albendazole and flubendazole. The benzimidazoles (BZs) selectively bind with high affinity to parasite β -tubulin and inhibit microtubule polymerization. This results in the destruction of cell structure and consequent death of the parasite (Lacey, 1990). The mechanisms underlying resistance to the BZs are probably the most well understood of all anthelmintics. Most, if not all, BZ resistant isolates have single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the beta-tubulin gene. These SNPs result in single amino acid changes that confer resistance: codon 200 (F200Y) (Kwa et al. 1994); codon 167 (F167Y) (Silvestre & Cabaret 2002) and codon 198 (E198A) (Ghisi et al. 2007). The understanding of specific genetic changes underlying BZ resistance offer some hope for effective field based assays for detection.

Macrocyclic lactones

Macrocyclic lactones (MLs) (ivermectins and milbemycins) were introduced in the 1980s as antiparasitic agents with broad spectrum activity against nematodes and arthropods (Davis & Green, 1986; McKellar et al. 1996). Examples of commercially available MLs include ivermectin, abamectin, doramectin, selamectin, milbemycin oxime and moxidectin. MLs are selective agonists of glutamate-gated chloride channels (GluCl) which are present in neurons and pharyngeal muscles of nematodes and arthropods, but absent in humans. ML activation of GluCl inhibits movement and pharyngeal pumping (Cully et al. 1994; Wolstenholme & Rogers, 2005). Resistance to MLs is an ever increasing concern in the field. Many ML resistant laboratory isolates have been generated that contain mutations in GluCl subunit genes. However, the genetic changes in field isolates resistant to the MLs is less well understood. Only a limited number of field isolates have mutations in GluCl subunits, the mechanism of resistance for the majority remains elusive (Kotze et al. 2014 for review).

Cholinomimetics

The Imidazothiazoles (levamisole) and the tetrahydropyrimidines (pyrantel, morantel & oxtel) act as nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists. They bind to nAChRs on body wall muscles, causing spastic paralysis of the worm, and hence, its expulsion from the host (Aceves et al.

1970). The lack of pyrantel activity against whipworms led to the development of oxantel, an m-oxyphephenol derivative of pyrantel (Macfarland & Howes, 1972). The mode of action of these compounds is further complicated by the diversity of nAChR subtypes in nematodes (Martin et al. 2015), for example, oxantel preferentially activates the N-subtype of nAChRs in *A. suum* (Martin et al. 2004) while levamisole activates an L-subtype (Martin et al. 2015). As with the MLs there are a large number of laboratory raised resistant isolates, mostly in *C. elegans*. These laboratory bred isolates show mutations or nulls in a diverse array of genes: some involve nAChR subunit genes e.g. *unc-38*, *unc-63*, *unc-29*, *lev-1*, *lev-8* etc. while others are mutations in different proteins involved in nAChR signaling and the contraction-coupling cascade. Unfortunately, the mechanisms underlying resistance in field isolates remains poorly understood. The body of literature suggests that resistance to cholinomimetics in parasitic nematodes is likely to be polygenic rather than a simple single-gene mechanism, and involves changes in expression of nAChR subunits, truncated receptor subunits, and mutations in receptor subunits and other mechanisms (see Kotze et al. 2014 for review).

Spiroindoles

Derquantel (2-deoxy-paraherquamide or PNU-141962) is the first semi-synthetic member of this new class of anthelmintics (Little et al. 2011). Derquantel which is also the first commercial member of the spiroindoles, was introduced in 2010 for use in combination with the macrocyclic lactone, abamectin, under the trade name STARTECT®, for the control of parasitic nematodes in sheep. Derquantel acts as an antagonist of nAChRs to cause flaccid paralysis which results in the expulsion of parasites from the host (Robertson et al. 2002). The combination of derquantel and abamectin has an excellent broad spectrum efficacy against several parasitic nematodes in sheep, including those resistant to benzimidazoles, levamisole and macrocyclic lactones (Geurden et al. 2012).

Amino-acetonitrile derivatives

The AADs are a new class of synthetic anthelmintics with broad spectrum activity against nematodes that are resistant to the benzimidazoles, imidazothiazoles and macrocyclic lactones (Kaminsky et al. 2008a). Monepantel, also known as AAD 1556, is the first member of this class to be developed for the control of a broad range of parasitic nematodes in sheep (Kaminsky et al. 2008b). Genetic screens of *C. elegans* identified ACR-23, which belongs to the nematode-specific DEG-3 subfamily of nAChRs, as the target of AADs (Kaminsky et al. 2008a). Low concentrations (<1 nM), monepantel acts as a positive allosteric modulator of *H. contortus* MPTL-1 and *C. elegans* ACR-20 receptors, and at high concentrations (>0.1 µM), it acts as a direct agonist of these receptors (Kaminsky et al. 2008a). In a different study, monepantel by itself did not activate *H. contortus* DEG-3/DES-2 receptors expressed in *X. laevis* oocytes, but did cause a potentiation in the receptors' current responses when co-applied with choline (Rufener et al. 2009).

Cyclooctadepsipeptides

Cyclooctadepsipeptides were discovered in the early 1990s. In 1992, PF1022A, the parent compound, was isolated from the fungus, *Mycelia sterilia*, which grows on the leaves of the plant, *Camellia japonica* (Sasaki et al. 1992). PF1022A is made up of four N-methyl-L-leucine, two D-lactate and two D-phenyllactate residues that are arranged as a cyclic octadepsipeptide with an alternating L-D-L configuration (Harder et al. 2003). Emodepside, formerly PF1022-221 and BAY 44-4400, is a semisynthetic derivative of PF1022A, produced by attaching a morpholine ring at the para position of the two D-phenyllactic acids (Harder et al. 2005). This modification resulted in improved pharmacokinetic properties. The anthelmintic potential of PF1022A and emodepside has been reported in numerous *in vitro* and *in vivo* studies (Kulke et al. 2013a, 2013b). Interestingly, PF1022A and emodepside have a broad spectrum of activity against several nematode species including those that are resistant to benzimidazoles, levamisole and ivermectin (von Samson-Himmelstjerna 2005). This indicated that the mode of action of the cyclooctadepsipeptides is different and that this class of anthelmintics possess 'resistance-busting' properties. Studies on the mode of action suggest that emodepside targets the calcium-activated potassium channel (SLO-1). Mutagenesis screens in *C. elegans* revealed a lack of sensitivity of *slo-1* null mutants to emodepside's inhibitory effects on locomotion and feeding. Inhibition

of locomotion was achieved via the action of emodepside on SLO-1 expressed in body wall muscles or neurons, whereas inhibition of feeding was achieved via the action of emodepside on SLO-1 expressed in neurons but not muscle (Guest et al. 2007).

Triclabendazole

The BZ compound, triclabendazole (TCBZ), is the drug of choice for controlling *Fasciola hepatica* infection in livestock and humans due to its ability to target the parasite at the earliest stages of infection as it migrates through the liver. TCBZ resistance was first reported in Victoria, Australia (Overend & Bowen, 1995) and cases of resistance in both sheep and cattle have been reported in multiple countries, most recently in naturally infected Australian beef and dairy cattle herds (Brockwell et al., 2013). Despite significant advances in our understanding of BZ resistance, and identification of BZ resistance markers for several nematode species, the specific nature of the mode of action of TCBZ against *F. hepatica*, and mechanism of TCBZ resistance, remain unknown.

Summary

Treatment of helminth infections remains an ongoing challenge. The limited number of drugs available and the increasing reports of resistance are problematic. Fortunately, the release of newer compounds like derquantel, monepantel and emodepside has provided greater treatment possibilities. However, as with any group of drugs, continued and widespread use is likely to lead to the development of resistance to these compounds. Treatments that involve multiple compounds (with different modes of action) or treating with different drugs at different time points is predicted to lessen the likelihood of drug resistance. Alternatively, selective treatment (of only symptomatic animals) leaving a refugia of drug sensitive parasites is also predicted to reduce the likelihood of resistance developing.

References

1. Aceves J, Erlij D, Martinez-Maranon R. (1970) The mechanism of the paralyzing action of tetramisole on *Ascaris* somatic muscle. *Br J Pharmacol.* 38:602–607.
2. Y.M. Brockwell, T.P. Elliott, G.R. Anderson, R. Stanton, T.W. Spithill, N.C. Sangster (2013) Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Res.* 4: 48-54.
3. Chaudhry, U., Miller, M., Yazwinski, T., Kaplan, R., Gilleard, J. (2014) The presence of benzimidazole resistance mutations in *Haemonchus placei* of US. Cattle. *Vet. Parasitol.* 29:204(3-4).
4. Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Paress PS, Van der Ploeg LH, Schaeffer JM, Arena JP. (1994) Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 371:707–711.
5. Davies HG, Green RH. (1986) Avermectins and milbemycins. *Nat Prod Rep.* 3:87–121.
6. M. Ghisi, R. Kaminsky, P. Maser (2007) Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 144:313-320.
7. Guest M, Bull K, Walker RJ, Amliwala K, O'Connor V, Harder A, Holden-Dye L, Hopper NA. (2007) The calcium-activated potassium channel, SLO-1, is required for the action of the novel cyclo-octadepsipeptide anthelmintic, emodepside, in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol.* 37:1577–1588.
8. Harder A, Schmitt-Wrede HP, Krucken J, Marinovski P, Wunderlich F, Willson J, Amliwala K, Holden-Dye L, Walker R. (2003) Cyclooctadepsipeptides--an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. *Int J Antimicrob Agents.* 22:318–331.
9. Harder A, Holden-Dye L, Walker R, Wunderlich F. (2005) Mechanisms of action of emodepside. *Parasitol Res.* 97(Suppl 1):S1–10.
10. Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J, Weber SS, Wenger A, Wieland-Berghausen S, Goebel T, Gauvry N, Pautrat F, Skripsky T, Froelich O, Komoin-Oka C, Westlund B, Sluder A, Mäser P. (2008a) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature.* 452:176–180.
11. Kaminsky R, Gauvry N, Schorderet Weber S, Skripsky T, Bouvier J, Wenger A, Schroeder F, Desaulles Y, Hotz R, Goebel T, Hosking BC, Pautrat F, Wieland-Berghausen S, Ducray P. (2008b) Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol Res.* 103:931–939.
12. Kotze AC, Hunt PW, Skuce P, von Samson-Himmelstjerna G, Martin RJ, Sager H, Krücken J, Hodgkinson J, Lespine A, Jex AR, Gilleard JS, Beech RN, Wolstenholme AJ, Demeler J, Robertson AP, Charvet CL, Neveu C, Kaminsky R, Rufener L, Alberich M, Menez C, Prichard RK. (2014) Recent advances in

candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014 4:164-84. **13.**Kulke D, Krucken J, Demeler J, Harder A, Mehlhorn H, von Samson-Himmelstjerna G. (2013a) *In vitro* efficacy of cyclooctadepsipeptides and aminophenylamidines alone and in combination against third-stage larvae and adult worms of *Nippostrongylus brasiliensis* and first-stage larvae of *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res.* 112:335–345. **14.**Kulke D, Krucken J, Harder A, Krebber R, Fraatz K, Mehlhorn H, von Samson-Himmelstjerna G. (2013b) *In vivo* efficacy of PF1022A and nicotinic acetylcholine receptor agonists alone and in combination against *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology.* 140:1252–1265. **15.**M.S.G. Kwa, J.G. Veenstra, M.H. Roos (1994) Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in [beta]-tubulin isotype-1. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 63:299-303. **16.**Lacey E. (1990) Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today.* 6:112–115. **17.**Little PR, Hodge A, Maeder SJ, Wirtherle NC, Nicholas DR, Cox GG, Conder GA. (2011) Efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. *Vet Parasitol.* 181:180–193. **18.**Martin RJ, Clark CL, Trailovic SM, Robertson AP. (2004) Oxantel is an N-type (methyridine and nicotine) agonist not an L-type (levamisole and pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics in *Ascaris*. *Int J Parasitol.* 34:1083–1090. **19.**Martin RJ, Puttachary S, Buxton SK, Verma S, Robertson AP. (2015) The Conqueror Worm: recent advances with cholinergic anthelmintics and techniques excite research for better therapeutic drugs. *J Helminthol.* 89(4):387-97. **20.**McFarland JW, Howes HL, Jr (1972) Novel anthelmintic agents. 6. Pyrantel analogs with activity against whipworm. *J Med Chem.* 15:365–368. **21.**McKellar QA, Benchaoui HA. Avermectins and milbemycins. (1996) *J Vet Pharmacol Ther.* 19:331–351. **22.**D.J. Overend, F.L. Bowen (1995) Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust. Vet. J.* 72:275-276. **23.**Robertson AP, Clark CL, Burns TA, Thompson DP, Geary TG, Trailovic SM, Martin RJ. (2002) Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 302:853–860. **24.**Rufener L, Maser P, Roditi I, Kaminsky R. (2009) *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. *PLoS Pathog.* 5:e1000380. **25.**Sasaki T, Takagi M, Yaguchi T, Miyadoh S, Okada T, Koyama M. (1992) A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *J Antibiot (Tokyo)* 45:692–697. **26.**A. Silvestre, J. Cabaret (2002) Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of *Trichostrongylid nematodes*: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem. Parasitol.* 120:297-300. **27.**von Samson-Himmelstjerna G, Harder A, Sangster NC, Coles GC. Efficacy of two cyclooctadepsipeptides, (2005) PF1022A and emodepside, against anthelmintic-resistant nematodes in sheep and cattle. *Parasitology.* 130:343–347. **28.**Wolstenholme AJ, Rogers AT. (2005) Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology.* 131(Suppl):S85–95.

МЕХАНИЗАМ ДЕЈСТВА И РЕЗИСТЕНЦИЈЕ АНТИХЕЛМИНТИКА

Alan P. Robertson

Department of Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, IA
50011, USA

Кратак садржај

Паразитски хелминти из кола *Nematoda* и *Platyhelminthes* изазивају значајне болести како код животиња намењених исхрани људи тако и код кућних љубимаца. Антихелминтици спадају у најчешће коришћене лекове у ветеринарској медицини. Нажалост, број антихелминтика је ограничен и дуготрајна понављана употреба ових лекова довела је до развоја резистенције код многих паразитских хелмината. На овом месту изложићемо механизме дејства постојећих антихелминтика и потенцијално нових лекова. Наша сазнања о механизмима резистенције хелмината на лекове су лимитирана: неки резистентни изолати на бензимидазоле настали су после промена једне аминокиселине у тубулину, док се о природи резистенције на друге класе лекова мање зна али се сматра да је полигене природе. Приказаћемо такође, постојећа сазнања о механизмима настајања резистенције и стратегијама за третман резистентних паразита.

Бензимидазоли

Ова група лекова представља најстарије супстанце које се користе као антихелминтици. Тиабендазол је први пут представљен још 1961. године а затим су редом синтетисани мебедазол, албендазол и флубендазол. Бензимидазоли се селективно везују за β -тубулин паразита високим афинитетом и инхибишу полимеризацију микротубула. Ово има за последицу деструкцију ћелијске структуре и последичну смрт ћелије паразита (Lacey, 1990). Механизам одговоран за развој резистенције на бензимидазоле је вероватно најбоље упознат у односу на све остале антихелминтике. Већина, ако не и сви резистентни изолати поседују појединачни полиморфизам нуклеотида (SNPs) на гену за β -тубулин. Овај SNP, настао као последица промене једне аминокиселине омогућава резистенцију: кодон 200 (F200Y) (Kwa и сар. 1994); кодон 167 (F167Y) (Silvestre и Cabaret 2002) и кодон 198 (E198A) (Ghisi и сар. 2007). Разумевање специфичне генетске промене која стоји иза резистенције на бензимидазоле нуди наду за изналажење ефикасне методе за њено дијагностиковање.

Макроциклични лактони

Макроциклични лактони (авермектини и милбемицини) су се појавили 1980. године као антипаразитици широког спектра, који делују на нематоде и артропode (Davis и Green 1986; McKellar и сар. 1996). Примери комерцијално доступних макроцикличних лактона су ивермектин, абамектин, дорамектин, селамектин, милбемицин оксим и моксидектин. Макроциклични лактони су селективни агонисти глутамат-зависног хлоридног канала (GluCl_s) које се налази у неуронима и фарингијалном мишићу нематоде и артропода, али не постоји код људи. Активацијом GluCl_s, макроциклични лактони инхибишу кретање и фарингијално пумпање паразита (Cully и сар. 1994; Wolstenholme и Rogers, 2005). Резистенција на макроцикличне лактоне је у константном порасту. Многи резистентни лабораторијски изолати поседују мутацију гена који су одговорни за синтезу субјединица (GluCl_s). Међутим, генетске промене код клиничких изолата је теже разумети. Само мањи број оваквих изолата поседује мутацију на GluCl-субјединицама, и механизам развоја резистенције у највећој мери остаје неразјашњен (Kotze и сар. 2014).

Холиномиметици

Имидазогиазоли (левализол) и тетраидропиримидини (пирантел, морантел и оксантел) делују као агонисти никотинског ацетилхолинског рецептора (nAChR). Везивање за nAChR на мембрани мишићне ћелије соматског мишића изазива спастичну парализу паразита и његово избацивање из организма домаћина (Aceves и сар. 1970). Изостајање ефикасности пирантела против трихурида био је разлог за синтезу оксантела и м-оксифенола, његових најпознатијих деривата (Macfarland и Howes, 1972). Објашњење механизма дејства ових лекова се доста компликује разликама у субтипима nAChR код нематода (Martin и сар. 2015), на пример оксантел пре свега активира N-субтип nAChRs код *A. suum* (Martin и сар. 2004), док левализол активира L-субтип (Martin и сар. 2015). Као и у случају макроцикличних лактона, и овде постоји већи број резистентних лабораторијских изолата, али углавном *C. elegans*. Они показују мутације на различитим генима, неки од њих детерминишу синтезу субјединица nAChR, unc-38, unc-63, unc-29, lev-1, lev-8 и др., док су друге мутације одговорне за промене на протеинима укљученим у каскаде преношења импулса од nAChR до контрактилне машине. Нажалост, механизми који су одговорни за резистенцију клиничких изолата паразитских нематода остају и даље недовољно разјашњени. Многи подаци из литературе указују да је резистенција паразитских нематода на холиномиметике полигенична и да укључује промене у експресији субјединица nAChR али и друге независне механизме (Kotze и сар. 2014).

Спириноидоли

Дерквантел (2-deoksi-paraherkvamid или PNU-141962) је први полусинтетски представник ове нове класе антихелминтика (Little и сар. 2011). Дерквантел, који је уједно и први комерцијални представник ове нове групе лекова је представљен 2010. године и то у комбинацији са абамектином под именом STARTECT[®], намењен за контролу паразитских нематода оваца. Дерквантел делује као антагонист nAChR, што изазива флацидну (млитаву) парализу и резултира избацивањем паразита из организма домаћина (Robertson и сар. 2002). Комбинација дерквантела и абамектина има широк спектар дејства против бројних нематода оваца, укључујући и оне резистентне на бензимидазоле, левализол и макроцикличне лактоне (Geurden и сар. 2012).

Амино-ацетонитрили

Амино-ацетонитрили (AAD) су нова класа синтетских антихелминтика широког спектра дејства против нематода резистентних на бензимидазоле, имидазолтиазоле и макроцикличне лактоне (Kaminsky и сар. 2008a). Монепантел, такође познат као AAD 1556 је први представник ове класе развијен у циљу контроле паразитских нематода оваца (Kaminsky и сар. 2008b). Генетска испитивања на *C. elegans* идентификовала су ACR-23 који спада у групу специфичне DEG-3 субфамилије nAChRs, као циљног места деловања AAD (Kaminsky и сар. 2008a). Монепантел у ниским концентрацијама (<1 nM) делује као позитивни модулатор MPTL-1 рецептора *H. contortus* и ACR-20 рецептора *C. elegans*, а у високим концентрацијама (>0.1 μ M) делује као директни агонист ових рецептора (Kaminsky и сар. 2008a). У другој студији монепантел сам по себи није био активан против *H. contortus* DEG-3/DES-2 рецептора, експримованог у ооцитима *X. leavis*, али је потенцирао дејство холина, када је апликован истовремено (Rufener и сар. 2009).

Циклооктадепептиди

Циклооктадепептиди су откривени почетком деведесетих година прошлог века. PF1022A је изворно једињење, изоловано 1992. године као продукт гљивице *Mycelia sterilia*, која расте на биљци *Camellia japonica* (Sasaki и сар. 1992). PF1022A се састоји из најмање четири N-метил-L-леуцина, два D-лактата и два D-фенилацтата, постављених као циклични октадепептид са неправилном L-D-L конфигурацијом (Harder и сар. 2003). Емодепсид, познат и као PF1022-221 и ВАУ 44-4400, је полусинтетски дериват PF1022A, настао додавањем морфолинског прстена у пара позицији две D-фенилацетилне киселине (Harder и сар. 2005). Ова модификација резултирала је у побољшању фармакокинетичких особина. Антихелминтички потенцијал PF1022A и емодепсида доказан је у бројним *in vivo* и *in vitro* испитивањима (Kulke и

сар. 2013а, 2013б). Интересантно је да ПФ1022А и емодепсид имају широк спектар дејства против више врста нематода, укључујући и оне резистентне на бензимидазоле, левамизол и ивермектин (von Samson-Himmelstjerna 2005). Ово указује да је механизам дејства циклооктадепсипептида другачији у односу на лекове за које је доказано постојање резистенције паразита. Испитивања механизма дејства ове групе лекова сугеришу да је циљно место за емодепсид калцијум-зависни калијумски канали (SLO-1). Испитивања на мутантима *C. elegans* показала су изостанак осетљивости на емодепсид код *SLO-1 null* мутаната. Дејство емодепсида на SLO-1 експримиран у мишићним ћелијама и неуронима има за последицу инхибицију локомоције, док инхибиција храњења настаје као последица деловања емодепсида на SLO-1 експримиран само у неуронима (Guest и сар. 2007).

Триклабендазол

Бензимидазол, триклабендазол је лек избора у лечењу инфекција са *Fasciola hepatica* код животиња и људи, због способности да делује на почетне развојне стадијуме паразита током њихове миграције кроз јетру. Резистенција на триклабендазол је описана у држави Викторија у Аустралији (Overend и Bowen, 1995) а случајеви резистенције су описани код оваца и говеда. Ипак је појава резистенције чешћа у стадима товних и млечних говеда (Brockwell и сар. 2013). Поред познатих сазнања о механизму резистенције бензимидазола и идентификације маркера резистенције код неколико врста нематода, специфична природа механизма дејства триклабендазола код *F. hepatica* и механизам развоја резистенције није разјашњен.

Закључак

Третман инфекција хелминтима остаје да буде константан изазов. Ограничени број лекова који су доступни и све учесталији извештаји о појави резистенције постају све већи проблем. На срећу, појава нових лекова као што је дерквантел, монепантел и емодепсид дају могућност нових третмана. Међутим, као и са другим групама лекова, континуирана широка примена доводи до развоја резистенције. Третмани који укључују више лекова (са различитим механизмом дејства) или примена различитих лекова у различитим временским периодима су могућности за смањивање учесталости развоја резистенције. Алтернативно, селективни третман (само животиња које испољавају симптоме инфекције) омогућава заостајање осетљивих “бегунаца” од лека, што ће у крајњој линији редуковати развој резистентне популације паразита.

Литература

1. Aceves J, Erlj D, Martinez-Maranon R. (1970) The mechanism of the paralyzing action of tetramisole on *Ascaris* somatic muscle. *Br J Pharmacol.* 38:602–607. 2. Y.M. Brockwell, T.P. Elliott, G.R. Anderson, R. Stanton, T.W. Spithill, N.C. Sangster (2013) Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Res.* 4: 48-54. 3. Chaudhry, U., Miller, M., Yazwinski, T., Kaplan, R., Gilleard, J. (2014) The presence of benzimidazole resistance mutations in *Haemonchus placei* of US. Cattle. *Vet. Parasitol.* 29:204(3-4). 4. Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Paress PS, Van der Ploeg LH, Schaeffer JM, Arena JP. (1994) Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 371:707–711. 5. Davies HG, Green RH. (1986) Avermectins and milbemycins. *Nat Prod Rep.* 3:87–121. 6. M. Ghisi, R. Kaminsky, P. Maser (2007) Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 144:313-320. 7. Guest M, Bull K, Walker RJ, Amliwala K, O'Connor V, Harder A, Holden-Dye L, Hopper NA. (2007) The calcium-activated potassium channel, SLO-1, is required for the action of the novel cyclo-octadepsipeptide anthelmintic, emodepside, in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol.* 37:1577–1588. 8. Harder A, Schmitt-Wrede HP, Krucken J, Marinovski P, Wunderlich F, Willson J, Amliwala K, Holden-Dye L, Walker R. (2003) Cyclooctadepsipeptides--an anthelmintically active class of compounds exhibiting a novel mode of action. *Int J Antimicrob Agents.* 22:318–331. 9. Harder A, Holden-Dye L, Walker R, Wunderlich F. (2005) Mechanisms of action of emodepside. *Parasitol Res.* 97(Suppl 1):S1–10. 10. Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J, Weber SS, Wenger A, Wieland-Berghausen S, Goebel T, Gauvry N, Pautrat F, Skripsky T, Froelich O,

Komoin-Oka C, Westlund B, Sluder A, Mäser P. (2008a) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. 452:176–180. **11.**Kaminsky R, Gauvry N, Schorderet Weber S, Skripsky T, Bouvier J, Wenger A, Schroeder F, Desaulles Y, Hotz R, Goebel T, Hosking BC, Pautrat F, Wieland-Berghausen S, Ducray P. (2008b) Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol Res*. 103:931–939. **12.**Kotze AC, Hunt PW, Skuce P, von Samson-Himmelstjerna G, Martin RJ, Sager H, Krücken J, Hodgkinson J, Lespine A, Jex AR, Gilleard JS, Beech RN, Wolstenholme AJ, Demeler J, Robertson AP, Charvet CL, Neveu C, Kaminsky R, Rufener L, Alberich M, Menez C, Prichard RK. (2014) Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2014 4:164-84. **13.**Kulke D, Krucken J, Demeler J, Harder A, Mehlhorn H, von Samson-Himmelstjerna G. (2013a) *In vitro* efficacy of cyclooctadepsipeptides and aminophenylamidines alone and in combination against third-stage larvae and adult worms of *Nippostrongylus brasiliensis* and first-stage larvae of *Trichinella spiralis*. *Parasitol Res*. 112:335–345. **14.**Kulke D, Krucken J, Harder A, Krebber R, Fraatz K, Mehlhorn H, von Samson-Himmelstjerna G. (2013b) *In vivo* efficacy of PF1022A and nicotinic acetylcholine receptor agonists alone and in combination against *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology*. 140:1252–1265. **15.**M.S.G. Kwa, J.G. Veenstra, M.H. Roos (1994) Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in [beta]-tubulin isotype-1. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 63:299-303. **16.**Lacey E. (1990) Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today*. 6:112–115. **17.**Little PR, Hodge A, Maeder SJ, Wirtherle NC, Nicholas DR, Cox GG, Conder GA. (2011) Efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. *Vet Parasitol*. 181:180–193. **18.**Martin RJ, Clark CL, Trailovic SM, Robertson AP. (2004) Oxantel is an N-type (methyridine and nicotine) agonist not an L-type (levamisole and pyrantel) agonist: classification of cholinergic anthelmintics in *Ascaris*. *Int J Parasitol*. 34:1083–1090. **19.**Martin RJ, Puttachary S, Buxton SK, Verma S, Robertson AP. (2015) The Conqueror Worm: recent advances with cholinergic anthelmintics and techniques excite research for better therapeutic drugs. *J Helminthol*. 89(4):387-97. **20.**McFarland JW, Howes HL, Jr (1972) Novel anthelmintic agents. 6. Pyrantel analogs with activity against whipworm. *J Med Chem*. 15:365–368. **21.**McKellar QA, Benchaoui HA. Avermectins and milbemycins. (1996) *J Vet Pharmacol Ther*. 19:331–351. **22.**D.J. Overend, F.L. Bowen (1995) Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Aust. Vet. J*. 72:275-276. **23.**Robertson AP, Clark CL, Burns TA, Thompson DP, Geary TG, Trailovic SM, Martin RJ. (2002) Paraherquamide and 2-deoxy-paraherquamide distinguish cholinergic receptor subtypes in *Ascaris* muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 302:853–860. **24.**Rufener L, Maser P, Roditi I, Kaminsky R. (2009) *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors of the DEG-3 subfamily and their role in sensitivity to monepantel. *PLoS Pathog*. 5:e1000380. **25.**Sasaki T, Takagi M, Yaguchi T, Miyadoh S, Okada T, Koyama M. (1992) A new anthelmintic cyclodepsipeptide, PF1022A. *J Antibiot (Tokyo)* 45:692–697. **26.**A. Silvestre, J. Cabaret (2002) Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of *Trichostrongylid nematodes*: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem. Parasitol*. 120:297-300. **27.**von Samson-Himmelstjerna G, Harder A, Sangster NC, Coles GC. Efficacy of two cyclooctadepsipeptides, (2005) PF1022A and emodepside, against anthelmintic-resistant nematodes in sheep and cattle. *Parasitology*. 130:343–347. **28.**Wolstenholme AJ, Rogers AT. (2005) Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*. 131(Suppl):S85–95.

АНТИБИОТСКА РЕЗИСТЕНЦИЈА У БОЛНИЦАМА У СРБИЈИ

ANTIBIOTIC RESISTANCE IN HOSPITALS IN SERBIA

Зоран Тодоровић

Медицински факултет Универзитета у Београду и
Клиничко болнички центар “Бежанијска коса”, Београд, Србија

Кратак садржај

Инфекције у здравственим установама чешће су условима где су финансијска средства ограничена, него у развијеним земљама. Инциденце интрахоспиталних Грам-позитивних и Грам-негативних инфекција су у сталном порасту, а посебно када је реч о мултирезистентним организмима (МДР). Примећени су и сојеви са проширеном резистенцијом (*XDR – extended drug resistant*) и панрезистентни сојеви (*PDR – pandrug resistant*). *New Delhi* метало-бета-лактамаза 1 откривена је у српским болницама само две године после првог извештаја о таквом ензиму у Шведској. Тренутно, *ESKAPE* патогени (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter species*) водећи су узрок нозокомијалних инфекција у нашим болницама. Посебно, у порасту је резистенција интрахоспиталних сојева на резервне антибиотике (нпр. карбапенеми, колистин и тигециклин). Упркос свеобухватним напорима да се спроведу мере штедљиве примене антибиотика, глобална потрошња антибиотика је у порасту, а посебно у болницама терцијерног нивоа.

Кључне речи: антибиотици, резистенција, нозокомијалне инфекције

Увод

Ера хемиотерапије заразних болести почиње са нобеловцем Полом Ерлихом почетком двадесетог века који је тврдио да лек треба да буде “чаробни метак” и који је увео у клиничку праксу први хемиотерапеутик, салварзан. С друге стране, антибиотици се користе у медицини и ветерини већ скоро осам деценија. Од тада, милиони тона ових лекова су синтетисани и коришћени у различите сврхе (1).

Први антибиотици у клиничкој примени, сулфонамиди, користе се од краја тридесетих година прошлог века, од када датира и прва појава резистенције на ове лекове која је актуелна и данас. Такође, резистенције стафилокока на пеницилине забележена је и пре него што су ови антибиотици ушли у клиничку примену. Без обзира на контролу у прописивању антибиотика која датира од самог почетка њихове шире примене, злоупотреба или погрешна примена ових лекова убрзала је појаву мултирезистентних, чак и панрезистентних сојева бактерија (в. даље). Светска здравствена организација борбу против антибиотске резистенције разматра свеобухватно, у ланцу или циклусу који укључује и хуману и ветеринарску медицину, али и целокупну здравствену службу и администрацију. У ветеринарској медицини, антибиотици се користе код свих врста животиња, од прехранбене индустрије до кућних љубимаца, огледних и дивљих животиња, а тиме се шири и спектар за могућу злоупотребу која има реперкусије и у хуманој медицини (2, 3).

Резистенција на антибактеријске лекове обухвата више механизма:

- смањен улазак антибиотика у бактерију (порини код Грам-негативних бактерија);
- активација ефлукс пумпи (*MATE*, *MFS*, *SMR*, *RND*, *ABC*);
- стварање ензима који разграђују антибиотике;

- измене микробног протеина који трансформише антибиотске прекурсоре у активне лекове;

- измена циљног протеина;
- развој алтернативних путева којима се заобилази инхибиција.

У принципу, резистенција настаје због активације једног или више набројаних механизма. У глобалним размерама, резистенција се веома брзо шири. Пример је појава *New Delhi* метало-бета-лактамазе у изолатима клебсијеле (*K. pneumoniae*) код пацијенткиње индијског порекла у Шведској 2008. године, да би се исти тип резистенције појавио и у нашој земљи само пар година касније.

Бактерије више нису резистентне само на један антибиотик, посебно у болничким условима (4-6). Нпр. код ацинетобактера (7):

- мултирезистентним сојевима (*MDR – multidrug resistant*) називамо оне који су отпорни на бар три групе антибиотика (цефалоспорине и њихове комбинације са инхибиторима бета-лактамаза, флуорохинолоне и аминокликозиде);

- сојевима са резистенцијом већег обима (*XDR – extensively drug resistant*) *MDR* бактерије који су отпорне и на карбапенеме;

- апсолутно резистентним сојевима (*PDR – pan-drug resistant*) *XDR* бактерије које су резистентне и на полимиксине, односно на све постојеће антиботике.

Нажалост, данас бележимо све чешћу појаву *XDR* и *PDR* сојева бактерија у нашим болницама.

Од интрахоспиталних (нозокомијалних) патогена, издвајају се тзв. *ESCAPE* бактерије (**E.** faecium, **S.** aureus, **Clostridium difficile**, **A. baumannii**, **P. aeruginosa**, **Enterobacteriaceae**) (8).

Резистенција на антибиотике код нозокомијалних патогена може да се прати на различите начине:

- Пре свега, ту су епидемиолошке студије, каква је недавно завршена Четврта национална студија преваленције болничких инфекција и потрошње антибиотика, спроведена у свим болницама у Србији (40 општих болница, 9 института, 4 клиничко-болничка центра, 4 клиничка центра, укључујући и две приватне болнице), са очекиваним обухватом од око 15000 пацијената.

- На локалном нивоу континуирано се прате локалне мапе резистенције на основу резултата из микробиолошких лабораторија, као и потрошња антибиотика према подацима из болничких апотека.

- Посебно, узорци изолата мултирезистентних бактерија из болничких микробиолошких лабораторија могу да се анализирају у односу на механизам настанка резистенције (молекуларни скрининг) како би се коначно утврдило који је најефикаснији терапијски приступ.

Циљ овог рада био је да се прикаже праћење антибиотске резистенције у нашим болницама кроз пример Клиничко-болничког центра “Бежанијска коса” из Београда. У раду ће бити посебно приказани микробиолошки, клинички и фармакоепидемиолошки параметри који говоре о резистенцији на антимицробне лекове.

Микробиолошки параметри

У КБЦ „Бежанијска коса“, идентификација изолованих култура бактерија, тестирање осетљивости на антибиотике и одређивање да ли бактерије стварају бета лактамазе проширеног спектра (*ESBL – extended spectrum beta-lactamase*) врше се уређајем *Vitek2 system (bioMérieux, Mercy l’Etoile, France)*. При томе, антибиограм се утврђује на основу стандарда које је поставио Европски комитет за тестирање осетљивости на антибиотике (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST*).

Ретроспективном анализом за период 01.10.2014. - 30.09.2015. утврђено је да су најчешћи Грам-негативни узрочници инфекција код хоспитализованих болесника били *E. coli* – 28% изолата (напомена: резултати обухватају укупно 1766 изолата добијених од 1045 пацијената), *K. pneumoniae* – 23% и *Proteus sp.* - 14% (4). Од Грам-негативних бактерија, на одабране цефалоспорине 3. и 4. генерације који се користе у клиничкој пракси (цефиксим, цефтриаксон, цефотаксим, цефтазидим и цефепим), најосетљивији су сојеви *E. coli* (75-92% осетљивости), а

најмање осетљиви сојеви ацинетобактера (0-10% осетљивости). Слична студија осетљивости Грам-негативних бактерија на карбапенеме (непубликовани резултати) показала је да се антибиограми за ове антибиотике међусобно разликују, тако да је имипенем/циластатин ефикаснији за лечење инфекција изазваних клебсијелом и ентеробактером, а меропенем – за псеудомонас и протеус. Истовремено, резистенција сојева ацинетобактера на све карбапенеме је у забрињавајућем порасту (приближава се 100%), а осетљивост сојева *E. coli* висока, без обзира на појаву *ESBL+* изолата. Ертапенем је био карбапенем са највећом осетљивошћу Грам-негативних сојева у поређењу са меропенемом и имипенемом (ако се изузму псеудомонас и ацинетобактер за које ертапенем није индикован).

Слична ретроспективна анализа Грам-позитивних сојева (период праћења – 01.06.2013. - 30.11.2014.; број изолата 1217) показала је да су најчешће изолиране следеће бактерије: коагулаза негативни стафилокок (КНС) – 50%, метицилин-сензитивни (*MSSA*) *S. aureus* – 19%, *Enterococcus sp.* - 14% и метицилин-резистентни (*MRSA*) стафилокок – 6% (5%). Осетљивост КНС на антибиотике била је варијабилна (за ванкомицин, линезолид и тигециклин - мање од 10%; клиндамицин – 40%; цефалоспорини и аминокпеницилини са или без инхибитора беталактамазе – више од 50%). Систематско праћење интрахоспиталних инфекција показало је да су ретки или мање клинички значајни случајеви ентерокока резистентног на ванкомицин и метицилин-резистентног стафилокока, са инциденцијом која се не мења значајно током вишегодишњег периода. Насупрот томе, забрињава пораст инциденце мултирезистентних Грам-негативних бактерија и појединачна појава панрезистентних изолата (нпр. ацинетобактер, протеус или псеудомонас). Ово се делимично може објаснити болничком патологијом и профилом здравствене установе (одрасли, често старији пацијенти), али је и индикативно за са аспекта јавног здравља, пошто на око 360 кревета колико КБЦ „Бежанијска коса“ има гравитира око 700.000 пацијената из Београда и околине, укључујући и околне општине (нпр. Лазаревац и Панчево).

Клиничко праћење

Уобичајено је да се прате доступни клинички параметри који говоре о *интеракцији* примењених антибиотика са проузроковачима инфекција код хоспитализованих пацијената. Најважнији и најчешће праћени параметар за хоспитализоване пацијенте, нпр. у јединицама интензивног лечења је морталитет током 30 дана. Међутим, има много параметара који могу да отежају процену такве интеракције. Нпр. треба узети у обзир да је неоправдано дуга емпиријска примена антибиотика чешћа него што би требало у нашим болницама, као и да се обично антибиотска терапија примењује на основу клиничке слике и биомаркера као што су це-реактивни протеин (*CRP*), прокалцитонин (*PCT*), седиментација, леукоцитарна формула и крвна слика и сл. Резултати наше проспективне студије (непубликовани подаци) у трајању од 3 месеца, показали су даје од 51 пацијента на емпиријској терапији оправданост таквог приступа било могуће доказати само у 4% случајева (2/51).

Клиничка процена успешности примене антибиотика узима у обзир и демографске карактеристике пацијената, дужину хоспитализације, локализацију инфекције, имунолошки статус, коморбидитете и комедикацију и др.

Адекватно и правовремено узимање узорака за хемокултуру је од виталног значаја за лечење сепсе и септичког шока (када за примену антибиотика постоји правило „златног сата“), а предуга неадекватна емпиријска терапија повећава резистенцију интрахоспиталних патогена. Постављене су чак и формуле које повезују примену неких антибиотика и резистенције појединих бактерија (9). Такође, штедљива рационална примена антибиотика доказано може да смањи резистенцију (10).

Фармакоепидемиолошко праћење

Уобичајено је да се месечно прати примена антибиотика у болницама, у целини и на појединим одељењима. Потрошња појединих антибиотика може се довести у везу са порастом учесталости интрахоспиталних резистентних патогена (нпр. постоји позитивна корелација између потрошње збира карбапенема и колистина и броја интрахоспиталних инфекција изазваних Грам-негативним бактерија). Потрошња се посебно прати за тзв. резервне антибиотике (нпр.

карбапенема, ванкомицин, тигециклин и др.). Методе праћења потрошње антибиотика су различите, а најчешће се процењује број *дефинисаних дневних доза* – ДДД (Светска здравствена организација, колаборативни центар у Ослу, утврђује просечну дневну дозу одржавања лека за његову главну индикацију код одраслих) на 100 или 1000 пацијент-дана (пд). Тако се може пратити колико се троше сви облици неког антибиотика на 100 или 1000 пацијената дневно и може се поредити потрошња тог антибиотика између појединих одељења једне болнице или између различитих болница. Друго, може се утврдити на које антибиотике се *троши две трећине месечног буџета* и то обично бивају резервни антибиотици. Међутим, забрињава што се на таквој листи често нађе цiproфлоксацин чија неадекватна употреба повећава резистенцију на резервне антибиотике, нпр. на карбапенеме (11). Нпр. резултати праћења потрошње антибиотика у КБЦ „Бежанијска коса“ током првог полугођа 2018. године показују да је месечна потрошња цiproфлоксацина варирала између 9 и 12% укупног буџета и да је он увек био међу антибиотцима на које се троши две трећине буџета. Истовремено, месечна потрошња овог флуорохинолона у истом периоду износила је 0,82-1,14 ДДД/100 пд по чему је био међу водећим антибиотцима у целом клиничко-болничком центру.

Закључак

Резистенција болничких сојева бактерија на антибиотике је у порасту у Србији, посебно у клиничко-болничким центрима (установе терцијерног нивоа). Томе доприноси неадекватна употреба антибиотика на свим нивоима, како у хуманој, тако и у ветеринарској медицини и пољопривреди. Проблем добија на значају не само због тога што резистенција патогена расте, већ и зато што је све мање нових антибиотика током последњих деценија. Узрока обе наведене појаве је више, а постоје и математички модели који помажу у предикцији пораста резистенције. Међутим, проблем је мултифакторске природе и далеко смо од тога да можемо поуздано да предвидимо како ће резистенција бактерија у болницама да се креће наредних година. Ипак, показано је да промене резистенције нису једносмерне и да штедљива примена антимикуробних лекова може да врати осетљивост бактерија (нпр. хлорамфеникол је поново делотворан пошто се мање трошио последњих деценија, а колистин нам је постао лек избора у терапији мултирезистентних Грам-негативних патогена пошто му је употреба знатно била смањена још крајем седамдесетих година прошлог века). Коначно, постоје међународне и националне смернице за штедљиву/рационалну примену антибиотика, али од посебног значаја је праћење локалних мапа резистенције.

Литература

1. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74(3): 417–33. 2. La Fauci V, Alessi V. Antibiotic resistance: where are we going? *Ann Ig* 2018; 30(4 Suppl 1): 52-7. 3. Walton JR. Use of antibiotics in veterinary practice. *J Med Microbiol* 1992; 36(2): 69-70. 4. Protic D, Pejovic A, Djukanovic N, Toskovic B, Zdravkovic M, Todorovic Z. Analysis of the third- and fourth-generation cephalosporin use for the treatment of infections caused by Gram-negative bacteria in hospital settings. *Int J Clin Pract* 2016; 70(12): 1033-40. 5. Protic D, Savic D, Andjelkovic D, Djukanovic N, Zdravkovic M, Djurasevic SF, Todorovic Z. Nosocomial coagulase-negative staphylococci in Belgrade: between Scylla and Charybdis. *J Infect Dev Ctries* 2016; 10(9): 907-12. 6. Protic D, Pejovic A, Andjelkovic D, Djukanovic N, Savic D, Piperac P, Markovic Denic L, Zdravkovic M, Todorovic Z. Nosocomial Infections Caused by *Acinetobacter baumannii*: Are We Losing the Battle? *Surg Infect (Larchmt)* 2016; 17(2): 236-42. 7. Manchanda V, Sanchaita S, Singh NP. Multidrug Resistant *Acinetobacter*. *J Glob Infect Dis* 2010; 2(3): 291–304. 8. Peterson LR. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE Revisited. *Clin Infect Dis* 2009; 49(6): 992-3. 9. Gharbi M, Moore LS, Gilchrist M, Thomas CP, Bamford K, Brannigan ET, et al. Forecasting carbapenem resistance from antimicrobial consumption surveillance: Lessons learnt from an OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a West London renal unit *Int J Antimicrob Agents* 2015; 46(2): 150-6. 10. Miyazaki H. [Change in antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* under restricted use of carbapenems] [Article in Japanese]. *Kansenshogaku Zasshi*. 2008;82(1):6-13. 11. McLaughlin M, Advincula MR, Malczynski M, Qi C, Bolon M, Scheetz MH. Correlations of Antibiotic Use and Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(10): 5131–33.

РЕЗИСТЕНЦИЈА НА АНТИКАНЦЕРСКЕ ЛЕКОВЕ,
ПОСЛЕДИЦЕ ПО ХЕМИОТЕРАПИЈУ

ANTICANCER DRUGS RESISTANCE, CONSEQUENCES ON CHEMOTHERAPY

Саша М. Траиловић¹, Зоран Тодоровић²

¹Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду;

²Медицински факултет, Универзитет у Београду

УВОД

Лекови који спречавају развој малигнух ћелије називају се цитостатици, антитуморски лекови, антинеопластици или антиканцерски лекови. Значај антиканцерских лекова у терапији малигнитета је пресудан, поготово уколико хирушки захвати и зрачење нису могући или нису дали задовољавајуће резултате. Токсичност и неселективност су главни недостаци цитотоксичних антиканцерских лекова, јер они делују подједнако на све ћелије које брзо пролиферишу, било да је у питању малигно ткиво или нормална ткива (косна срж, гонаде, епител дигестивног тракта, корен длаке). Према томе, терапијске дозе антиканцерских лекова могу зауставити раст малигнух ткива, али истовремено и оштетити нормална, здрава ткива.

Коришћење антиканцерских лекова постаје наравно све више значајан аспект ветеринарске клиничке медицине. Мада се антиканцерски лекови користе и у општој ветеринарској пракси, то је ипак привилегија специјализованих ординација које имају сертификоване стручњаке и адекватне услове за апликацију различитих терапијских протокола. У Европском систему ветеринарских специјализација, организован је *European College of Internal Veterinary Medicine-Companion animals*, који образује специјалисте (дипломате) интерних болести малих животиња, онкологе и кардиологе. Специјализација из ветеринарске онкологије траје 36 месеци и подразумева специфичну обуку из патологије, цитологије, фармакологије и радиологије.

Значајан напредак у фармакотерапији канцера учињен је бољим разумевањем биологије малигнух тумора, укључујући употребу терапија које су специфичне за одређене врсте тумора. Успешна примена новог концепта захтева дубоко разумевање природе сваке поједине врсте канцера, као и знање о комбинацији модалитета који су прикладни за сваку врсту канцера. Примена оваквог приступа лечењу карцинома у ветеринарској медицини отежана је разликама између врста животиња, ценом третмана и недоступношћу одговарајуће супоративне терапије у многим ветеринарским институцијама. Ипак, ветеринарска терапија канцера остварује изузетан напредак у побољшању квалитета и продужењу живота пацијента и то кроз рационалан избор пацијента и терапијски циљ, адекватан терапијски приступ и ефикасно образовање клијента.

Излечење канцера је дефинисано искорењавањем (уништавањем) свих ћелија рака. Потпуно излечење је идеалан циљ терапије, али су постизање ремисије и/или палијација секундарни циљеви. За канцер се каже да је у ремисији када су сви клинички симптоми нестали, али су микроскопски фокуси ћелија рака још увек присутни. Палијативно лечење се односи на лечење канцера (примену лекова) у циљу смањења бола, побољшања општег стања пацијента или у циљу кориговања поремећених физиолошких процеса у организму. Терапијски режим мора бити изабран на основу реално одређеног циља који се може постићи код пацијента (излечење, ремисија или палијација). Канцер се све више препознаје као хронична болест, коју треба стабилизovati а прихватљив циљ терапије је обезбедити пацијенту добар квалитет живота.

Хемиотерапија канцера се успешно практикује још од када је доказано да бојни отрови пливаци (*nitrogen mustards*) инхибирају раст тумора. На жалост, они су били изузетно токсични.

Са друге стране, супротно зрачењу и хируршким методама, где је ограничење приступа метастатским лезијама главни лимитирајући фактор, хемиотерапија је угрожена резистентним ћелијама рака. Само хемиотерапијом је тешко потпуно излечити многе солидне туморе који се састоји од огромног броја ћелија. Примена нових технологија и дијагностичких процедура које омогућавају идентификацију специфичних подтипова канцера и коришћење посебних механизма умјеравања лекова применом наночестица обећавају значајна побољшања терапије у будућности.

Од нормалних ћелија организма канцерске ћелије се разликују по неконтролисаном и прекомерној пролиферацији, губитку диференцијације као и губитку специфичне функције. Оне испољавају инвазивност и поседују способност метастазирања. Већина антиканцерских лекова делује антипролиферативно, а то значи да већина ових лекова оштећује ДНК и тако започиње апоптозу (програмирану смрт ћелије). Такви лекови делују на све ћелије које се брзо деле, укључујући и оне које се у нормалним физиолошким условима брзо деле. То је разлог да ће данашњи цитостатици зауставити даљи раст канцера, али ће истовремено зауставити умножавање ћелија косне сржи, успорити зарастање рана, изазвати стерилитет, алопецију а поврх свега могу бити још и тератогени.

ЦИТОСТАТИЦИ

Према деловању на ћелијски циклус, цитостатици се деле у две групе. Прва су цитостатици који делују на ћелије које се интензивно деле. Ови лекови обично имају специфичну нападну тачку у одређеној фази ћелијског циклуса. Друга група су цитостатици који делују независно од фазе ћелијског циклуса, односно неспецифично.

Прва група цитостатика је посебно ефикасна у терапији малигну оболела крви, као и свих врста тумора који испољавају брзу пролиферацију. Неспецифични цитостатици, од којих многи стварају комплексе са ДНК, корисни су у терапији тврдих („солидни“) тумора са спорим растењем. За излечење малигне неоплазме потребна је ерадикација свих малигну ћелија. Међутим, у свакој малигну неоплазми постоји више субпопулација малигну ћелија које се могу разликовати у основним карактеристикама (морфолошким, имуногенетским, способности метастазирања), али што је посебно важно разликују се и по реакцији према цитостатцима. Неке од ових ћелија стичу резистенцију према цитостатцима, а неке се налазе склоњене у „фармаколошким склоништима“ (као што је, на пример, централни нервни систем) у којима се тешко достићи ефикасне концентрације лека. Ове ћелије могу бити узрок развоја метастаза. Због тога се, у циљу ефикасније терапије, примењује више цитостатика истовремено, или један за другим (Тодоровић, 2018).

Циљ хемиотерапије тумора је да се униште све малигне ћелије, јер и једна једина преостала ћелија може да проузрокује рецидив болести. Неповољна је околност што се у терапији малигну тумора повећањем доза цитостатика изнад терапијских доза не повећава и њихова клиничка ефикасност, већ се само повећавају њихова нежељена дејства. Неповољна је, такође, околност што се у тумору у току његовог растења многе ћелије налазе у различитим фазама деобе, па фазно-специфични цитостатици слабије делују.

АЛКИЛИРАЈУЋИ АГЕНСИ

Ова једињења пролазе кроз електрофилну хемијску реакције и формирање интермедијалних једињења са карбонијумским јоном или транзиционих комплексе са циљним молекулима. Интермедијери затим реагују са изразито нуклеофилним супституентима у ћелији (нпр, фосфатне, амино, сулфхидрил, хидроксионе, карбоксилне, имидазол групе) и формирају ковалентне везе. Фактички долази до алкилације циљних молекула. Алкиловање ДНК је ефекат који је примарно одговоран за цитотоксично дејство. Главно место на коме се врши алкилација у самој ДНК је гванин на позицији N-7. У мањем степену алкилацији подлежу и друге базе у ДНК. За функцију ДНК алкилација гванина има четири важне последице: стварање ненормалног пара гванина са тимином (погрешно кодирање); цепање имидазолског прстена гванина, дакле, његово разарање; депуринација ДНК, што у ствари знаћи цепање филамената ДНК и везивање гванинских парова, услед чега настаје унакрсно везивање филамената ДНК и тиме је онемогућена репликација. Овај последњи ефект се завршава фрагментацијом хромосома. Алкилирајући агенси делују углавном

независно од фаза ћелијског циклуса, јер имају јаче дејство на непролиферишуће ћелије него многе друге групе лекова. Међутим, они су и даље најефикаснији против ћелија са брзим ћелијским циклусом, односно, у туморима са високим фракцијом раста. Из тог разлога су много токсичнији за косну сржи него за органе као што су јетра и бубрези. Неplодност може такође да буде последица њиховог нежељеног дејства. Алкилирајући агенсу се често називају радиомиметичким лековима јер њихово деловање, односно прекид ДНК ланца подсећа на дејство радијације. Средства за алкиловање имају релативно широк спектар антитуморске активности и корисни су у лечењу тумора лимфоретикаларних ткива. Имају ограничено дејство против саркома и карцинома (Riviere и Parich, 2017).

Представници ове групе лекова који се користе у ветеринарској медицини су:

Азотни пливаци: *мехлоретамин* (користу се код релапса лимфома паса као део MOPP протокола (mustargen, oncovin [vincristine], procarbazine, prednisone) и *циклофосамид* (у комбинацијама са другим лековима).

Деривати нитрозоуреје: ломустин који се користи за лечење лимфома паса, мастоцитома паса и лимфома мачака и кармустин који је део VOPP протокола са винкристином, прокарбазином и преднизолоном у лечењу лимфома паса.

Комплексна једињења са платином: *цисплатин*, *карбоплатин*, *оксалиплатин* и *лобаплатин*. Слични су алкилирајућим агенсима у смислу формирања чврсте хемијске везе са нуклеофилима попут азота у нуклеинским киселинама и сумпора у протеинима. Међутим, иако могу бити концептуално повезани са агенсима за алкиловање, постоје значајне разлике у њиховој антитуморским и токсичним ефектима. *Cisplatin* и *karboplatin* се интензивно користе у ветеринарској онкологији. *Lobaplatin* је испитивана као адјуванс у терапији остеосаркома паса. *Cisplatin* код паса испољава активност против карцинома уротела, карцинома сквамозних ћелија, остеосаркома и назалног аденокарцинома (Кнарри сар., 1988; Hahn и сар., 1992.). Овај цитостатик је интересантан и због могућности интралезијске апликације, чиме се смањују његови системски штетни ефекти. *Cisplatin* је контраиндикован код мачака јер узрокује фаталну плућну токсичности (Knapp et al., 1987).

АНТИМЕТАБОЛИТИ су слични нормалним ћелијским састојцима и/или се такмиче са њима у ензимским реакцијама како би успорили кључне ћелијске процесе или их заменили као супстрати. Ово резултира у синтези погрешних производа који затим ометају важне ћелијске процесе. Већина антимаболита су пролекови, дакле, морају бити конвертовани у њихове активне облике унутар ћелије. Клинички ефикасни антимаболити обично инхибирају синтезу ДНК као главни механизам против канцерогенезе. Антимаболити снажно инхибирају и репликацију ћелија косне сржи, док поједини од њих изазивају још већу токсичност за гастроинтестинални тракт. Антимаболити делују специфично на одређене фазе ћелијског циклуса, па тако спадају у групу фазно-зависних цитостатика.

Агенси који делују на пут фолне киселине: *Metotrexat*, је аналог фолне киселине и у ветеринарској медицини се користи у комбинацији у лечењу лимфосаркома и остеосаркома (Morrison, 2002), а доказана је и његова ефикасност у комбинацији протокола за лечење хемангиосаркома (Smith, 2003).

Аналози Пиримидина: Пошто нуклеинске киселине учествују у контроли раста ћелија, пажња је посвећена проналажењу аналога природних пиримидина и пурина који могу интерферирати са процесима синтезе ДНК и/или РНК и на тај начин инхибирати или уништити канцерске ћелије. Природни пиримидински цитозин налази се у ДНК и РНК. Урацил је присутан само у РНК, али је прекурсор тимина, који се налази у ДНК. Клинички се примењују аналог урацила, 5-флуороурацил и цитозина цитарабин, 5-азацитидин и гемцитабин (Pizzorno и сар., 2003). *Флуороурацил* се не користи често у ветеринарској онкологији, али има значај у адјувантној постоперативној хемиотерапији куја са карциномом млечне жлезде и то у комбинацији са циклофосамидом (Karaianpouroulou et al., 2001) и топикалној терапији кожных карцинома сквамозних ћелија коња (Fortier i Mac Harg, 1994). *Citarabine* је један од најзначајнијих лекова за терапији мијелоидне леукемије људи, других врста леукемија и лимфома, док се у ветеринарској онкологији користи за лечење лимфоретикаларних и миелолиферативних малигнитета паса и

мачака. *Gemcitabin* је аналог цитозина који има дејство против чврстих тумора људи. Лиценциран је за коришћење код људи код карцинома панкреаса и не-ситноћелијских карцинома плућа, али и у комбинованој терапији за друге чврсте туморе. Примена *gemcitabina* је процењивана код разних тумора паса (Kosarek и сар., 2005) али се ипак, препоручује изузетан опрез због чињенице да су неки пси посебно осетљиви и могу испољити токсичност после дозе од 675 mg/m² (Karr, 2006).

Аналози пурина, су пролекови који морају бити конвертовани у нуклеозид трифосфат да би били активни. Примери укључују меркаптопурин, тиогуанин, азатиоприн и нешто новији дериват, флударабин. Меркаптопурин, који се углавном користи за лечење лимфоретикларних тумора код људи коришћен је у старијим протоколима за лимфосарком и остеосарком у ветеринарској онкологији, али се он и тиогуанин данас ретко користе.

ПРИРОДНИ ПРОИЗВОДИ Микротубули су поред бројних улога у ћелији важни за формирање митотског вретена. Микротубули су полимери састављени од алфа- и бета-тубулина, хетеродимера које се динамички монтира и демонтира као процес ћелијске функције и деобе. Винбластин и винкрестин су алкалоиди из биљке *Vinca rosea* (врста зимзелена). Они заустављају митозу у метафази на тај начин што се везују за микротубуларни протеин митотичког вретена и тако проузрокују његову инактивацију. Винкрестин сулфат, винбластин сулфат и винорелбин се разликују по ефикасности против различитих тумора, као и у дозама које производе токсичне ефекте. Винкрестин је део многих протокола код људи и животиња. Типичне индикације за људе укључују акутну лимфоцитну леукемију, неуробластом, Wilm-ов тумор, рабдомиосарком, Ходжкин и не-Ходжкин лимфом. Винкрестин је један од главних лекова који се користе у ветеринарској онкологији. Ефикасан је против преносивих полних тумора паса као монотерапија (Nak и сар., 2005). Он је део многих протокола за лимфоретикларне туморе и саркоме меког ткива (често је у тим протоколима идентификован слогом О које долази од заштићеног комерцијалног назива).

Биљни алкалоиди познати као *таксани* тренутно се користе у клиничкој медицини и обухватају паклитаксел и доцетаксел. Паклитаксел је изведен из коре дрвета пацифичке тисе (*Taxus brevifolia*) а доцетаксел је добијен из иглица Европске тисе (*Taxus baccata*). Ови лекови су нашли примену у лечењу карцинома јанника, дојке, плућа, бешике и карцинома главе и врата код људи. Ефикасност паклитаксела и доцетаксела код животиња је још увек у фази процене.

АНТИБИОТИЦИ - ИНХИБИТОРИ ТОПОИЗОМЕРАЗЕ Топоизомеразе су ензими који контролишу и модификују топологију ДНК. Екстремно дуге нити ДНК су чврсто намотане у двоструку спиралну структуру у једру, осим када се ћелија транскрибује или дуплицира. Да би ови процеси били могући, суперкалем ДНК мора да се одмота како би дозволио да ДНК и РНК-полимеразе обаве своју функцију. Једра ћелија сисара садрже различите изоформе топоизомеразе I и топоизомеразе II. Ови ензими раздвајају фосфодиестарске везе ланца ДНК и формирају ковалентну везу ензим-ДНК која омогућава транскрипцију и поново затварање суперкалема. Инхибитори топоизомеразе спречавају поновно везивање ланца ДНК стабилизацијом комплекса топоизомеразе и ДНК и тако доводе до прекида ДНК ланца што изазива смрт ћелије. Доксорубицин и дактиномицин инхибирају обе топоизомеразе I и II. Топоизомеразе II инхибирају антрациклени и епиподофилотоксини.

Антрациклени

Доксорубицин хидрохлорид је изузетно важан антрациклински дериват који има антитуморску активност против широког спектра тумора људи и животиња. Примењује се као монотерапија или у комбинацији са другим лековима. Код људи укључује терапију канцере дојке, урогениталног система, штитне жлезде, плућа и желуца, меког ткива, остеогеничних и других саркома, Ходжкин болест, не-Ходжкин лимфома и акутне леукемије. Листа примене за животиње је такође дуга. Он је показао ефикасност (обично као компонента комбинације), против тиреоидних тумора; саркома попут лимфосаркома, хемангиосарком и остеосаркома, и широког спектра карцинома, као што су карцином млечне жлезде, сквамозни карцином и др. (Klein, 2003; Hengi, 2003; Sorenmo 2003, Chun i de Logimier, 2003). Назални тумори су ефикасно третирани наизменичним дозама доксорубицина, карбоплатина и пироксикама (Langova и сар., 2004).

Daunorubicin hidrohlorid није ефикасан против чврстих тумора и има примарну употребу у лечењу акутне лимфоцитне и гранулоцитне леукемије у комбинацији са цитарабином. *Idarubicin* је синтетски аналог даунорубицина који се користи за лечење лимфосаркома код мачака.

Антрацендиони

Митоксантрон је антрацендион која је синтетисан да би се обезбедила мања токсичност лека у односу на антрациклин од којих се разликује по одсуству тетрациклинског прстена и шећерне групе. Иако је мање токсичан од доксорубицина, она такође има и ужи спектар антиканцерског дејства. Он је инхибитор топоизомеразе II. Митоксантрон испољава дејство против низа различитих малигнитета код паса и мачака иако је мање ефикасан него доксорубицина (Ogilvie и сар. 1991; 1993). Митоксантрон је ефикасан у лечењу интракавиталне карциноматозе, саркоматозе и мезотелиома паса (Charnei и сар., 2005).

Ензими

Л-аспарагиназа (Л-аспарагин амидохидролаза, Л-асп) је ензим добијен из бактерија који се показао веома ефикасним у лечењу лимфним малигнитета људи (Kurtzberg и сар., 2003). У ветеринарској медицини се примарно користи за лечење лимфома паса као компонента комбинованих протокола (Siedlecki и сар. 2006). Постоје докази да је Л-асп треба користити само за лечење рецидива (Mekdonald и сар., 2005). Употреба Л-асп везана је за активност аспарагин-амидохидролазе која хидролизује аспарагин на аспарагинску киселину и амонијак. За разлику од већине нормалних ћелија многе малигне ћелије располажу ниским концентрацијама Л-аспарагин-синтетазе, ензима који синтетише аспарагин потребан за раст ћелија. Такве ћелије канцера преживљавају преузимањем аспарагина из екстрацелуларне течности. Применом Л-асп који хидролизује циркулишући аспарагин, ћелије рака се лишвају важне хранљиве материје, што доводи до њихове смрти. Ово се дуго сматрало примером квалитативне разлике између нормалне и осетљиве ћелије, али је доказано да и нормална ткива имају потребе за аспарагином. Недостатак аспарагина ремети синтезу протеина као што су инсулин, протромбин, ачбумини и паратхормон.

Остала природна једињења

Пликамицин и *митомицин* нису много коришћени у ветеринарској онкологији. Блеомицин показује активност против карцинома сквамозних ћелија паса и мачака. Блеомицин је фазно специфични цитостатик, најактивнији у G2, али је такође активан крајем G1, почетком S и M фазе ћелиског циклуса.

ХОРМОНИ И АНТАГОНИСТИ *Естрогени, прогестини, андрогени, глукокортикоиди и тиреоидни хормони* се користе у лечењу рака, али у суштини само палијативно. Потребно је применити фармаколошке дозе хормона да би се испољило антитуморско дејство, па треба очекивати нежељене реакције које се јављају као последица вишка хормона. Спектар антитуморске активности хормона је ограничен на уобичајна циљана ткива или она ткива која су мета других хормона али могу бити оштећена оваквом терапијом.

Естрогени као диетилстилбестрол и естрадиол ципионат, су коришћени у лечењу канцера млечне жлезде, хиперплазије и карцинома простате и перианалних glandуларних неоплазми. Ипак, улога естрогена у изазивању рака млечне жлезде довела је до још доминантније улоге лекова који умањују концентрације естрогена.

Инхибитори ароматазе и антиестрогени се интензивно користе у лечењу рака дојке жена. Ароматаза је ензим који претвара андростенедион и тестостерон у естрон и естрадиол. Ствара се у хуманој плаценти и гранулоза ћелијама фоликула јајника као и у негlandуларним ткивима као што је поткожно масном ткиво, јетра, мишићи, мозак, нормално ткиво дојке и малигно ткиво дојке. Инхибитори ароматазе који се користе или се налазе у клиничким испитивањима код људи укључују прву генерацију - аминоклутетимид, другу генерацију - форместан и ексеместан и трећу генерацију анастрозол и летрозол. Инхибитори ароматазе и антиестрогени се ретко користе у ветеринарској медицини. Ипак неки антиестрогени попут

тамоксифена могу да се примене у третману естроген-зависних дисеминованих карцинома млечне жлезде куја (Waddle и сар., 1999).

Кортикостероидни хормони, најчешће преднизон, користе се у терапији рака и то код нелимфоидних тумора, као што су тумора мозга, када палијативно смањују упале и едеме. Такође, примењују се и код лимфоретикуларних неоплазми када могу бити цитотоксични.

ИНХИБИТОРИ ЦИКЛООКСИГЕНАЗЕ Пироксикам и други нестероидни антиинфламаторни лекови испољавају антитуморску активност против карцинома мокраћне бешике (Mutsaers и сар., 2003) и карцинома усне дупље и коже у паса (Schmidt и сар., 2001). Ипак, ови агенси су релативно скоро привукли пажњу за лечење или превенцију канцера људи мада је њихова активност код паса описана раније (Кнарр и сар., 1992). Значајније антитуморске ефекте инхибитори СОХ испољавају када се комбинују са хемиотерапијом (Кнарр и сар., 2000; Vogia и сар., 2004.). Пироксикам је у комбинацији са доксорубицин ефикасан у лечењу мултицентричног лимфома паса (Mutsaers и сар., 2002).

Хемотерапија је један од главних терапијских модалитета у хуманој и ветеринарској онкологији и третман избора за системске малигнитете, укључујући туморе хематопоетских ткива и метастатске туморе. У већини случајева лечење цитотоксичним лековима иницијално је успешно, ипак дуготрајнија контрола болести изостаје јер се временом ефикасност терапије смањује. У онкологији се неуспех лечења може дефинисати као неуспех потпуног нестанка туморске масе и/или удружених паранеопластичних синдрома или рецидива после почетног потпуног одговора на специфични третман. У неким случајевима, тумори могу бити неосетљиви (рефракторни) на третман неким врстама цитотоксичних лекова. У многим, ако не и у већини случајева, пацијенти који су првобитно реаговали на хемиотерапију показују касније изостајање одговора, што резултира у поновном расту тумора. Постоје два могућа узрока за то: (а) ћелије тумора могу бити суштински резистентне, вероватно због неких генетских карактеристика или (б) могу да развију резистенцију после излагања леку. Иако оба узрока представљају два клинички одвојена ентитета, механизми њиховог настајања у основи су вероватно слични. Ефекат третмана у ветеринарској онкологији се обично процењује на основу клиничког одговора, а то не мора да значи комплетни цитолошки или цитогенетски одговор. Уколико већина ћелија тумора реагује на третман, то ће довести до комплетног клиничког одговора, али ако мала субпопулације природно неосетљивих ћелија тумора застане, ове ћелије ће временом довести до развоја популације рекурентних туморских ћелија и на тај начин довести до лажног утиска стечене резистенције.

МЕХАНИЗМИ РАЗВОЈА РЕЗИСТЕНЦИЈЕ

Резистенција на лекове је добро познати феномен који се јавља када узрочници болести постају отпорни на фармацеутске третмане. Овај концепт је први пут описан код бактерија резистентних на одређене антибиотике, али од тада су пронађени слични механизми и у другим болестима, укључујући карциноме. Неки механизми развоја резистенције су специфични за поједине болести, док су други, попут елукаса лека, који је описан код бактерија и резистентних хуманих канцера, еволутивно конзервисани.

Резистенција малигнућ ћелија може се развити кроз низ механизма који су грубо подељени у две главне категорије: немогућност постизања довољно високе концентрације лека на месту тумора или упркос довољно високим концентрацијама лека на месту тумора, немогућност добијања одговарајућег ћелијског одговора.

Немогућност да се постигну терапијски нивои лека у тумору може имати јатрогене узроке, узроке везане за организам пацијент или карактеристике самог тумора. Јатрогене узроци укључују неадекватан избор лека или интервала дозирања и не представљају праву резистенцију, већ само стварају утисак да она постоји. Фактори везани за организам пацијента обухватају лошу апсорпцију лека, промене у системском метаболизму (умањење активације или повећане инактивације лека), повећан клиренса лека и недовољну дистрибуцију до тумора због присуства специфичних баријера (нпр, крвно-мождана баријера). Познати узроци везани за туморе су недовољна перфузија самог тумора, услови микрооколине тумора (нпр. хипоксија, ацидоза,

промењен редокс-потенцијала) (Tredan и сар., 2007) и степен присуства непролиферирајућих туморских ћелија (Lage, 2008).

Мада се горе наведени фармакокинетички узроци резистенције јављају у пракси и клинички су релевантни, резистенција малигнућ ћелија пре свега има фармакодинамску основу и најчешће порекло у карактеристикама туморске ћелије. Доказани узроци резистенције обухватају смањену ћелијску абсорпцију лека, његову повећану екскрецију, компартиментизацију лека и промене у ћелијском метаболизму (смањивање активације или повећане инактивације). Неуспех терапије може бити последица интензивног исправљања оштећења ДНК малигнућ ћелије изазваног лековима, повећања резистенције на апоптозу и промене циљног места лека (квантитативних или квалитативних). Механизми којим ћелије рака постају резистентне на лекове могу да буду специфични за лек или класу лекова, али ипак за већину антиканцерских лекова доказани су мултипли механизми. У већини случајева резистенција није ограничена на један лек или класу лекова, већ се односи на лекове различите структуре и хемијског састава, када се назива мултипла резистенција на лекове “*multidrug resistance*” (MDR). Она може настати индукцијом једног механизма који неутралише ефекте већег броја лекова. Са друге стране могуће је и да један лек покрене развој мултипле резистенције према већем броју различитих цитостатика.

Доступне информације о резистенцији на антиканцерске лекове код животиња су ограничене, али за разлику од фармакокинетичких узрока резистенције који могу варирати код животиња због разлика рецимо у метаболизму лека (код различитих врста), ћелијски механизми развоја резистенције су вероватно веома слични онима код људи.

КАРАКТЕРИСТИКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ

Резистенција је стабилна или стална карактеристика тумора и генерално има генетску основу. Претпоставка генетске основе се заснива на запажању да се клонови резистентни на лекове спонтано генеришу конзистентно познатом интезитету генетских мутација и да се овај интезитет повећава излагањем ћелија тумора мутагеним једињењима. Надаље, ћелије резистентне на неки лек задржавају резистенцију и када тај лек више није присутан. Чињеница да резистентни клонови у тумору настају кроз спонтане мутације била је основа хипотезе Goldie-Coldman (Goldie и Coldman, 1984) која каже да је вероватноћа постојања најмање једне резистентне ћелије унутар популације туморских ћелија зависи од величине тумора. Однос између величине тумора и вероватноће излечења (тј. одсуства резистенције) може се описати: $P = e^{-\alpha N}$ (P: вероватноћа излечења, α : интезитет спонтаних мутација у односу на ћелијску деобу, N: број ћелија тумора). Претпостављајући да је стопа мутација по ћелијској деоби 1×10^{-6} ; шансе за настајање резистентног клона унутар 1 mm^3 туморске масе ($\pm 10^6$ ћелија) износи $> 60\%$. Овај модел предвиђа да у циљу добијања максималних резултата лечења, хемотерапију треба започети када је тумор у мајмањој величини (мали N), што значи или најраније лечење болести или правовремена примена адјувантне терапије (хемотерапија након хируршког одстраивања тумора). Овај модел такође предвиђа да примена протокола са више лекова (са различитим и независним механизмима дејства) има већу ефикасност него протокол са једним леком. Под претпоставком да је вероватноћа резистенције за туморске ћелије за лек А 1/а и за лек Б 1/б, шансе да туморске ћелије развију резистенцију на оба лека је $1/(a \times b)$.

ФАРМАКОДИНАМСКИ МЕХАНИЗМИ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ

Смањење преузимања лека

Продирање лекова у туморске ћелије настаје пасивном дифузијом (доксорубин, винбластин), олакшаном дифузијом и активним транспортом (аналози нуклеозида). Цитотоксични лекови могу ући у ћелију у правцу концентрационог градијента на сва три начина, али само активни транспорт дозвољава улазак против концентрационог градијента. Већина транспортера на плазма мембрани припада породици *Solute Carrier* (SLC) (Hediger и сар., 2004) и смањена апсорпција лека може настати као последица било смањења афинитета везивања лека за његовог транспортера или мањег броја транспортера. Оба ова механизма су описани, ранији за мелфалан, други за метотрексат и аналоге нуклеозида цитарабин, флударабин и гемцитабин.

Промене у метаболизму лека

Ензими који учествују у метаболизму су важни како за системску тако и интраћелијску концентрацију лекова. Реакција оксидације, редукције и хидролизе (Фаза I реакције), као и коњугације (Фаза II реакције) играју кључну улогу у заштити нормалне ћелије од токсина. Ове исте реакције могу довести до резистенције у ћелијама рака, било због смањене активацију пролекова (смањена активност ензима, смањен афинитет за активацију ензима) или повећана инактивација лекова (повећана активност ензима) (Michael и Doherty, 2007).

Најважнији ензим Фазе I је цитохром П450 (CYP) систем и резистенција малигнућ ћелија због повећане инактивације лека је доказана за доцетаксел код хуманог карцинома дојке где ниска експресија CYP3A4 доводи до побољшања ефикасности третмана. Смањена активација лека је узрок резистенције за многе алкиловане агенасе, укључујући циклофосфамид чија се активација одиграва и јетри. Фаза II биотрансформације обухвата коњугацију лекова за глукуронску киселину, сулфате и глутатион (GSH), чиме се побољшава излучивање лека, смањује његова активност и детоксификују реактивни електрофилни лекови. Пример ензима фазе II је урдине 5'-дифосфат-глукуронозил трансфераза која је укључена у инактивације антрациклина и инхибитора топоизомеразе I. Глутатион трансфераза (GSTc) коњугује ГСХ са токсичним електрофилним једињењима. Ово укључује ендогене метаболите који настају током оксидативног стреса али и егзогене ксенобиотике, као што су цитотоксични агенаси. Повећана ГСХ- и GST-посредована детоксификације игра значајну улогу у развоју резистенције према многих алкилирајућим агенсима, лековима који садрже платину и према доксорубицину (Van и сар., 1996). За неке лекове описано је да редукована активација и повећање инактивације смањују ефикасност. На пример за 5-флуороурацил (5-ФУ) доказано је да смањена експресија и/или активност активирајућег ензима тимидин-синтазе и повећање активности инактивационог ензима дихидропиримидин-дехидрогеназе (ДПД) изазива слабију осетљивост малигнућ ћелија на 5-ФУ.

Остали примери промењеног метаболизма лекова укључују редуковану интрацелуларну ретенцију метотрексата због смањења полиглутаматације (било због смањене активности фолилполи-глутамат синтазе или повећана активности \square -глутамат-хидролазе) (Gorlick и сар., 1996), резистенцију на цитарабин због смањења активности киназе или повећања активности деаминазе и резистенцију на иринотекан услед губитка активности карбокси-естеразе-2 (Galmarini и сар., 2001). Металотионеини, фамилија цистеиног богатих протеина мале молекулске тежине могу везати и инактивирати поједине комплексе платине и реактивне кисеоничне врсте, на пример као одговор на хипоксију, што се повезује са лошим одговором на агенсе платине (Surowiak и сар., 2007). Металотионеин је детектован у примарном карциному плућа паса (Hifumi и сар., 2010).

Повећање ефлукса лека

Ефлукс се често назива III фазом детоксификације лека и с обзиром на широк спектар супстрата које транспортери одговорни за ефлукс преносе, повећан капацитет ефлукса је потенцијално најважнији механизам развоја резистенције на антиканцерске лекове. Прва откривена ефлукс пумпа П-гликопротеин (P-gp). P-gp је такође позната као *Multidrug Resistance protein 1* (MDR1) или ABCB1. То је први члан ABC-суперфамилије (ATP-Binding Cassette) протеина који користе хидролизу АТП за активни транспорт материја кроз биолошке мембране. Други важни чланови ABC-суперфамилије повезани са развојем резистенције су *Multidrug Resistance-associated Proteins 1* (MRP1, ABCC1) и 2 (MRP2, ABCC2) и протеини резистенције карцинома дојке (BCRP; ABCG2).

Иако се ABC-транспортери обично налазе у спољашњој ћелијској мембрани, што омогућава избацивање супстрата из ћелије, они се могу наћи и у мембранама органела (ендоплазматски ретикулум, митохондрије и пероксизоми), што омогућава компартментализацију лекова и других ксенобиотика, а процес је познат као секвестрација. Цитотоксични лекови могу бити транспортовани из цитосола и секвестрирани (изофовани) у ендоплазматском ретикулуму где не испољавају свој цитотоксични ефекат (Agracia и сар. 1998). Иако већина транспортних протеина припада ABC-суперфамилији постоје и АТП-зависни не-ABC транспортери повезани са резистенцијом, укључујући плућне протеине резистенције (LRP) и RLIP76. Иако је LRP детектован код карцинома паса (Hifumi и сар., 2010; Tomiyasu и сар. 2010), не постоје подаци

улози LRP у развоју резистенције на лекове код паса. RLIP76 је са друге стране способан да транспортује широку палету цитотоксичних лекова, укључујући доксорубин и његове глутатион-коњугате (Awasthi и сар. 2007).

Промене у циљном месту деловања лека

Промена циљног места деловања лекова представљају важан механизам развоја резистенције за антиметаболите, винца-алкалоиде и инхибиторе топоизомеразе. Ови лекови интерагују са унутарћелијским протеинским структурама и резистенција настаје због мутације у циљном протеину која доводи до смањења афинитета лека за везивање али без губитка нормалне биолошке активности за те ћелије. Примери укључују резистенцију на метотрексат (повећана експресија дихидродрофолат редуктазе (DFHR) и мутација DFHR са смањењем афинитета) и 5-FU (повећана експресија тимидилат-синтазе (Banerjee и сар., 2002)).

Репарација оштећења ДНК изазваних лековима

Ћелије су константно изложени потенцијалним узроцима оштећења ДНК, укључујући оксидативни стрес, хемикалиј и радијацију, што доводи до ± 20.000 лезија ДНК дневно. Међутим, ћелије су развиле одбрамбени механизам против реактивних кисеоничних врста и способни репарације оштећења ДНК (Banerjee и сар., 2002). Док губитак могућности репарације ДНК повећава ризик од развијања мутације и коначно канцера, повећан капацитет репарације редукује осетљивост ћелије на цитотоксичне лекове. Повећана способност репарације ДНК је повезан са резистенцијом на алкилирајуће агенсе, лекове који садрже платину и инхибиторе топоизомеразе. Механизми репарације ДНК су испитани код тумора млечне жлезде паса, мастоцитоме паса и Б-ћелија лимфома.

Резистенција на апоптозу

Апоптоза, као облик програмиране ћелијске смрти, служи за елиминацију појединачних ћелија окружених нормалном ћелијском популацијом. То је контролисан начин ћелијског умирања у коме ћелија активно учествује, спроводећи прецизан, генски регулисан програм аутодеструкције, тј. ћелијског самоубиства. Апоптоза је резултат активације спољашњег пута (активација рецептора смрти; Fas/CD95) или унутрашњег пута (који се одиграва посредством митохондрија). Мада је првобитно описано да хемиотерапија индукује спољашњи пут активације апоптозе, данас постоје докази да се ипак чешће активира унутрашњи пут, што резултира у ослобађању митохондријалног цитохрома Ц који заједно са АРАФ-1 и каспазом-9 доводи до формирања апоптосома. Унутрашњи пут је сложен и регулисан многим факторима, укључујући протеине Bcl-2 фамилије, активирање и инхибицију протеаза, реактивне врсте кисеоника, Ca^{2+} и церамид (Ocker и Hopfner, 2012; Morad и Cabot, 2013). Модулација апоптозе се намеће као перспективни начин лечена карцинома (Ocker и Hopfner, 2012), међутим постоје конфликтни резултати у погледу значаја резистенције на апоптозу за развој клиничке резистенције на лекове (Hu и сар., 1995; Tannock и Lee, 2001).

НЕУТРАЛИСАЊЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ МАЛИГНИХ ЋЕЛИЈА НА ЛЕКОВЕ

Превенирање резистенције на цитотоксичне агенсе

Већина тумора постаје резистентна на лекове током терапије и превенција резистенције или враћање осетљивости вероватно би довело до побољшана резултата третмана и боље прогнозе за пацијенте оболеле од рака третираних хемиотерапијом. Почетни покушаји за спречавање резистенције на лекове су засновани на хипотези Goldie-Coldman која се заснива на примени мултиплих хемиотерапијских протокола (Gonzalez-Angulo и сар., 2007) или високих доза лекова (Leonard и сар., 2004). Образложење оваквог приступа је да се мора уништи што већи број малигних ћелија за краће време и на тај начин спречи развој резистентних клонова. Анализа релевантних клиничких студија сугерише да мултипла терапија и високе дозе цитостатика резултирају бољим одговорима тумора, али ни један од ових приступа не спречава развој резистенције. Описани приступ је ефикасан само код појединих типове тумора осетљивих на лекове, као што је лимфом или леукемија.

Модулација резистенције на лекове-модулација АВС-транспортера

Алтернативни приступ лечењу тумора је инхибиција појединачних механизма резистенције и од када се ефлукс лека истиче као најважнији механизам настајања резистенције, истраживања су углавном фокусирана на развој инхибитора Р-гр и других АВС-транспортера. Међутим, мора се разумети да АВС-транспортери нису присутни само у ћелијама рака, већ и у јетри, бубрезима, црева и многим другим ткивним баријерама. Модулација АВС-транспортера (било као индукција или инхибиција) значајно утиче на апсорпцију, дистрибуцију, излучивање лекова и детерминише фармакокинетичке и фармакодинамске ефекте. До сада су синтетисане три генерације модулатора транспортера.

Алтернативни лекови и терапије

Описани су различити други приступи неутралисања резистенције, укључујући коришћење малих пептида дизајнираних да одговарају трансмембрански доменима Р-гр (Michejda, 2005), моноклонска антитела или активна имунизација против Р-гр (Heike и сар. 1990; Morizono и сар. 2005), нисходна регулација Ргр-експресије (Xu и сар., 2002) и утишавање гена (Abbasi и сар. 2013). Током протеклих неколико година комбинована употреба класичних цитотоксичних агенаса са инхибиторима тирозин-киназе (ТКИ) истиче се као потенцијални нови приступ за превазилажење резистенције. Тирозин киназе играју кључну улогу у многим сигналним путевима у развој канцера, укључујући ћелијску пролиферацију, апоптозу, ангиогенезу и метастазе. ТКИ су развијене да би специфично усмериле ове путеве. Резистенција на ТКИ се ипак јавља и најчешће је повезана са експресијом Р-гр и BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) (Shukla и сар. 2008).

Литература

1. Abbasi M., Lavasanifar A., Uludag H. (2013) Recent attempts at RNAi-mediated P-glycoprotein downregulation for reversal of multidrug resistance in cancer. *Med. Res. Rev.* 33, 33-53. 2. Arancia G., Calcabrini A., Meschini S., Molinari A. (1998) Intracellular distribution of anthracyclines in drug resistant cells. *Cytotechnology.* 27, 95-111. 3. Awasthi Y.C., Sharma R., Yadav S., Dwivedi S., Sharma A., Awasthi S. (2007) The non-ABC drug transporter RLIP76 (RALBP-1) plays a major role in the mechanisms of drug resistance. *Curr. Drug Metab.* 8, 315-323. 4. Ban N., Takahash Y., Takayama T., Kura T., Katahira T., Sakamaki S., Niitsu Y. (1996) Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. *Cancer Res.* 56, 3577-3582. 5. Banerjee D., Mayer-Kuckuk P., Capiaux G., Budak-Alpdogan T., Gorlick R., Bertino J.R. (2002) Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1587, 164-173. 6. Banerjee D., Mayer-Kuckuk P., Capiaux G., Budak-Alpdogan T., Gorlick R., Bertino J.R. (2002) Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1587, 164-173. 7. Boria P.A., Murry D.J., Bennett P.F., Glickman N.W., Snyder P.W., Merkel B.L., Schlittler D.L., Mutsaers A.J., Thomas R.M., Knapp D.W. (2004) Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 224, 388-394. 8. Charney S., Bergman P.J., McKnight J., Farrelly J., Novosad A., Leibman N.F., Camps-Palau M.A. (2005) Evaluation of intracavitary mitoxantrone and carboplatin for treatment of carcinomatosis, sarcomatosis and mesothelioma, with or without malignant effusions: A retrospective analysis of 12 cases (1997-2002). *Vet Comp Oncol* 3, 171-181. 9. Chun R., de Lorimier L.P. (2003) Update on the biology and management of canine osteosarcoma. *Vet Clin North Am Sm Anim Pract* 33, 491-516. 10. Crown, J. (1997) Optimising treatment outcomes: A review of current management strategies in first-line chemotherapy of metastatic breast cancer. *Eur. J. Cancer.* 33 (Suppl. 7), S15-S19. 11. Fortier L.A., Mac Harg M.A. (1994) Topical use of 5-fluorouracil for treatment of squamous cell carcinoma of the external genitalia of horses: 11 cases (1988-1992). *J Am Vet Med Assoc* 205, 1183-1185. 12. Galmarini C.M., Mackey J.R., Dumontet C. (2001) Nucleoside analogues: Mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia.* 15, 875-890. 13. Goldie J.H., Coldman A.J. (1984) The genetic origin of drug resistance in neoplasms: Implications for systemic therapy. *Cancer Res.* 1984, 44, 3643-3653. 14. Gonzalez-Angulo A.M., Morales-Vasquez F., Hortobagyi

G.N. (2007) Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 608, 1-22. **15.** Gorlick R., Goker E., Trippett T., Waltham M., Banerjee D., Bertino J.R. (1996) Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *N. Engl. J. Med.* 335, 1041-1048. **16.** Hahn K.A., Knapp D.W., Richardson R.C., Matlock C.L. (1992) Clinical response of nasal adenocarcinoma to cisplatin chemotherapy in 11 dogs. *J Am Vet Med Assoc* 200, 355-357. **17.** Hediger M.A., Romero M.F., Peng J.B., Rolfs A., Takanao H., Bruford E.A. (2004) The ABCs of solute carriers: Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins Introduction. *Pflügers Arch.* 2004, 447, 465-468. **18.** Heike Y., Hamada H., Inamura N., Sone S., Ogura T., Tsuruo T. Monoclonal anti-P-glycoprotein antibody-dependent killing of multidrug-resistant tumor cells by human mononuclear cells. *JPN. J. Cancer Res.* 1990, 81, 1155-1161. **19.** Henry C.J. (2003) Management of transitional cell carcinoma. *Vet Clin North Am Sm Anim Pract* 33, 597-613. **20.** Hifumi T., Miyoshi N., Kawaguchi H., Nomura K., Yasuda N. (2010) Immunohistochemical detection of proteins associated with multidrug resistance to anti-cancer drugs in canine and feline primary pulmonary carcinoma. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 665-668. **21.** Hifumi T., Miyoshi N., Kawaguchi H., Nomura K., Yasuda N. (2010) Immunohistochemical detection of proteins associated with multidrug resistance to anti-cancer drugs in canine and feline primary pulmonary carcinoma. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 665-668. **22.** Hu Z.B., Minden M.D., McCulloch E.A. (1995) Direct evidence for the participation of Bcl-2 in the regulation by retinoic acid of the Ara-C sensitivity of leukemic stem cells. *Leukemia.* 9, 1667-1673. **23.** Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Constantinidis T.C., Dessiris A. (2001) Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med Series A* 48, 85-96. **24.** Klein M.K. (2003) Multimodality therapy for head and neck cancer. *Vet Clin North Am Sm Anim Pract* 33, 615-628. **25.** Knapp D.W. (2006) Personal Communication, Coppoc, G.L., ed. (West Lafayette, IN). **26.** Knapp D.W., Glickman N.W., Widmer W.R., De Nicola D.B., Adams L.G., Kuczek T., Bonney P.L., De Gortari A.E., Han C., Glickman L.T. (2000) Cisplatin versus cisplatin combined with piroxicam in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 46, 221-226. **27.** Knapp D.W., Richardson R.C., Bonney P.L., Hahn K. (1988) Cisplatin therapy in 41 dogs with malignant tumors. *J Vet Intern Med* 2, 41-46. **28.** Knapp D.W., Richardson R.C., Bottoms G.D., Teclaw R., Chan T.C. (1992) Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 29, 214-218. **29.** Knapp D.W., Richardson R.C., DeNicola D.B., Long G.G., Blevins W.E. (1987) Cisplatin toxicity in cats. *J Vet Intern Med* 1, 29-35. **30.** Kosarek C.E., Kisseberth W.C., Gallant S.L., Couto C.G. (2005) Clinical evaluation of gemcitabine in dogs with spontaneously occurring malignancies. *J Vet Intern Med* 19, 81-86. **31.** Kurtzberg J., Yousem D., Beauchamp N.Jr. (2003) Asparaginase, In: Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Jr., Gansler, T.S., Holland, J.F., Frei, E., III (Eds.) *Cancer Medicine*. BC Decker, Inc., Hamilton, Ontario, pp. 823-830. **32.** Lage H. (2008) An overview of cancer multidrug resistance: A still unsolved problem. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 3145-3167. **33.** Langova V., Mutsaers A.J., Phillips B., Straw R. (2004) Treatment of eight dogs with nasal tumours with alternating doses of doxorubicin and carboplatin in conjunction with oral piroxicam. *Aust Vet J* 82, 676-680. **34.** Leonard R.C., Lind M., Twelves C., Coleman R., van Belle S., Wilson C., Ledermann J., Kennedy I., Barrett-Lee P., Perren T., Verrill M., Cameron D., Foster E., Yellowlees A., Crown J. (2004) Anglo-Celtic Cooperative Oncology Group Conventional adjuvant chemotherapy versus single-cycle, autograft-supported, high-dose, late-intensification chemotherapy in high-risk breast cancer patients: A randomized trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1076-1083. **35.** MacDonald V.S., Thamm D.H., Kurzman I.D., Turek M.M., Vail D. M. (2005) Does L-asparaginase influence efficacy or toxicity when added to a standard CHOP protocol for dogs with lymphoma? *J Vet Intern Med* 19, 732-736. **36.** Michael M., Doherty M.M. (2007) Drug metabolism by tumours: Its nature, relevance and therapeutic implications. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 3, 783-803. **37.** Michejda C.J. (2005) Transmembrane inhibitors of P-glycoprotein, an ABC transporter. *J. Med. Chem.* 48, 3768-3775. **38.** Morad S.A., Cabot M.C. (2013) Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer.* 13, 51-65. **39.** Morizono K., Xie Y., Ringpis, G.E., Johnson M., Nassanian H., Lee B., Wu L., Chen I.S. (2005) Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection. *Nat. Med.* 11, 346-352. **40.** Morrison, W.B. (2002) *Cancer Drug Pharmacology and Clinical Experience*, In: Morrison, W.B. (Ed.) *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management*. Teton NewMedia, Jackson, WY, pp. 339-358. **41.** Mutsaers A.J., Glickman N.W., DeNicola D.B., Widmer W.R., Bonney P.L., Hahn K.A.,

Knapp D.W. (2002) Evaluation of treatment with doxorubicin and piroxicam or doxorubicin alone for multicentric lymphoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 220, 1813-1817. **42.**Mutsaers A.J., Widmer W.R., Knapp D.W. (2003) Canine transitional cell carcinoma. *J Vet Intern Med* 17, 136-144. **43.**Nak D., Nak Y., Cangul I.T., Tuna B. (2005) A Clinico-pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52, 366-370. **44.**Ocker M., Hopfner M. (2012) Apoptosis-modulating drugs for improved cancer therapy. *Eur. Surg. Res.* 2012, 48, 111-120. **45.**Ogilvie G.K., Moore A.S., Obradovich J.E., Elmslie R.E., Vail D.M., Straw R.C., Salmon M.D., Klein M.K., Atwater S.W., Ciekot P.E. (1993) Toxicoses and efficacy associated with administration of mitoxantrone to cats with malignant tumors. *J Am Vet Med Assoc* 202, 1839-1844. **46.**Ogilvie G.K., Obradovich J.E., Elmslie R.E., Vail D.M., Moore A.S., Curtis C.R., Straw R.C., Dickinson K., Cooper M.F., Withrow S.J. (1991) Toxicoses associated with administration of mitoxantrone to dogs with malignant tumors. *J Am Vet Med Assoc* 198, 1613-1617. **47.**Pizzorno G., Diasio R.B., Cheng Y.C. (2003) Pyrimidine and Purine Antimetabolites, In: Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C., Jr., Gansler, T.S., Holland, J.F., Frei, E., III (Eds.) *Cancer Medicine*. BC Decker, Inc., Hamilton, Ontario, pp. 739-757. **48.**Riviere E.J. and Papich M.G. (2017) *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10th Ed. Wiley-Blackwell, USA. **49.**Schmidt B.R., Glickman N.W., DeNicola D.B., de Gortari A.E., Knapp D. W. (2001) Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 218, 1783-1786. **50.**Shukla S., Wu C.P., Ambudkar S.V. (2008) Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: Present status and challenges. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 205-223. **51.**Siedlecki C.T., Kass P.H., Jakubiak M.J., Dank G., Lyons J., Kent M.S. (2006) Evaluation of an actinomycin-D-containing combination chemotherapy protocol with extended maintenance therapy for canine lymphoma. *Can Vet J* 47, 52-59. **52.**Smith A.N. (2003) Hemangiosarcoma in dogs and cats. *Vet Clin North Am Sm Anim Pract* 33, 533-552. **53.**Sorenmo K. (2003) Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Sm Anim Pract* 33, 573-596. **54.**Surowiak P., Materna V., Maciejczyk A., Pudelko M., Markwitz E., Spaczynski M., Dietel M., Zabel M., Lage H. (2007) Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Arch.* 450, 279-285. **55.**Tannock I.F., Lee C. (2001) Evidence against apoptosis as a major mechanism for reproductive cell death following treatment of cell lines with anti-cancer drugs. *Br. J. Cancer.* 84, 100-105. **56.**Todorović Z. (Ed.) u Varagić M.V. i Milošević P.M. (2018) *Farmakologija*, 24th izdanje, Dineks Merika Graf, Beograd, Srbija. **57.**Tomiyasu H., Goto-Koshino Y., Takahashi M., Fujino Y., Ohno K., Tsujimoto H. (2010) Quantitative analysis of mRNA for 10 different drug resistance factors in dogs with lymphoma. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 1165-1172. **58.**Tredan O., Galmarini C.M., Patel K., Tannock I.F. (2007) Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1441-1454. **59.**Waddle J.R., Fine R.L., Case B.C., Trogdon M.L., Tyczkowska K., Frazier D., Page R.L. (1999) Phase I and pharmacokinetic analysis of high-dose tamoxifen and chemotherapy in normal and tumor-bearing dogs. *Cancer Chemother Pharmacol* 44, 74-80. **60.**Xu D., Ye D., Fisher M., Juliano R.L. (2002) Selective inhibition of P-glycoprotein expression in multidrug-resistant tumor cells by a designed transcriptional regulator. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 963-971.

ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ IV

**НУТРИТИВНИ ИЗАЗОВИ У
ОДРЖАВАЊУ ОПТИМАЛНОГ
ЗДРАВЉА, ПОБОЉШАЊУ
ПЕРФОРМАНСИ И ПОВЕЋАЊУ
ПРОФИТА**

НУТРИТИВНЕ СТРАТЕГИЈЕ У ПРЕВЕНЦИЈИ ТОПЛОТНОГ
СТРЕСА У ИНТЕНЗИВНОМ СТОЧАРСТВУ

*NUTRITIONAL STRATEGIES FOR PREVENTION
OF HEAT STRESS IN INTENSIVE LIVESTOCK*

*Радмила Марковић¹, Стамен Радуловић¹, Милан Ж. Балтић¹,
Цвијан Мекић², Драган Шефер¹*

¹Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду;

²Пољопривредни факултет Универзитета у Београду

Кратак садржај

Најсвеобухватнија дефиниција стреса, је да је то немогућност адаптивних механизма организма да одрже у физиолошким границама све његове функције у одговору на егзогене и/или ендogene стресорне надражаје.

Висока амбијентална температура је један од најбоље проучених и најзначајнијих узрока стреса у индустријском сточарству. Топлотни стрес обухвата интеракцију температуре ваздуха, влажности, осунчаности објекта и брзине струјања ваздуха, где температура ваздуха представља кључни фактор. Животиње су изложене топлотном стресу у моменту када је нарушена равнотежа између произведене и изгубљене топлоте, што се различито манифестује код различитих животињских врста (говеда, свиње, живина).

Мањи унос хране током топлотног стреса, има свакако значајну улогу, како са здравственог, тако и економског аспекта. Привремена рестрикција хране током топлотног стреса је једна од мера која се примењује код животиња при топлотном стресу. Једна од стратегија исхране је примена тзв. "двојног режима" исхране: дневног, богатијег протеинима и ноћног, богатијег енергијом. Надокнада појединих важнијих нутријената и уношење антиоксиданата је од велике помоћи у превазилажењу или ублажавању ефеката топлотног стреса.

Кључне речи: топлотни стрес, исхрана, говеда, живина, свиње, производни резултати

1. Хомеостаза, стрес, топлотни стрес

Сви живи организми теже да одрже свој метаболизам у стабилној динамичкој равнотежи при чему се концентрација свих метаболита креће у уским границама (хомеостаза). Под хомеостазом се подразумева релативна равнотежа између система унутар организма и његова зависност од унутрашње средине, обезбеђујући све физиолошке процесе у организму (1). Одржавање ове хомеостазе је предуслов да организам правилно функционише, и да буде здрав (2,3). Међутим, постојаност унутрашње равнотеже организма, може се одржавати само до одређене границе. Снажно деловање екстремних фактора, доводи до развоја, стресних реакција и нарушавања хомеостазе, поремећаја нормалних процеса промета материја, што резултира и адаптацијом животиња, уз промену унутрашње равнотеже, или појавом болести и угинућем животиње.

По дефиницији, стрес је тренутно стање организма настало као резултат изразитог деловања неког спољног или унутрашњег услова који доводи до нарушавања и угрожавања хомеостазе (4).

Интензивна експлоатација животиња у савременим условима производње, недостатак кретања, недостатак паше, висока концентрација животиња на малом простору, често прегруписавање, недовољан простор за исхрану, рано одбијање младунчади, висок степен

механизације производног процеса, стварање вештачког микроклимата, повећање буке и низ других фактора, доводе до нарушавања функције виталних органа и здравља, опадања продуктивности или до лошијег квалитета производа.

Феномен стреса је изучавао *Hans Selye* (26) око 50 година и по његовом мишљењу стрес је “стање које се манифестује у форми специфичног синдрома, који се састоји од свих неспецифично изазваних промена унутар једног биолошког система”.

Основни концепт стреса састоји се од три фазе реакција организма на одређени стрес. Прва фаза означена је као *алармна реакција* и представља мобилизацију одбрамбених снага организма. Карактерише је повећано лучење адреналина, хормона надбубрежне жлезде под чијим утицајем долази до мобилизације енергетских ресурса организма што доводи до повећања концентрације аминокиселина, глукозе и масних киселина у крви (на рачун протеолизе, разлагања гликогена и липолизе).

Након алармне реакције, организм животиње постаје резистентнији према одређеном стресору. Ово је друга фаза “*фаза резистенције или адаптације*”, и јавља се при продуженом деловању стреса. Карактерише је значајно увећање надбубрежне жлезде, појачање њене функције, пораст опште и специфичне резистентности организма (у интензивној производњи адаптација се огледа у стабилизацији продуктивних параметара на нижем нивоу). У случају да се скрати време деловања стреса и организм животиње савлада неповољне последице његовог утицаја, развој стреса се завршава са стадијумом резистентности. У сточарској производњи највећи број случајева стресних стања имају само два стадијума: узнемиреност и резистенција.

После одређеног периода трајања или продуженог излагања организма на деловање стресног фактора, животиња улази у трећу фазу, која се назива “*фаза исцрпљености или оздрављења*”. У случају даљег напредовања исцрпљености, организм животиње више није у стању да се супротставља деловању одређеног надражаја и долази неминовно до угинућа животиње. У случају оздрављења долази до нормализовања свих животних функција организма. До овога долази када организм произведе количину хормона која је сразмерна деловању стреса. Границе појединих стадијума стресних стања се не могу увек тачно одредити (нарочито при деловању јаких стресора). *Selye* је све три фазе реакције организма на стрес термилолошки означаио заједничким називом “Општи адаптациони синдром” (*GAS- General Adaptation Syndrome*) (1).

Последњих година, сведоци смо климатских промена које се крећу у смеру повећања средње амбијенталне температуре која чак може довести и до екстремних временских услова у појединим деловима света, а самим тим и у Србији. Климатске промене утичу на енергетски метаболизам, па тако и на исхрану домаћих животиња. Све то намеће потребу креирања стратегије исхране домаћих животиња као одговора на тренутне климатске промене, које се односе, пре свега, на прилагођавање (променама) исхране и специфичном техником исхране током топлотног стреса (5).

Када ће топлота испољити своје стресно дејство на организм животиње, зависи од већег броја различитих фактора од којих неки нису до краја дефинисани. Топлотни стрес код животиња настаје као одговор организма на отежано хлађење тела услед тога што су смањени сви потенцијали који доводе до губитка топлоте из организма (6). Уколико животиња из било ког разлога не може брзо да одговори на стресну реакцију, и поремећена равнотежа хомеостазе дуго траје, долази до симптома типичних за болесну животињу. Зато је стрес важан фактор који утиче на здравствено стање животиње, а самим тим и на њене производне могућности – било да се гаји због меса, млека, јаја, вуне...

Највећи проблем топлотног стреса је што се део продуктивне енергије (енергије која би служила за производњу) троши на терморегулацију (одавање топлоте, термолиза), када се животиње налазе изван оптималне термонеутралне зоне. Термонеутрална зона се налази између доње и горње критичне амбијенталне температуре. За дефинисање топлотног стреса неопходно је у обзир узети амбијенталне услове и биолошке особине јединки на које амбијентални услови делују. Стресогеност температуре амбијента се процењује упоредним мерењем температуре и влажности ваздуха (енг. *Temperature-Huidity Index*, THI). У последњих педесетак година изучаван

је утицај комбинације температуре и влажности на многе здравствено-продуктивне параметре, а једна од најчешћих и најкориснијих формула за израчунавање ТНІ гласи:

$$\text{ТНІ} = \text{TVF} - (0,55 - (0,55 \times \text{RVP} / 100)) \times (\text{TVF} - 58,8)$$

TVF-температура ваздуха у Фаренхајтима (°F)

RVP-релативна влажност ваздуха у %.

Различите анализе су показале да је критична вредност ТНА изнад 72 када се јављају физиолошке адаптације, патофизиолошке промене и пад продуктивности. У Србији ТНІ често током јула и августа иде преко 80 што потврђује да су климатске промене и глобално загревање погодили и наше географско поднебље (7).

Током последњих пет година у Србији је примећено позитивно одступање годишњих температура ваздуха од нормалних вредности, које се крећу на нивоу од 0,2 до 1,0°C годишње. Основна карактеристика глобалног загревања јесте брзи развој и надирање топлотних таласа. Током последњих година, топлотни таласи су се појављивали у готово свим годишњим добима, а трајали су од 10-30 дана, зависно од региона. Топлотни талас је период од минимално пет дана у оквиру којих је максимална дневна температура ваздуха за 5°C изнад просечних максималних температура за тај дан. Ови таласи доносе велики број тропских дана. Висок удео тропских дана са повишеном влажношћу ваздуха директно негативно утиче на сва жива бића па и на животиње у интензивном узгоју. Оптимални распон температуре за говеда је између 0 до +15°C, за пилад на почетку това 32-35°C, бројлере на крају това 18-21°C, свиње 16-20°C уз релативну влагу 80%. Овце релативно добро подносе температурне промене.

2. Топлотни стрес код крава

Разматрање питања топлотног стреса у производњи домаћих животиња је уобичајено у тропским, субтропским и умереним регионима. Топлотни стрес не утиче само на добробит и здравље крава, већ и на њихове репродуктивне параметре и продуктивност што повећава трошкове производње и смањује профит на фарми. Горња критична граница термонеутралне зоне за млечне краве је између 25°C и 26°C, а индекс температуре и влажности је испод 72. При вредности ТНІ од 79 до 84 долази до јаких стресних реакција које значајно утичу на метаболизам високомлечних крава. У овим условима долази до нарушавања хомеостаза што условљава и пад млечности крава (9). Када вредности за ТНІ превазилазе 84 долази до озбиљних нарушавања функције млечне жлезде и уколико ови услови потрају дужи може да дође до смрти животиње (10). Недавне студије су показале да је селекција крава са генотипом толерантним на топлоту изводљива и доводи до побољшања у производњи млека током и након топлотног стреса.

Анализа климатских услова у Србији показује да се од септембра до маја вредности за ТНІ налазе у одређеном интервалу око 72, а у периоду јули и август може да буде и изнад 80. Дакле, краве су у једном периоду изложене ризику од појаве топлотног стреса (11). Као изразити физиолошки показатељ појаве топлотног стреса код крава се узима учесталост дисања и рада срца, као и телесна температура (12). Топлотни стрес директно утиче на крвоток и рад срца, а индиректно на потребу за узимањем хране и воде.

Високомлечне расе крава знатно мање конзумирају храну ако су у амбијенту са повишеном температуром (30°C) у односу на краве у условима оптималне температуре (16°C) (13). Већ када температура достигне 25°C краве постепено губе апетит. Када је неколико дана дневна максимална температура око 30°C животиње су већ са симптомима изгладнелости. Ако температура достигне и екстремне температуре од око 40°C конзумирање хране драстично опада (за чак 50%). Услед повишења дневних температура, код високомлечних крава јавља повећана потреба за уносом воде (14), ствара се лажни осећај ситости, успорава се моторика рада бурага у време преживања. С друге стране, смањен унос суве материје из хране умањује и млечност крава (16). Baumgard и Rhoads (17) су утврдили да ефикасност искоришћавања енергије при производњи млека, у условима топлотног стреса, пада за 30 до 50% у односу на ефикасност у оптималним условима. Према радовима Schneider и сар. (18), краве у данима високог ризика од топлотног стреса, више хране уносе ноћу. Зато је принос млека у јутарњој мужи већи него у вечерњој.

Collier и сар (15), су доказали да, у условима топлотног стреса, долази до смањења лучења пљувачке. То доводи до нарушавања ацидобазне равнотеже у бурагу. Због тога и краве уносе мање суже материје из хране што доводи до смањења млечности за око 10%.

Потребе за водом веће су у летњим него у зимским месецима. С друге стране, млеко садржи 87% воде што код високомлечних кржава у време лактације још више повећава потребу за водом (14).

Највећа количина воде се троши за приоритетне потребе хлађења организма када је висока вредност ТНП. У таквим условима, до млечне жлезде долази мање воде и смањује се њена активност, а последично, смањује се и принос млека (19). Велики број научних радова показује да високе дневне температуре, и високе вредности за ТНП не само да утичу на активност млечне жлезде и продукцију млека, већ значајно одређују његов квалитет, односно његов хемијски састав (садржај млечне масти и протеина) (20). У време повећаног ризика или деловања топлотног стреса, осим непосредне контроле квалитета хранива, посебно је важно да оброк буде избалансиран. Исхрана кржава је један од кључних фактора који утиче на количину млечне масти тј. масти у млеку (21). Липиди су једна од главних компоненти у млеку. Доминантна фракција млечне масти је TAG- триацилглицерол, (око 98%) присутна у облику масних глобула. Поред тога што је извор енергије, TAG састав је важан и за људско здравље и утиче на особине млечних производа. Друга најважнија фракција млечне масти су поларни липиди који су главни структурни састојци мембране масне глобуле и тиме играју улогу емулгатора обезбеђујући стабилност система млечне емулзије. У експериментима са симулираним, акутним топлотним стресом у контролисаним климатским коморама, утврђено је да топлотни стрес може променити састав липида у млеку - промене у триацилглицеролу - TAG (што се одражава смањењем TAG група које садрже претежно средњеланчане и кратколанчане масне киселине и истовремено повећање оних које садрже дуголанчане масне киселине) и промене у профилима поларних липида (посебно LPC - *lipo-fosfatidilholin*, који је биомаркер за топлотни стрес млечних кржава). Састав TAG-а утиче на особине производа од млека. При топлотном стресу TAG профил модификован је на сличан начин за толерантније и осетљивије краве. Већи ниво LPC је детектован код толерантних кржава у поређењу са осетљивим кржавама (8).

Најважније технолошке методе за редукцију ефекта топлотног стреса су: обезбеђивање природне вентилације, засенчење простора на ком бораве краве, расхлађивање штала, али поред тога свакако значајну улогу имају селекција, нутритивне стратегије и стратегије репродукције.

3. Топлотни стрес код свиња

Температура средине (као и влажност ваздуха) утиче на могућност појаве топлотног стреса и код свиња. Свиње су много осетљивије на топлоту него друге животиње, тако да је важно током периода високих температура наћи начин борбе са последицама топлотног стреса (22). Аутори Brown-Brandl и сар. (24) сугеришу да нове генетске линије свиња производе 20% више топлоте од генетских линија свиња из раних осамдесетих. Овај тренд ће се вероватно наставити у наредним годинама, са очекиваним порастом производње топлоте за још 10%. Терморегулациони механизам код прасади почиње потпуно да функционише 12-тог дана живота. Зато је најкритичније раздобље код прасади у време прашења и неколико дана након прашења. Велики губици настају управо у том периоду гајења свиња. Свиње се не зноје и имају релативно мала плућа. Због ових физиолошких ограничења и релативно велике количине поткожне масти, свиње су изразито подложне топлотном стресу. Два симптома који се примећују када су свиње изложене топлотном стресу су убрзано дисање и губитак апетита. Ово смањује унутрашњу производњу топлоте. Ако се стрес настави, свиње почињу да пију прекомерне количине воде (повећавају губитак електролита) и акумулирају киселине произведене у телу (узрокују поремећај кисело/базне равнотеже). Ово може довести до дијареје или смрти у тешким случајевима.

Истраживања су показала да је излагање свиња температури од 35°C значајно оштетило и супримирао функцију имунолошког система црева и повећало ниво плазматског ендотоксина. У случајевима када су свиње изложене топлотном стресу два до шест часова, њихови системи имунолошке одбране су знатно угрожени и то пружа могућност инфекцији и патогеним

бактеријама да лакше продру у тело животиње. Због тога топлотни стрес може довести до секундарних инфекција, посебно ако су зоохигијенски услови лоши (25).

Свиње веће масе су осетљивије на топлотни стрес, и смањење перформанси раста је веће код њих него код свиња мање масе. Просечни дневни прираст (*average daily gain* – ADG) почиње да се смањује када је свиња телесне масе 75 kg изложена температурама изнад 23°C, док за свиње телесне масе 25 kg ADG почиње да смањује када се излаже температурама изнад 27°C.

Испитивањем утицаја високих амбијенталних температура на репродуктивне карактеристике нерастова, уочено је да је излагање температурама од 31-34,5°C шест недеља утицало на смањење процента покретљивости сперматозоида и да ова промена није нестала ни после пет недеља после деловања топлотног стреса. Смањење квалитета семена је било повезано и са смањењем фертилности након парења (23).

4. Топлотни стрес код живине

Право време за разматрање овог проблема је пролеће и тада треба преформулисати оброке за бројлере у овим условима. Пре врућег таласа и високих летњих температура, потребно је применити одређене нутритивне стратегије за ублажавање негативних ефеката топлотног стреса на унос хране и резултате производње.

Живина је изложена топлотном стерсу у моменту када је нарушена равнотежа између произведене и изгубљене топлоте. Шездесет до седамдесет пет процената метаболичке енергије се претвара у телесну топлоту и треба да буде потрошена у амбијенту. Живина топлоту губи на различите начине: радијацијом (зрачењем), конвекцијом (струјањем), кондукцијом (преношењем) и евапорацијом (дахтањем). Треба напоменути да живина не поседује могућност расхлађивања знојењем.

Развој терморегулационог система код птица је контролисан од стране нервних и хуморалних механизма. Живина спада у хомеотермне јединке, али само у веома уској температурној зони од 18 до 22°C за бројлере и 19-22°C за носиље, што се сматра термонеутралном зоном (односи се на одраслу живину).

Симптоми топлотног стреса код живине су: отворена уста, хипервентилација, раширена крила, смањена активност-покретљивост живине, промењен положај перја, смањено уношење хране, повећан унос воде, измет постаје мекши, стеља је влажна, смањена носивост, лош квалитет љуске јајета, мања јаја, појава канибализма, пораст mortalитета, на крају наступају конвулзије, и угинуће. Када температура амбијента пређе термонеутралну зону, за сваки °C више, унос хране се смањује за 1-1,5%, а ниво метаболизма повећава за 20-30%.

Амбијентална температура и исхрана има веома снажан утицај на одржавање ацидо-базне равнотеже код живине. Живина поседује добро разрађене метаболичке механизме за регулацију рН. Кисели продукти се код живине уклањају путем бубрега и плућа, тако што се (H⁺) јони комбинују са бикарбонатима (HCO₃⁻) у форму H₂CO₃ која се конвертује до угљен диоксида и воде. Угљен диоксид се избацује преко плућа, док се H⁺, екскретују преко бубрега. Уколико је овај механизам поремећен, долази до пораста рН крви, тј до респираторне алкалозе која настаје због изразите респирације изазване високим амбијенталним температурама, и до губитка велике количине угљен диоксида. Урином се излучује велика количина калијума, а у крви расте концентрација натријума и хлора, тј. долази до дисбаланса електролита. Услед свих ових процеса у организму живине расте концентрација слободних радикала (стресом изазвани реактивни оксигени) који доводе до оштећења ћелијске мембране. Деловање стерсора угрожава и имунски одговор тј. функционисање лимфоидних органа као што су бурза, тимус и слезина.

Када температура у амбијенту расте изнад термонеутралне зоне птице почињу убрзано да дишу (хлађење евапорацијом). Хипервентилација је један од основних механизма за одржавање константне температуре у организму птица, али енергетски веома скуп механизам јер доводи до значајног смањења пораста због смањеног уноса хране, лошег искоришћавања унете хране, губитка енергије због повећане активности мишића, итд. Губици у енергији су веома велики, утроши се 540 калорија по граму воде која се изгуби хипервентилацијом.

Да би се надокнадила количина течности која се губи дахтањем повећава се количина унете воде, али ситуација се компликује немогућношћу организма за одржавањем ацидо базне

равнотежа. Са порастом температуре птице и до 10 пута убрзавају дисање, тако да са 25 респирација у минути колико је физиолошки ритам, респирација порасте до 250 респирација у минути.

Да би се ублажиле последице стреса на организам живине примењују се различити зоотехнолошки нормативи и мења се приступ исхрани у оваквим стресним ситуацијама.

5. Нутритивне стратегије

У условима високе спољне температуре животиње, пре свега, морају имати довољно *хладне воде за пиће* (ако је могуће око 10°C), како не би дошло до јаке дехидратације и још веће осетљивости на спољашњу температуру. Препорука је да се избегава храњење животиња између 10-16 часова (најтоплији део дана).

С обзиром да је производња топлотне енергије након оброка велика, у случају високе амбијенталне температуре животиње *смањују унос хране* што свакако резултира и смањењем уноса основних хранљивих материја. Најједноставнији начин да се ово стање превенира је да се потребна количина хране, уколико је могуће, подели на *неколико мањих оброка* и понуди животињи током хладнијих делова дана.

Једна од стратегија која се користи у овим условима је *повећање густине хранљивих материја*. Претпоставља се да се дневни унос хранљивих састојака може одржати током летњих месеци ако се густина хранљивих материја повећа сразмерно очекиваном смањењу уноса хране. На пример, ако се очекује пад уноса хране за 10%, онда би се сви хранљиви састојци у храни (укључујући витамине, минерале и минерале у траговима) требали повећати за 10% како би компензовали смањење уноса хране. Међутим, за неколико хранљивих материја постоје лимити који могу ограничити примену ове стратегије. На пример, није практично увек додати више од 6-8% масти у смешу. Такође, концентрација појединих адитива не може се мењати без претпоставке како то може утицати на здравље животиње. Међутим, у много случајева, пад у количини унете хране је тако велики да се густина хранљивих материја не може повећати толико да компензује губитак.

Методe које се користе за смањење послеоброчне производње топлотне енергије код домаћих животиња базирају се на додавању масти, формулисању нископротеинских оброка уз додатак синтетичких аминокиселина (концепт идеалног протеина) и додавању бетаина у храну. Иако имају највећу енергетску вредност *масти* стварају најмању количину топлотне енергије било да се депонују као телесне масти или се разграђују и користе као извор енергије, тако да веће количине масти у оброку суштински смањују укупну производњу топлотне енергије. Са друге стране додавање масти оброку ублажава одбијање хране што је од кључног значаја за производњу. Истовремено, додавање масти повећава и укупну енергетску вредност оброка, тако да додавањем масти можемо задовољити енергетске потребе животиња чак и у случајевима када је конзумација хране смањена услед високих спољашњих температура. Неопходно је и кориговати количину осталих хранљивих материја (протеини, витамини, макро и микроелементи) у односу на постојећу енергетску вредност оброка. Једна од могућих стратегија је и *смањење вишка протеина*. Вишак протеина се деаминира и излучи. Овај процес ствара значајну количину метаболичке топлоте и зато је веома препоручљиво смањити концентрацију сварљивих протеина за око 2% додатком синтетских аминокиселина. Даље смањење протеина у исхрани је економски неизводљиво.

Концепт идеалног протеина заснива се на односу појединих аминокиселина са првом лимитирајућом аминокиселином (најчешће лизином) узимајући у обзир количину и однос појединих аминокиселина у протеинима организма животиња. Занимљиво је да се аминокиселински образац идеалног протеина мења у одређеној мери током живота а у складу са нивоом производње. Поред есенцијалних, посебно лимитирајућих аминокиселина, неопходно је и да све аминокиселине у тренутку синтезе протеина буду присутне у “поол-у”, тако да је концепт идеалног протеина заснован на успостављању односа свих аминокиселина, како есенцијалних тако и неесенцијалних. Конверзија аминокиселина, а самим тим и излучивање азота из организма животиње, је најмања када су оброци формулисани у складу са концептом идеалног протеина. Вишак аминокиселина које не могу да се користе у синтези протеина се метаболише у организму. У поређењу са другим хранљивим материјама оксидација аминокиселина (специфично динамичко

дејство хране) резултира производњом велике количине топлоте чиме се доминантно доприноси укупној производњи топлотне енергије током оброка. Сходно томе, производња топлотне енергије је већа када је у оброку присутан вишак непотребних аминокиселина (5).

Бетаин је терцијални амин (триметилглицин) присутан код већине живих организама. Настаје као метаболит у катаболизму холина који може модификовати осмоларитет ћелије делујући као донор метил групе (као најбољи осмопротектант). Животиње не могу да синтетишу метил групе које су неопходне за једну од најважнијих биохемијских реакција у организму, циклус трансметилације због чега је неопходно да их уносе храном. Бетаин се већ дуго користи као додатак храни за животиње. Најпре је коришћен као замена за метионин и холин у храни за живину и рибе, где је имао улогу донора метил групе и улогу осморегулатора да би се касније утврдило и да смањује садржај масти код свиња и живине (липотропни ефекат). Утврђено је да је под термонеутралним условима додавање бетаина оброку (1,23 g/kg СМ хране) за свиње смањивало производњу топлотне енергије. Такође се препоручује коришћење бетаина у исхрани свиња и живине током топлотног стреса, с тим да као донор метил групе бетаин показује и антиоксидативни ефекат у организму животиња, а може и позитивно деловати на спречавање смањења воде у ћелијама (5).

Једна од уобичајених мера за борбу против топлотног стреса је *смањење количине дијететских влакана* за 1-2% (зависно од почетне концентрације). Ова сугестија је значајна само кад је оброк формулисан са високим концентрацијама влакана, с обзиром на то да типичне рецептуре засноване на житарицама и соји (на пример код живине) нуде врло мало прилика за смањење нивоа дијететских влакана.

Са аспекта производње топлотне енергије након оброка, посебно је занимљива формулација оброка за животиње које захтевају висок ниво влакана у оброку као што су супрасне крмаче или преживари, с обзиром да влакна у оброку повећавају стварање топлоте код животиња. Познато је да код супрасних крмача енергетску вредност оброка треба “разблажити” релативно високим садржајем влакана (5-8%) чиме се спречава њихова гојазност која може довести до здравствених проблема или изазвати смањену производњу млека. Према неким истраживањима производња топлотне енергије током варења и избацивања несварљивих материја је веома мала, тако да *употреба слабо сварљивих влакана* у оброку супрасних крмача може бити корисна при високим температурама. Са друге стране, код преживара висок садржај влакана у оброку је неопходан пре свега за адекватну ферментацију у бурагу. Имајући у виду позитивну корелацију између метаболизма и ефикасности коришћења енергије у оброку препоручује се исхрана преживара у време топлотног стреса *високо квалитетном кабастом храном* која представља извор високо сварљивих влакана. Наведени начин исхране смањује производњу топлотне енергије за разлику од преживара храњених кабастом храном лошег квалитета (богата несварљивим влакнима).

С обзиром да високе амбијенталне температуре негативно делују на конзумацију хране али и на сварљивост основних хранљивих материја, препорука је да се животиње у том периоду хране концентрованим оброцима са доминантним учешћем *високо сварљивих хранљивих материја*. Овакав начин исхране се може реализовати или применом различитих технолошких решења у припреми хране (хидротермичка обрада) или коришћењем бројних додатака храни (ензими, аминокиселине) чији би основни циљ био повећање сварљивости хранљивих материја у храни. То повећање сварљивости би позитивно деловало на заштиту животне средине и смањења укупног еколошког оптерећења изазваног интензивним узгојем животиња. *Пелетирана храна* физички повећава густину оброка што доводи до повећања уноса хранљивих материја. У комбинацији са повећаном густином хранљивих материја, ове две стратегије значајно помажу у одржавању дневног уноса хранљивих материја у условима топлотног стреса.

Циљ исхране у оваквим условима би требао да буде и ублажавање метаболичких промена код животиња изазваних високом спољашњом температуром. Једна од последица дуготрајне адаптације на услове високе температуре је и смањивање фреквенције срчаног рада што доводи до производње мање количине топлотне енергије. То у исто време утиче на смањење протока крви кроз млечну жлезду што доводи до смањења млечности. Смањење уноса хране и повећање уноса воде у условима топлотног стреса резултира и променом испарљивих масних

киселина у бурагу преживара. Познато је да се ацетат пореклом из бурага транспортује у крвоток и користи примарно за синтезу масти, док са друге стране, створени пропионат утиче на количину протеина у млеку. У испитивањима на кравама расе церсеј рН бурага, као и удео ацетата у садржају бурага били су значајно нижи код крава гајених при 30°C у односу на краве гајене при 20°C. Такође је, уочено смањење процента масти и протеина у млеку, као и удела масних киселина средњег ланца (C₆-C₁₄) код крава гајених у условима високе температуре (5).

У циљу ублажавања метаболичких промена код ових животиња користе се *додаци храни* чија је улога побољшање оксидативне одбране или регулација равнотеже електролита у организму. Познато је да поједини витамини и одређени микроелементи показују директна или индиректна антиоксидативна својства (витамини А, С и Е, цинк, селен али и метионин). Ове материје штите ћелијску мембрану од липидне пероксидације која је много више изражена током топлотног стреса. Такође је значајно и додавање витамина В1, В2, В6 и биотина (витамин Н).

Излучивање јона Na⁺ и K⁺, као и количина воде коју тело губи се повећава током топлотног стреса што може довести до промена у ацидо базној равнотежи. Додавање моновалентних јона у храну за животиње може позитивно деловати на ретенцију воде у организму. Соли које се могу користити у ову сврху су амонијум хлорид, натријум и калијум бикарбонат, натријум и калијум хидрокарбонат, калијум сулфат итд.уз напомену да се наведена једињења могу равноправно користити у исхрани преживара и непреживара, али наравно у различитим концентрацијама.

6. Уместо закључка

У условима новонасталих климатских промена не смемо се у исхрани животиња базирати само на традиционалној науци о исхрани, већ и на знањима и вештинама повезаних наука (физиологије, микробиологије, имунологије, молекуларне биологије, молекуларне генетике итд). Како је потврђено постоји блиска повезаност између амбијенталне температуре и енергетског метаболизма животиња што може пресудно утицати на њихове производне резултате. Познавање ових фактора нам омогућава да корекцијама obroка умањимо или чак потпуно елиминисемо негативне ефекте настале услед климатских промена и на тај начин произведемо довољну количину намирница анималног порекла без повећања загађења животне средине.

У превазилажењу негативних ефеката климатских промена неопходна је блиска сарадња различитих научних дисциплина (метеоролози, ратари, нутриционисти, биолози, генетичари, сточари, лекари...) у оквиру којих стручњаци раде координисано и заједно на прецизно постављеном задатку.

Стрес, па и топлини стрес, се у савременом индустријском сточарству не може избећи у потпуности али се применом зоохигијенских, савремених зоотехнолошких норматива и посебном стратегијом исхране његове последице се могу ублажити и остварити успешна производња.

Афилиација: Овај рад је финансиран средствима Министарства Просвете, науке и Технолошког развоја Републике Србије у оквиру пројекта “Одабране биолошке опасности за безбедност/квалитет хране анималног порекла и контролне мере од фарме до потрошача“, 2011-2018, бр. пројекта. ТР 31034 и ИИИ 46002.

Литература

1.Jovanovic Radomir, (2001): Ishrana i produktivne bolesti domaćih životinja, udžbenik, Poljoprivredni fakultet Univerzitet u Novom Sadu; 2.Shearer J.K., Beede D.K. (1990): Thermoregulation and physiological responses of dairy cattle in hot weather, Agri-Practice, 11, 5–17; 3.Collier R.J., Dahl G.E., VanBaale M.J. (2006): Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. J. Dairy Sci. 89: 1244- 1253. 4.Yousef M. K. (1985): In: Basic principles. Stress Physiology in Livestock, Vol, 1. CRC Press, Boca Raton, FL. 5.Šefer Dragan (2011): Strategija ishrane i kvalitet hrane za životinje u održivim sistemima uzgoja u svetlu aktuelnih klimatskih promena, Zbornik radova, Inovacije znanja veterinarar, Fakultet veterinarske medicine univerziteta u Beogradu. 6.Zlatković Nebojša (2014): Uticaj ambijentalnih uslova na konzumiranje hrane i rad mlečne žlezde kod krava, Doktorska disertacija, Fakultet za biofarming Bačka Topola Megatrend Univerzitet Beograd. 7.Cincović R.Marko, 2010,

Metabolički stres krava. Monografija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad-Departman za veterinarsku medicinu; **8.**Liu Z, Ezernicks V, Wang J, Wann N, Arachchillage, Garner JB, Wales WJ, Cocks BG, Rochfort S, 2017, Heat stress in Dairy Cattle Alters Lipid Composition of Milk. *Sci Rep.* 2017; 7: 961; **9.**Bluett S.J., Fisher A.D., Waugh C.D., 2000, Heat challenge of dairy cows in the Waikat a comparison of spring and summer. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 60:226-229; **10.**Stamatović S., Šamanac H., Mandić L., 1986, *Vet. Glasnik* Vol.38, Br. 12, 1039-1043; **11.**Vujanac I., 2010, Ispitivanje funkcionalnog stanja endokrinog pankresa kod visoko mlečnih krava u različitim uslovima spoljašnje temperature. Doktorska disertacija. Fakultet veterinarske medicine, Beograd; **12.**Rhoads ML, Rhoads RP, VanBaale MJ, Collier RJ, Sanders SR, Weber WJ, Crooker BA, and Baumgard LH, 2009, Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I, Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin, *J Dairy Sci*, 92, 1986–1997; **13.**McDowell R.E., 1972, Improvement of livestock production in warm climates, WH, Freeman and Co, San Francisco, CA; **14.**Collier R.J., Beede D.K., Thatcher W.W., Israel L.A., Wilcox C.J., 1981, Influence of environment and its modification on dairy animal health and production. *J. Dairy Sci.* 65: 2213-2227; **15.**Collier R.J., Dahl G.E., VanBaale M.J. (2006): Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89: 1244- 1253; **16.**Fuquay J.W. (1981): Heat stress as it affects animal production. *J. Anim Sci*; 52:164; **17.**Baumgard LH, and Rhoads RP, (2007): The effects of hyperthermia on nutrient partitioning, 69th Proc Cornell Nutr Conf, Cornell University, Ithaca, NY, 93–104; **18.**Schneider P.L., Beede D.K., Wilcox C.J. (1988): Nycterohemeral patterns of acid–base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. *J Anim Sci*, 66, 112–125; **19.**Silanikove N. (1992): Effects of water scarcity and hot environment on appetite and digestion in ruminants: a review: *Livest, Prod. Sci*: 30, 175-194; **20.**Grubić G., Adamović M. (2003); *Ishrana visoko proizvodnih krava*. Poljoprivredni fakultet Beograd; **21.**Sutton J.D. (1989): Altering milk composition by feeding: *J. Dairy Sci.*, 72, 2801-2814; **22.**<https://www.agric.wa.gov.au/feeding-nutrition/heat-stress-pigs>; **23.**Wettemann RP, Wells ME, Johnson RK. (1979): Reproductive characteristics of boars during and after exposure to increased ambient temperature. *Journal of Animal Science*, 4,6,1501-1505; **24.**Brown-Brandl TM, Nienaber JA, Xin H., Gates RS, (2003): A Literature Review of Swine Heat and Moisture, Pp. 031-040 in *Swine Housings II Proceedings of the 12-15 October 2003 Conference* (Research Triangle Park, North Carolina USA), Agricultural and Biosystems Engineering Conference Proceedings and Presentations, Iowa State University; **25.**Pearce SC, Mani V, Weber TE, Rhoads RP, Patience JF, Baumgard LH, Gabler NK. (2013): Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *Send to J Anim Sci*.91(11):5183-93. doi: 10.2527/jas.2013-6759; **26.**Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138(3479, July 4):32.

ОПТИМАЛАН БАЛАНС ЕЛЕКТРОЛИТА У УСЛОВИМА
САВРЕМЕНЕ ЖИВИНАРСКЕ ПРОИЗВОДЊЕ

*OPTIMAL ELEKTROLITE BALANCE UNDER THE CONDITIONS
OF CONTEMPORARY POULTRY PRODUCTION*

Стамен Радуловић, Радмила Марковић, Драган Шефер

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Кратак садржај

Високе амбијенталне температуре у летњем периоду и даље представљају значајан изазов за живинарску производњу, првенствено због њиховог негативног утицаја на унос хране, телесну масу, тежину трупа, квалитет љуске јаја и смртност јединки. У условима топлотног стреса живина убрзано дише у покушају да повећа евапорацију и на тај начин се расхлади. Услед дахтања долази до прекомерног губитка CO_2 што за кратко време узрокује развој респираторне алкалозе, уз последично повећање рН крви. Као компензаторни одговор, преко бубрега излучују се бикарбонатни јони (HCO_3^-) из организма. Међутим, бикарбонати су негативно наелектрисани јони и морају се везати за позитивно наелектрисане јоне, као што су Na^+ или K^+ , који се затим излучују путем урина, што резултира њиховим дефицитом у случају топлотног стреса. У практичним условима одржавање адекватног нивоа електролита превенира се нутритивним техникама додавања електролита- катјона и ањона у оброк. Балансирање електролита врши се према формули $\text{DEB} = \text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ а добијене вредности се изражавају у мЕг/кг суве материје хране. Оптимална вредност баланса електролита постиже се усклађивањем нивоа Na , K и Cl у крани путем коришћења њихових извора, најчешће NaHCO_3 , NaCl и KCl . Већина аутора сагласна је да оптималан баланс електролита у исхрани живине треба да буде у опсегу вредности 250-300 мЕг/кг смеше.

Кључне речи: баланс електролита, топлотни стрес, живина, исхрана

УВОД

Живинарска индустрија у последњим деценијама доживљава свој највећи развој и напредак. Међутим, упоредо са интензивирањем производње, живина је развила велику осетљивост на бројне факторе стреса, међу којима је топлотни стрес један од најважнијих. Одговоран је за врло високе економске губитке, настале као последица пада производних резултата и високе смртност јединки, који се јављају углавном током лета, када су температуре смештаја знатно изнад термокомфорних вредности предвиђених за узгој живине. У циљу превазилажења наведених проблема, у живинарској производњи примењују се различите технике менаџмента, као што су додатна изолација објекта, адекватна вентилација, инсталирање кровних прскалица (орошивача) и система за хлађење испаравањем ("саће систем"), као и смањење густине насељености објекта. Остале технике подразумевају хлађење пијаће воде, ускраћивање хране или гладовање пре појаве топлотног стреса, исхрану у хладнијем периоду дана и постепену аклиматизацију јединки на високе температуре смештаја. Заједно са техникама промене менаџмента примењују се и нутритивне стратегије које се односе на повећање садржаја витамина, минерала, протеина и енергије у оброку (повећано учешће масти и/или уља у оброку како би се смањила производња топлоте) као компензаторно решење за смањен унос хране. Иако многе од наведених техника показују одређен потенцијал и економичност у примени, ниједна не пружа у потпуности задовољавајуће решење проблема. Основни недостатак лежи у чињеници да наведене стратегије

нису фокус пажње усмериле на физиолошке процесе који се дешавају у организму за време топлотног стреса а првенствено на поремећај ацидо базне равнотеже и развој респираторне алкалозе. У условима савремене производње, као најефикаснија у превазилажењу топлотног стреса код живине, издваја се управо метода контроле ацидо базне равнотеже, додавањем у храну или воду различитих соли електролита попут натријум бикарбоната (NaHCO_3), калијум бикарбоната (KHCO_3), калијум хлорида (KCl), калцијум хлорида (CaCl_2) и амонијум хлорида (NH_4Cl) (1). Употребом наведених соли обезбеђује се оптималан баланс електролита у храни за животиње а последично осигурава одржавање ацидо базне равнотеже у организму и пружа животињама могућност да у потпуности испоље генетски потенцијал производних својстава, чак и у условима високих температурних услова.

ФИЗИОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ТОПЛОТНОГ СТРЕСА ЖИВИНЕ

Термонеутрална зона или "комфорна зона" представља опсег температуре околине под којим животиње не мењају своје понашање или показују знаке нелагодности а користе минималну количину метаболичке енергије за одржавање телесне температуре у физиолошком оквиру. У термонеутралној зони телесна температура животиње може се изразити односом: производња топлоте = губитак топлоте. Излазак из оквира комфорне зоне, повећањем температуре околине, узрокује хипертермију организма која се даље може кориговати повећаним одавањем топлоте и/или смањењем њене производње у организму. У првом случају, топлота се најпре одаје не-евапоративним хлађењем (кондукција, конвекција и радијација) путем периферне вазодилатације, као и повећањем површине за хлађење, када живина шири крила од тела, костреша перје и интензивира периферну циркулацију. Међутим, када је температура окружења једнака телесној температури птица, механизам не-евапоративног губитка топлоте није довољан и топлота се губи евапорацијом (испаривањем) влаге из респираторног тракта путем убрзаног дисања. Када се температура смештаја повећа изнад 30°C , фреквенца дисања се приближно 10 пута повећа у односу на нормалну вредност од 25 респирација у минути. На овај начин одаје се више од 80% од укупно изгубљене топлоте тела при високим (32°C) температурама. Међутим, хипервентилација узрокује прекомеран губитак угљен-диоксида (CO_2) што доводи до пада његовог парцијалног притиска у крвној плазми ($p\text{CO}_2$, $\text{mmHg} = 49,34$ под термонеутралним условима а $46,03$ под топлотним стресом). Заузврат, бикарбонатни пуферски систем спушта концентрацију H^+ јона и узрокује повећање рН крви и нивоа бикарбоната, резултујући развојем стања познатог као респираторна алкалоза. Како би се кориговало настало повећање рН крви и одржала ацидо базна равнотежа, бикарбонати се излучују путем урина, уз задржавање H^+ . Под утицајем топлотног стреса мења се и ниво електролита Na^+ , K^+ и Cl^- у крви, тако што концентрација K^+ и Na^+ опада са порастом температуре (2), док се концентрација Cl^- повећава. Повећана концентрација Cl^- у крви смањује излучивање H^+ и реасорпцију HCO_3^- у бубрезима. Наведене промене сада доприносе ацидификацији крви као одговор на алкалозу. Последично развијена ацидоза може резултирати уласком водоникових јона у ћелије (H^+) замењујући калијум (K^+), што доводи до повећања концентрације K^+ у плазми (хиперкалемија), а затим његовог повећаног реналног излучивања. Khone i Jones (3) утврдили су пораст нивоа K^+ у крви бројлера као одговор на топлотни стрес. Сматра се да је овај одговор повезан са временским трајањем стреса, јер је Borges (2) изложио бројлере цикличним периодима стреса и утврдио смањење нивоа K^+ у крви испитиваних јединки. Наведене тврдње је потврдио Hooge (4) утврдивши да концентрација K^+ у серуму бројлера физиолошки износи 5 mEq/l и повећава се током топлотног стреса на $6,0$ до $6,5 \text{ mEq/l}$ или смањује на $3,5 \text{ mEq/l}$ током хроничног топлотног стреса. Вишак K^+ у циркулацији "такмичи" се са пуферским анјонима у бубрежним тубулама, спречавајући уклањање једног дела H^+ , који се онда мора реасорбовати чиме додатно доприноси развоју ацидозе. Belay i Teeter (5) утврдили су повећано излучивање K^+ и Na^+ у урину и фецесу бројлера изложених високој температури. Наведене промене у системској рН вредности (у одговору на топлотни стрес) су комплексне са почетном фазом респираторне алкалозе, а затим компензаторни механизми могу довести до системске ацидозе. Промена рН крви током респираторне алкалозе узрокује пад конзумације хране са свим негативним последицама на перформансе бројлера. Hurvitz и сарадници (6) објавили су је да прираст бројлера највећи при рН крви $7,28$ а да се смањује код вредности рН изнад $7,30$

или испод 7,20. Сличне резултате износе Teeter и сарадници (7) који су утврдили да при убрзаном дисању живине рН вредност крви изнад 7,25 има негативан ефекат на прираст и конверзију хране. Настанак респираторне алкалозе као одговор на топлотни стрес није доследно забележан у свим огледима на живини, што може бити последица варијација у интензитету топлотног стреса, периода изложености и степена аклиматизације јединки. Осим наведених промена, под дејством различитих стресора, укључујући топлотни, може се повећати концентрација глукозе у крви живине као директан одговор на пролазно повећано лучење адреналина (епинефрина), норадреналина и глукокортикоида. Такође, током топлотног стреса, користан показатељ (квантитативна мера стреса) представља однос хетерофили : лимфоцити у крви птица (2). Хетерофили се повећавају, док број лимфоцита у крви живине опада у условима топлотног стреса, резултујући порастом односа хетерофили : лимфоцити са забележеним вредностима од 0,62 пре, до 1,23 након излагања бројлера топлотном стресу (8). Хемодилуција представља адаптивни одговор живине на услове топлотног стреса и омогућава губитак воде испаравањем без угрожавања запремине плазме и сматра се одговорним за смањење хематокрита и хемоглобина у крви живине. Borges и сарадници (8) утврдили су вредности хематокрита од 22,2% пре топлотног стреса и 20,2% после топлотног стреса. Непосредни одговор на топлотни стрес код живине је повећање телесне температуре. Негативан утицај високих температура на перформансе бројлера раније су описали Масаги и сарадници (9) и Borges (2) где су измерене повећане ректалне температуре разматране као одговарајући квантитативни индикатор степена топлотног стреса.

БАЛАНСИРАЊЕ ЕЛЕКТРОЛИТА: ПРАКТИЧАН ПРИСТУП

У циљу одржавања ацидо базне хомеостазе неопходно је да животиња регулише улаз или излаз киселине или обоје; другим речима да контролише равнотежу киселине. Нето унос киселине мери се разликом између унетих анјона и катјона (унето анјони – катјони) а нето излучивање киселине разликом анјона и катјона излучених у урину (изнето анјони - катјони). Поред наведеног, потребно је узети у обзир и производњу киселине у телу, настале углавном метаболизмом протеина хране, која се означава као ендогена киселина ($H^{+}_{ендо}$).

Када је збир нето уноса киселине и производње ендогене киселине једнак нето излученој киселини у урину, организам се тада налази у стабилном стању (без вишка или недостатка киселине или базе) а следећи однос мора бити потврђен:

$$[\text{унето (анјони - катјони)} + H^{+}_{ендо}] - [\text{изнето (анјони - катјони)}] = 0$$

Под датим условима рН крви износи 7,4, ниво бикарбоната плазме је 25 mEq/l а алкална резерва једнака нули. Међутим, ако то није случај, алкална резерва ($BE_{енф}$) или „базни вишак“ крви ("енф" се односи на екстрацелуларне течности), биће измењен да би се постигло друго стабилно стање, стога:

$$[\text{унето (анјони - катјони)} + H^{+}_{ендо}] - [\text{изнето (анјони - катјони)}] + BE_{енф} = 0$$

Уколико анјони и катјони у претходној једначини замене места, математички добијамо формулу која на доста јаснији начин предочава степен модификације алкалне резерве ($BE_{енф}$):

$$[\text{унето (катјони - анјони)}] - [\text{изнето (катјони-анјони)}] - H^{+}_{ендо} = BE_{енф}$$

односно,

$$[\text{унето (катјони - анјони)}] = [\text{изнето (катјони-анјони)}] + H^{+}_{ендо} + BE_{енф}$$

За нутриционисте, у практичном раду најважније је одредити унос катјона и анјона путем хране, тј. $[\text{унето (катјони - анјони)}]$, али сасвим прецизна једначина којом се то решава је компликована:

$$[\text{унето (катјони - анјони)}] = mEq (Na^{+} + K^{+} + Ca^{2+} + Mg^{2+}) - mEq (Cl^{-} + SO_4^{2-} + H_2PO_4^{4-} + HPO_4^{2-})$$

У циљу поједностављења рада и омогућавања шире, практичне, примене балансирања електролита, Mongin (10) акценат ставља само на моновалентне јоне (Na^{+} , K^{+} , Cl^{-}), док двовалентне јоне изоставља из калкулације под образложењем: а) двовалентни катјони се не апсорбују толико брзо као моновалентни; б) Mg се најчешће додаје у храни; ц) фосфати се тешко квантификују јер потичу из различитих извора; д) калцијум се најчешће се додаје као калцијум карбонат за развој скелета а степен његове апсорпције контролисан је ендокриним системом; е) сулфат је укључени у малим количинама као есенцијални елемент у траговима, или за спречавање

разградње метионина; ф) практично се тешко може балансирати свих 8 елемената; г) моновалентни јони (Na^+ , K^+ и Cl^-) имају већи електролитички потенцијал од двовалентних јона, при чему Mg , S , P и Ca имају већи електролитички потенцијал у односу на Fe , Mn , Zn , Cu , Se , Mo , Co и I .

Стога се претходна једначина може поједноставити:

$$[\text{нето (катјони - анјони)}] = \text{mEq} (\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Cl}^-)$$

$$\text{mEq} (\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Cl}^-) = [\text{изнето (катјони-анјони)}] + \text{H}_{\text{ендо}}^+ + \text{BE}_{\text{еиф}}$$

Практично гледано, не може се контролисати садржај ендogene киселине произведене током метаболизма протеина, али се може утврдити минерални састав протеинских хранива и тиме подесити укупан баланс електролита хране како би $\text{BE}_{\text{еиф}}$ био једнак нули.

Узимајући у обзир све претходно изнете дефинисане и поједностављене једначине, баланс електролита хране (Dietary Electrolyte Balance – DEB) у практичној исхрани живине израчунава се преко формуле:

$$\text{Dietary Electrolyte Balance DEB} = \text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-$$

Баланс електролита хране изражава се у милиеквивалентима на килограм (mEq/kg) или на 100г (mEq/100g) ваздушно суве материје хране, а добијена вредност се, у част научнику Монгину, назива Монгинов број.

Конкретну примену наведене формуле најбоље је представити кроз практичан пример израчунавања DEB вредности obroka за исхрану живине који садржи моновалентне елементе Na (0,30%), K (0,68%) и Cl (0,30%):

Најпре је неопходно израчунати милиеквивалент сваког од задатих елемената. Способност Na^+ или K^+ да неутралишу хидроксилне групе (OH^-) и способност Cl^- да неутралише водоникове јоне (H^+) изражава се термином "милиеквивалент" (mEq), који узима у обзир атомску тежину сваког елемента или молекулску тежину сваког молекула, заједно са одговарајућом валенцом. Формула за одређивање вредности милиеквивалента елемента који је присутан у храни (mEq/kg ваздушно суве материје хране) може се представити на следећи начин:

$$\text{mEq/kg} = [(\% \text{ учешће елемента у храни} \times 10\,000) \times (\text{валенца елемента})] / [\text{атомска тежина у г}]$$

$$\text{Натријум (0,30\%): } [(0,30\% \text{ Na} \times 10\,000) \times (1)] / [23,0] = 130 \text{ mEq Na}^+/\text{kg}$$

$$\text{Калијум (0,68\%): } [(0,68\% \text{ K} \times 10\,000) \times (1)] / [39,1] = 174 \text{ mEq K}^+/\text{kg}$$

$$\text{Хлор (0,30\%): } [(0,30\% \text{ Cl} \times 10\,000) \times (1)] / [35,5] = 84 \text{ mEq Cl}^-/\text{kg}$$

Након добијања вредности милиеквивалента за сваки од задатих елемената израчунате податке потребно је уврстити у DEB формулу:

$$\text{DEB} (\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-) = 130 + 174 - 84 = 220 \text{ mEq/kg хране}$$

С обзиром да формула за израчунавање DEB обухвата две катјонске (Na^+ и K^+) и једну анјонску (Cl^-) минералну компоненту могуће је формулисати оброке са различитим садржајем Na^+ , K^+ и Cl^- који имају исту DEB вредност. Аналогно калкулацијама примењеним у претходном примеру, уколико оброк за исхрану живине садржи Na^+ (40%), K^+ (0,50%) и Cl^- (0,29), DEB вредност поново ће износити 220 mEq/kg хране.

У приказаној Монгиновој DEB формули обухваћени су само моновалентни јони (Na^+ , K^+ , Cl^-), међутим, у различитим студијама утврђено је да се правилним балансирањем које обухвата и двовалентне јоне (искључене из Монгинове DEB формуле) такође може утицати на перформансе живине. Посебно под условима у којима садржај минерала, попут фосфора и калцијума, у храни може значајније да варира, утврђивање укупног катјон-анјон баланса може бити прецизнија метода од баланса електролита. Укупни катјон-анјон баланс израчунава се коришћењем претходно изнете једначине предложене од стране Melliere i Forbes-a (11):

$$\text{Укупни катјон-анјон баланс} = \text{mEq} (\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}) - \text{mEq} (\text{Cl}^- + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{PO}_4^{4-} + \text{HPO}_4^{2-})$$

Nelson и сарадници (12) потврдили су значај утврђивања укупног катјон-анјон баланса утврдивши да његова висока вредност изазвана додатком магнезијума у храну за бројлере доводи до смањеног раста и учесталости појаве искривљених ногу код младе пилаци. Ипак, поредећи значај оба калкулативна метода, Johnson i Kaganajeewa (13) дали су јасну предност утврђивању баланса електролита у односу на укупни катјон-анјон баланс кад је реч о исхрани бројлера.

Формулишући образац за израчунавање баланса електролита, Монгин није обухватио ни евентуалне ефекте електролита присутних у води на коначну, укупну нумеричку вредност унетих електролита (храна + вода). У испитивањима бројних аутора, хемијска анализа воде за пиће показала је ипак да су Na^+ , K^+ , и Cl^- присутни само у "траговима" и да не могу значајније утицати на баланс електролита.

ОПТИМАЛАН БАЛАНС ЕЛЕКТРОЛИТА У УСЛОВИМА ТОПЛОТНОГ СТРЕСА

Утицај ацидо-базне равнотеже на различите метаболичке процесе живине тренутно је питање које окупира пажњу бројних истраживача широм света а концепт оптималног баланса електролита DEB постао је део практичне исхране и других животињских врста. Тек након разумевања и детаљног увида у физиолошке механизме који се активирају током топлотног стреса омогућен је и адекватан третман за одржавање ацидо базне равнотеже (надокнада изгубљених CO_2 , HCO_3^- , минералних материја, као и спуштање алкалне рН вредности у физиолошке вредности). Успостављање баланса електролита хране неопходан је предуслов за ефикасну ацидо базну регулацију, која усмерава рН вредност крви чиме утиче на бољу ензимску ефикасност и у крајњем исходу на раст и развој живине. Са друге стране, неадекватан DEB негативно утиче на бројне метаболичке путеве у организму и усмерава коришћење електролита ка неопходном одржавању поремећене хомеостазе уместо на максималан раст јединке (10).

У практичном раду, за израчунавање оптималног баланса електролита неопходно је испунити три основна услова: 1) садржај Na^+ , K^+ и Cl^- у оброку не сме бити испод минималних препоручених вредности, али ни изнад дозвољених; 2) однос између K^+ , Cl^- и Na^+ (electrolyte ratio ER) мора бити већи од један; 3) требало би тежити оптималној вредности баланса електролита од 250 meq/kg. Иако алакална резерва $\text{BE}_{\text{еиф}}$ није обухваћена основном DEB једначином, приликом балансирања електролита требало би тежити да њена вредност буде приближно једнака нули. Borges и сарадници (14), приметили су да је, у условима топлотног стреса, вредност алкалне резерве ($\text{BE}_{\text{еиф}}$) у крви бројлера била најближа нули (-0,30) при DEB од 240 mEq/kg. Вредност алкалне резерве крви близу нуле сматра се пожељном јер указује на успостављање потребне ацидо базне равнотеже у крви. Калкулативно, вредност алкалне резерве може се одредити на основу садржаја бикарбоната: $\log \text{HCO}_3^- = \text{pH} + \log \text{pCO}_2$, након чега се може одредити и $\text{BE}_{\text{еиф}}$ на следећи начин: $\text{BE}_{\text{еиф}} = \text{HCO}_3^- - 24,8 + 16,2 (\text{pH} - 7,4)$. Услови неопходни за израчунавање оптималног баланса електролита могу се збирно приказати на следећи начин:

- 1) $\min < \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Cl}^- (\% \text{ ваздушно суве материје смеше}) < \max$
- 2) $\text{ER} = ((\text{K}^+ + \text{Cl}^-) / \text{Na}^+); \text{ER} > 1$
- 3) $\text{DEB} (\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{Cl}^-) = \sim 250 \text{ meq/kg}$

У претходним годинама није било могуће истовремено задовољити сва три услова у стандардним софтверским пакетима који се примењују у прецизном формулисању оброка. Програм у тим случајевима упућује корисника да је услов немогуће испунити, тј. „unfeasible“ (15). Наведена ограничења превазиђена су тек последњих година применом нелинераног концепта чиме је отворен пут корисницима да испуне све услове формулисања оптималног баланса електролита. С обзиром да је реч о врло прецизном подешавању, неопходно је детаљније размотрити сваки од три наведена услова:

1) Садржај електролита у храни (Na , K и Cl , изражен у % ваздушно суве материје хране)

Иако живина има минималне захтеве према моновалентним минералима Na^+ , K^+ и Cl^- , и обезбеђени су уобичајеним хранивима и солима, неопходан је њихов адекватан баланс у храни како би се омогућило одржавање ацидо базне хомеостазе у организму и остварили најбољи резултати у производњи. Ови моновалентни минерали имају важну улогу у синтези ткивних протеина, одржавању интрацелуларе и екстрацелуларне хомеостазе и електричног потенцијала ћелијских мембрана, ензимским реакцијама и одржавању осмотског притиска и ацидо базне равнотеже.

Повећан ниво Na^+ , K^+ и Cl^- у смеси резултује и већим вредностима Na^+ , K^+ и Cl^- у крви третираних бројлера а побољшање њихових перформанси представља резултат нормализације

баланса наведених јона у крви. Међутим, уколико је учешће Na^+ , K^+ и Cl^- у смеши екстремно ниско или високо говоримо о неадекватном додавању електролита које узрокује инаптену код третираних животиња и последично смањење телесне масе а у крајњем исходу и смрти јединке када компензаторни механизми нису довољни за одржавање ацидо базне хомеостазе (10). Тако, садржај натријума већи од 1,60% узрокује високу смртност услед настанка уремије, док према високом нивоу калијума (до 3,60%) бројлери показују већу толеранцију (13). Са повећањем ДЕВ вредности у храни, ниво HCO_3^- у крви расте и доводи до веће рН вредности крви што последично доводи до развоја алкалозе јер HCO_3^- , Na^+ и K^+ имају алкалогени ефекат на телесне течности. Стога би посебну пажњу требало обратити да се при формулацији оброка не користи ниво Na испод 0,15% и изнад 0,45% или Cl изнад нивоа од 0,71%. С друге стране, оброк са екстремно ниским ДЕВ (на пример, близу 0 мEq/kg) доводи до развоја метаболичке ацидозе јер се вишак Cl^- лако апсорбује у цревима и ацидоген је (16).

Препоруке NRC (17) за садржај Na , K и Cl у смешама за исхрану бројлера износе: 0,20, 0,20 и 0,30% од 0 до 3 недеље и 0,30, 0,15 и 0,15% од 3 до 6 недеља старости, наведеним редоследом. Међутим, нутривне потребе у наведеним минералима могу значајно да варирају, тако да препоруке за K могу бити у интервалу од 0,21 до 0,73%, за Na од 0,12 до 0,41% и Cl од 0,12 до 0,53 %, датим редоследом (1). У предстартер смешама требало би обезбедити оптималан ниво Na од 0,40% (18), док екстремни нивои Na (0,15 и 0,60%), N (0,98 и 1,21%) и Cl (0,15 и 0,71%) могу бити токсични и требало би их избећи приликом формулисања оброка. Borges и сарадници (16) наводе оптималне нивое за Na 0,38 до 0,40%, Cl 0,39 до 0,405 % и K 0,52% у стартер смешама, док исте вредности за гровер смеше (21-42 дана) износе Na 0,41 до 0,445%, Cl 0,267 до 0,315% и K 0,47%. Rondon и сарадници (19) утврдили су да за оптималне перформансе бројлера, потребе Na и Cl у храни износе 0,28 и 0,25%, датим редоследом. Слично претходном, Murakami и сарадници, (20) препоручују ниво натријума од 0,18 до 0,25. У својим испитивањима Briton (21, 22) је закључио да, за најбољи прираст, ниво NaCl у исхрани бројлера треба да буде 0,45%, што је у свом огледу потврдио и Zanardo (23). Анализирајући ефекте додавања 12 различитих соли у смеши за исхрану бројлера у условима високе температуре (30°C), Pardue и сарадници (24) закључили су да се употребом натријум бикарбоната остварују најбољи производни резултати. Током топлотног стреса, употребом 0,39 или 0,50% натријум бикарбоната (0,22 и 0,25% Na) смртност бројлера је била за 50% нижа у поређењу са групом која је путем хране добијала 0,06; 0,17 или 0,28% натријум бикарбоната (0,13, 0,16 и 0,19% Na). Најмања потребна количина натријум бикарбоната у храни за бројлере (након 28 дана живота), која осигурава минималну смртност у условима топлотног стреса, износи 0,40% (25).

2) Однос електролита (electrolyte ratio ER)

Иако већина произвођача хибрида живине износи врло прецизне нормативе у којима су изнете препоручене количине, Na^+ , K^+ и Cl^- у смешама, ипак, за потпуну примену концепта баланса електролита, наведене информације нису довољне. Најпре Talbot, (26) а затим и Mongin (10) указали су на значај и неопходност утврђивања како количине, тако и пропорције тј. оптималног односа између наведених минерала, како би се обезбедило одржавање физиолошких вредности ацидо базне хомеостазе у организму а самим тим остварио оптималан раст животиње. Mongin (10) изнео је само препоруку да би однос електролита (electrolyte ratio ER = $(\text{K}^+ + \text{Cl}^-) / \text{Na}^+$) у храни за бројлере требало да буде већи од један али без даљих, прецизнијих информација. Испитујући најпожељнији однос електролита, као и вредност оптималног баланса електролита у исхрани бројлера, Gamba и сарадници (27) спровели су оглед у термо неутралним и условима топлотног стреса. Оброци су формулисани са ДЕВ од 150, 250, 250, 250 и 350 мEq/kg, док су ER вредности при датим ДЕВ биле 3, 2, 3, 4 и 3, наведеним редоследом. Препорука аутора је да под термонеутралним условима вредност ДЕВ треба да износи 250 мEq/kg уз ER од 3, док у условима топлотног стреса ДЕВ треба нормирати на 350 мEq/kg а ER на 3. Johnson и Karunajeewa (13) нагласили су и значај праћења односа $\text{Na}:\text{K}$ у исхрани живине и истакли да при уобичајеном садржају Cl у оброку (0,2-0,3%) за постизање оптималне производње наведени однос не би требало да буде испод 0,5 као ни изнад 1,8.

3) Оптимална вредност баланса електролита (ДЕВ)

Утврђивање оптималног баланса електролита представља врло комплексан задатак и захтева узимање у обзир бројних фактора и специфичних аспеката производње као што су: апсорпција, депоновање, искоришћавање и излучивање минералних материја укључених у исхрану живине, ниво протеина у храни, присуство фитазе, као и других адитива у храни, фазу исхране, узраст животиње, пол, индивидуалне разлике међу животињама, смештајне услове, у првом реду влажност и температуру у објекту. Ради поједностављења, од највећег практичног значаја је утврђивање оптималне ДЕВ вредности за основне смеше/фазе у исхрани живине при различитим температурним условима.

Првих седам дана живота бројлера нутриционисти означавају као предстартер фазу (иако није уобичајен термин у живинарској производњи) и разликују је од надовезујућег периода исхране до 21. дана живота, који се назива стартер фаза. Наведени период сматра се посебно осетљивим због брзог раста и специфичности дигестивних процеса који нису у потпуности развијени код новоизлежених јединки, потреба за висококвалитетном храном специфичног састава, као и високих захтева у погледу смештаја, посебно температуре. У предстартер периоду концентрација електролита и њихов оптималан баланс је од кључног утицаја на унос хране и последичан висок раст пилиади. Мајорка и сарадници (18) предлажу да се, као оптималне током првих седам дана живота бројлера, користе ДЕВ вредности од 174 и 163 мЕq/kg хране за најбољу конзумацију и прираст, наведеним редоследом. Borges и сарадници (28) приметили су током предстартер фазе депресију раста код пилиади, као резултат високих вредности ДЕВ у исхрани (354-360 мЕq/kg). Кориговањем вредности ДЕВ на 330 мЕq/kg наведена депресија раста је изостала.

Mongin i Sauveur (29) утврдили су да оптимална вредност ДЕВ, неопходна за постизање добрих производних резултата у исхрани бројлера до 28 дана старости, износи 250 мЕq/kg, док екстремне вредности близу 0 и 600 мЕq/kg резултују депресијом раста. Сличне вредности изнели су Borges и сарадници (16) када су доказали да за најбољи прираст и конверзију хране у условима високе температуре и влаге у објекту, стартер и гровер оброке треба формулисати са ДЕВ вредности од 240 мЕq/kg. Анализирајући све три врсте фазе у исхрани бројлера, Szabo и сарадници (30), препоручују ДЕВ вредност од 175 мЕq/kg до 21 дана (стартер) и 250 мЕq/kg током гровер и финишер фазе. На основу разлика у препорукама наведених аутора може се закључити да, приликом утврђивања оптималног баланса електролита, требало би пре тежити проналаску опсега оптималних нивоа, а не једне конкретне вредности. Стога Borges и сарадници (16) предлажу оптимални опсег ДЕВ, (за повећање телесне масе и конверзију хране) за стартер фазу исхране (од 0 до 21 дан) од 186 до 197 мЕq/kg, док се за гровер фазу (21-42 дана) оптимални ниво ДЕВ налази се у опсегу 207 до 236 мЕq/kg. Испитивања која су обавили Johnson и Karginajeva (13) потврдила су ДЕВ вредност између 250 и 300 мЕq/kg као граничне за максималан раст бројлера. Уколико се ДЕВ вредност одржава у опсегу од 155 до 330 мЕq/kg конверзија хране се неће битно променити. Оптимална ДЕВ вредност за исхрану бројлера значајно се разликује у зависности од амбијенталне температуре, конкретно, оптимална ДЕВ износи 250 мЕq/kg за умерене (18 до 26°C) а 350 мЕq/kg за високе (25 до 35°C) температурне услове.

ЗАКЉУЧАК

Живинарство данас спада у једну од најпрофитабилнијих грана сточарске производње, првенствено због супериорних биолошких карактеристика које живина поседује (висока репродуктивна способност, интензиван раст, кратак генерацијски интервал и висок степен искоришћавања хране). Производи од живине су високо квалитетни, имају релативно ниску тржишну цену, прихваћени су од стране свих култура и религија, што их чини пожељним у свакодневној исхрани људи. Током последњих деценија, бројна побољшања остварена на пољу селекције, менаџмента и исхране резултовала су достизањем максимума генетски пројектованог потенцијала производних својстава. Међутим, високи селекцијски критеријуми усмерени на повећање производње довели су до повећане осетљивости живине на бројне стресоре а с обзиром на глобалне климатске промене, топлотни стрес постаје један од најважнијих. Фаворизовање једни, које су неосетљиве на промене амбијенталних услова, инкомпатибилно је са основним

биолошким законима и доводи до појаве тзв. “зомби јединки” што не би требало да буде циљ савременог живинарства. Усклађивањем основних природних потреба живине са начином гајења може се значајно утицати на смањење стреса, повећање отпорности животиња и квалитет производа. Бројне технике примењиване у прошлости за превазилажење проблема који се јављају током топлотног стреса показале су одређен потенцијал и економичност у примени, али ниједна није пружила у потпуности задовољавајуће решење. Основни недостатак лежи у чињеници да примењене стратегије нису фокус пажње усмериле на физиолошке процесе који се дешавају у организму за време топлотног стреса а првенствено на поремећај ацидо базне равнотеже и развој респираторне алкалозе. У условима савремене производње, као најефикаснија у превазилажењу топлотног стреса код живине, издваја се управо метода контроле ацидо базне равнотеже у организму животиње правилним усклађивањем електролита додатих у храну и/или воду за пиће. Утврђивање оптималног баланса електролита у храни је врло комплексан задатак и још увек представља изазов за бројне нутриционисте широм света. Неопходно је узети у обзир бројне факторе и специфичне аспекте живинарске производње за сваки објекат засебно уз придржавање препорука да се оптимална вредност баланса електролита налази у опсегу 250-300 мЕq/кг хране.

Афилијација

Овај рад финансиран је средствима Министарства Републике Србије бр. ИИИ 46002

Литература

1. Ahmad T and Sarwar M, 2006, Dietary electrolyte balance: implications in heat stressed broilers, *W. Poult. Sci. J.* 62.
2. Borges S A, 1997, Suplementacao de cloreto de potassio e bicarbonato de sodio para frangos de corte durante o verao, *Dissertacao de mestrado*, UNESP, Jaboticabal, Brazil.
3. Khone HJ and Jones JG, 1975, Changes in plasma electrolytes acid-base balance and other physiological parameters of adult female turkeys under conditions of acute hyperthermia, *Poult. Sci.* 54, 2034-8.
4. Hooge DM, 1995, Dietary potassium requirements of poultry explored, *Feedstuffs* 67, 14-16.
5. Belay T and Teeter RG, 1996, Effects of ambient temperature on broiler mineral balance partitioned into urinary and faecal loss, *Brit. Poult. Sci.* 37, 423-33.
6. Hurwitz S, Cohen I, Bar A, 1973, Sodium and chloride requirements of chick: relationship to acidbase balance, *Poult. Sci.* 52, 903-9.
7. Teeter RG, Smith MO, Owens FN, 1985, Chronic heat stress and respiratory alkalosis: occurrence and treatment in broiler chicks, *Poult. Sci.* 64, 1060-4.
8. Borges SA, Fischer da Silva AV, Majorca A, Hooge DM, Cummings KR, 2004, Physiological Responses of Broiler Chickens to Heat Stress and Dietary Electrolyte Balance (Sodium Plus Potassium Minus Chloride, Milliequivalents Per Kilogram), *Poult. Sci.* 83, 1551-8.
9. Macari M, Furlan RL, Gonzales E, 1994, Fisiologia aviaria aplicada a frangos de corte. FUNEP, Jaboticabal, Brazil.
10. Mongin P, 1981, Recent advances in dietary cation-anion balance: applications in poultry, *Proceedings of the Nutrition Society* 40, 285-94.
11. Melliere AL and Forbes RM, 1966, Effect of altering the dietary cation-anion ratio on food consumption and growth of young chicks, *J Nutr.* 90, 310-4.
12. Nelson TS, Kirby LK, Johnson ZB, Beasley JN, 1981, Effect of altering the cation-anion content with magnesium and phosphorus on chick performance, *Poult. Sci.* 60, 1030-5.
13. Johnson RJ AND Karunajeewa H, 1985, The Effects of Dietary Minerals and Electrolytes on the Growth and Physiology of the Young Chick, *J. Nutr.* 115: 1680-90.
14. Borges SA, Fischer da Silva AV, Ariki J, Hooge DM, Cummings KR, 2003, Dietary electrolyte balance for broiler chickens exposed to thermoneutral or heat-stress environments, *Poult. Sci.* 82, 428-35.
15. Radulović S, Marković R, Petrujkić B, Šefer D, 2018, Optimizacija obroka upotrebom softvera, *Zbornik predavanja XXXIX seminara za inovacije znanja veterinara*, FVM Beograd, 159-67.
16. Borges SA, Fischer da Silva AV, Ariki J., Hooge DM, Cummings KR, 2003, Dietary Electrolyte Balance for Broiler Chickens Under Moderately High Ambient Temperatures and Relative Humidities, *Poult. Sci.* 82, 301-8.
17. National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
18. Maiorka A, Magro N, Bartels HA, Kessler AM, Penz, AM, 2004, Different sodium levels and electrolyte balances in pre-starter diets for broilers, *Rev. Bras. Cienc. Avic* 6, 143-6.
19. Rondon-Oviedo EO, Murakami AE, Furlan AC, Moreira M, 2001, Sodium and chloride requirements of young broilers fed corn-soybean diets (one to twenty one days of age), *Poult. Sci.* 80, 592-8.
20. Murakami AE, Saleh EA, England JA., Dickey

DA, Watkins SE, Waldroup PW, 1997, Effect of level and source of sodium on performance of male broilers to 56 days, *J. Appl. Poult. Res.* 6, 128-36. **21.** Britton WM, 1991, NaCl for broilers chick growth. *Poult. Sci.* 70, 1-18. **22.** Britton WM, 1992, Dietary sodium and chloride for maximum broiler growth, *Zootecn. Int.* 1, 52-7. **23.** Zanardo JA, 1994, Sodium levels and inophores and nonionophore anticocccial agents in broiler diets, *Dissertacao Mestrado em Zootecnia*. Federal University Vicosa, Vocosa, Brazil. **24.** Pardue SL, Thaxton JP, Brake J, 1985, Influence of supplemental ascorbic acid on broiler performance following exposure to high environmental temperature, *Poult. Sci.* 64, 1334-8. **25.** Abbas A, Jamshed K, Naeem M, Ayaz M, Sufyan A, Hussain S, 2012, Cation anion balance in avian diet: a Review, *Agric. Sci. Res. J.* 6, 302-7. **26.** Talbot CJ, 1978, Sodium, potassium and chloride imbalance in broiler diets, *Proceedings Nutrition Society*, 37-53. **27.** Gamba JP, Rodrigues MM, Garcia Neto M, Perri SHV, Faria Júnior MJ, Pinto MF, 2015, The Strategic Application of Electrolyte Balance to Minimize Heat Stress in Broilers, *Rev. Bras. Cienc. Avic* 17, 237-46. **28.** Borges SJ, Santin E, Fischer da Silva A, Maiorka A, 1999, Balanco eletrolítico em dieta pre-inicial de frangos de corte durante o verao, *Revista Brasileira de Ciencia Avico*, 1, 175-9. **29.** Mongin P, Sauveur B, 1976, Interrelationships between mineral nutrition, acid-base balance, growth and cartilage abnormalities, *Proceedings of the 12th Poultry Science Symposium Edinburg, Brit Poultry Sci*, 235-7. **30.** Szabó J, Vucskits AV, Andrásófszky E, Berta E, Bersényi A, Börzsönyi L, Pálfi V, Hullár I, 2011, Effect of dietary electrolyte balance on production, immune response and mineral concentrations of the femur in broilers, *Acta Veterinaria Hungarica*, 59, 295-310.

**SUBAKUTNA ACIDOZA BURAGA MLIJEČNIH KRAVA:
UZROCI, POSLJEDICE I KONTROLA**

***SUBACUTE RUMINAL ACIDOSIS IN DAIRY COWS:
CAUSES, CONSEQUENCES AND CONTROL***

***Hrvoje Valpotić¹, Željko Mikulec¹, Silvijo Vince²,
Diana Brozić¹, Martina Đurić Jarić³, Marko Samardžija²***

¹Zavod za prehranu i dijetetiku životinja, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu;

²Klinika za porodništvo i reprodukciju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu;

³Ewo Pharma d.o.o., Zagreb, Hrvatska

Kratak sadržaj

Subakutna acidoza buraga (engl. subacute ruminal acidosis, SARA) je učestali probavni poremećaj u visoko-proizvodnim stadima mliječnih krava hranjenih obrocima s velikim udjelom koncentrata. Iako se o etiologiji bolesti i dalje raspravlja, općenito se smatra stanjem u kojem je pH vrijednost buraga duže vrijeme u rasponu od 5,2 do 6,0. Nizak pH usporava razgradnju strukturnih ugljikohidrata, mijenja omjere nižih masnih kiselina prisutnih u buragu te inhibira sintezu mikrobne bjelancevine. SARA također dovodi do promjena u omjerima populacija mikroorganizama te posljedično i do smanjenog unosa hrane koji dodatno produbljuje negativnu energetska bilancu. Najnovija istraživanja potvrđuju da SARA nije bolest koja je isključivo vezana za sniženu pH vrijednost nego je također rezultat opsežnih promjena mikrobne populacije koje nisu direktno vezane za sastav obroka. Mliječne krave zahvaćene ovim poremećajem ne pokazuju kliničke simptome iako je bolest povezana s upalnim procesima u različitim tkivima i organima. Najugroženije kategorije su krave u ranoj laktaciji, primiparne krave te krave na ispaši. Dijagnostika bolesti provodi se mjerenjem pH vrijednosti buragovog sadržaja koji se može uzorkovati ruminocentezom ili sondiranjem. Ruminocenteza je upitna s etičkog stajališta zbog čestih komplikacija koje nastaju nakon zahvata, premda je još uvijek najpouzdanija dijagnostička metoda. Prevencija se temelji na pravilnom balansiranju i prezentaciji obroka, hranjenju obrokom odgovarajuće veličine čestica, dodavanju pufera u obrok i modulaciji mikrobne populacije.

Ključne riječi: subakutna acidoza buraga (SARA), mliječne krave, dijagnostika, preventiva

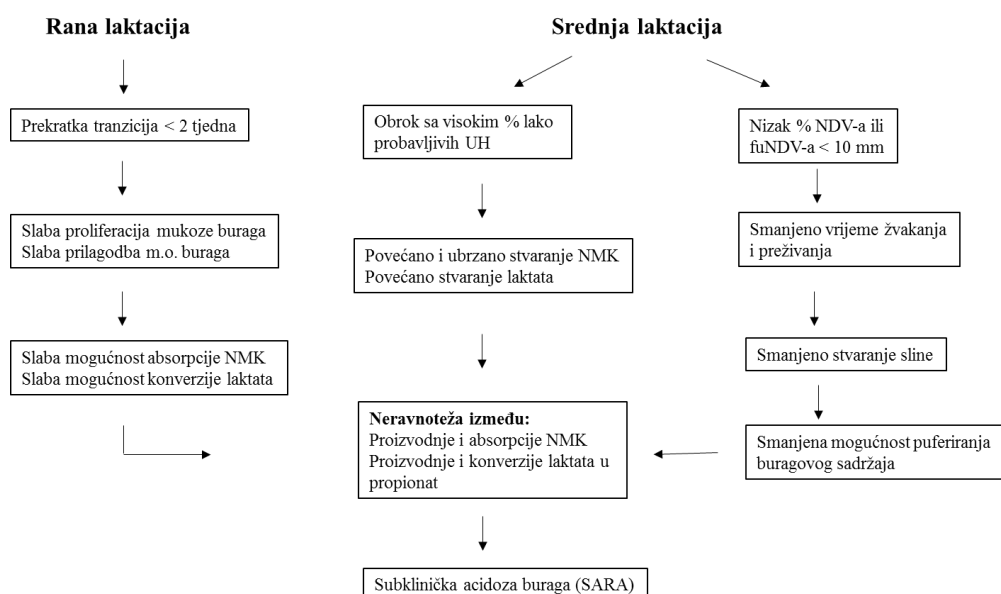
Uvod

U posljednjih nekoliko desetljeća zabilježen je značajan napredak u sposobnosti mliječnih krava da proizvode velike količine kvalitetnog mlijeka. Povećanje proizvodnosti je rezultat stalnog stizanja novih spoznaja iz genetike i napretka njihove praktične primijene u selekciji, a potom i usavršavanja načina držanja, menadžmenta te hranidbe. Međutim, povećana mliječnost je u većini slučajeva značajno ili potpuno u sjeni dugotrajnih negativnih posljedica za zdravlje krava. Da bi se postigla i održala visoka proizvodnja mlijeka potrebno je krave hraniti visoko-energetskim obrocima koji obiluju lako probavljivim ugljikohidratima. U praksi to znači hranjenje velikim količinama koncentrata tijekom početne i srednje laktacije kada su nutritivne potrebe krava najveće. Povećanje udjela koncentrata na bazi žitarica ostvareno je smanjivanjem voluminoznog dijela obroka, koji je kod preživača nužan za normalno odvijanje probave. Voluminozna hrana je bogata vlaknima koja potiču žvakanje i proizvodnju puferima bogate sline, kontrakcije i miješanje buragovog sadržaja te održavanje funkcionalne mikrobne populacije u buragu (Zebeli i sur., 2012). S druge strane koncentrirana hrana u buragu brzo fermentira proizvodeći velike količine nižih masnih kiselina (NMK) koje često prelaze mogućnost absorpcije i puferiranja te

uzrokuju kraći ili duži pad pH vrijednosti sadržaja buraga (Aschenbach i sur., 2011). Kada je pH vrijednost sadržaja buraga često i dugotrajno u rasponu od 5,5 do 5,8 smatra se da krava boluje od metaboličkog poremećaja kojeg nazivamo subakutna acidoza buraga (engl. subacute ruminal acidosis, SARA) (Plazier i sur., 2008; Oetzel, 2007). SARA se često susreće u visoko-proizvodnim stadima mliječnih krava gdje najčešće zahvaća od 11-26% životinja u ranoj i srednjoj laktaciji te nepovoljno utječe na zdravlje, dobrobit i profitabilnost (Kleen, 2004; Enemark, 2008; Antanaitis i sur., 2015; Stefanska i sur., 2017). Trenutno SARA predstavlja najvažniju metaboličku bolest s opsežnim negativnim posljedicama na mljekarski sektor (McCann i sur., 2016). Ovaj metabolički poremećaj često ima negativan utjecaj i na unos hrane, kvalitetu i kvantitetu mlijeka, mikropopulaciju i fermentaciju u buragu, a životinje su izrazito izložene da sekundarno razviju ostale metaboličke bolesti poput laminitisa, masne jetre, dislokacije sirišta i čireva na jetri (Stone, 2004; Krause i Oetzel, 2006; Zebeli i Metzler Zebeli, 2012). U ovom preglednom radu osvrnut ćemo se na osnovne uzroke i posljedice SARA u mliječnih krava te analizirati dijagnostičke metode i praktične metode prevencije ovog poremećaja.

Uzroci i posljedice

Acidoza buraga je poremećaj koji nastaje kao posljedica naglog unosa velikih količina lako probavljivih ugljikohidrata koji se djelovanjem mikroorganizama pretvaraju u NMK i mliječnu kiselinu (Nocek, 1997). Za razliku od akutnog oblika bolesti SARA nije povezana sa nakupljanjem većih količina mliječne kiseline nego s ukupnom količinom NMK u buragu koja uzrokuje pad pH vrijednost (Krause i Oetzel, 2006). Također postoje dokazi da SARA može nastati i u pašnih životinja koje konzumiraju veliku količinu lako probavljive voluminozne hrane s malo fizikalno učinkovitih neutralnih detergenskih vlakana (fuNDV) (O'Grady i sur., 2008). Fizikalno učinkovita vlakna su povezana s veličinom čestica i imaju direktan učinak na vrijeme koje krava provede žvačući te posljedično i na proizvodnju sline koja je važan faktor u kontroli pH vrijednosti buraga (Allen, 1997). Odgovarajuća razina fuNDV je također važna, jer stimulira kontrakcije buraga te pospješuje apsorpciju NMK kroz stijenku buraga (Humer i sur., 2018). Međutim, obroci koji sadrže velike čestice iz voluminozne hrane u većem postotku također mogu povećati rizik od ovog poremećaja zbog nastojanja krava da prebire i izbjegavaju grublje i manje ukusne dijelove biljke (Oetzel, 2007). Također može doći i do pogrešaka u kalkulaciji suhe tvari (ST) i pretjeranom miješanju TMR koje dovode do obroka s manjom količinom fuNDV-a od očekivane (Stone, 2004). Najugroženije kategorije su krave u ranoj laktaciji, primiparne krave i krave koje se napasuju lako razgradivom travom sa niskom razinom vlaknine (Li i sur., 2013). Krave u ranoj laktaciji imaju relativno nestabilnu bakterijsku populaciju buraga zbog prilagodbe na laktacijski obrok te nedovoljan kapacitet papila buraga da apsorbiraju velike količine NMK koje nastaju fermentacijom koncentrata (Stone, 2004). Smanjeni unos ST prije puerperija i nagli prijelaz s pretežno voluminoznog na izrazito koncentrirani obrok predstavlja veliki rizik od razvoja SARA u krava u ranoj laktaciji (Roche i sur., 2013). Lagano povećanje koncentrata od 0,25 kg ST/dan osigurava lakšu mogućnost prilagodbe mikrobiota, od naglog povećanja koncentrata od 1 kg ST/dan (Dieho i sur., 2017). Međutim, u većini slučajeva proizvođači koriste svega nekoliko varijanti laktacijskih obroka, pa je kravama već u drugom tjednu laktacije ponuđen obrok sa 40 do 50% koncentrata u ST umjesto da je prilagodba na koncentrat postepena (Humer i sur., 2018). U krava u srednjoj laktaciji zabilježen je još veći postotak životinja koji boluje od SARA (Stone, 2004). Razvoj SARA u srednjoj laktaciji, kada je unos ST maksimalan, odnosi se na pogreške u sastavljanju obroka, nisku frekvenciju hranjenja, pretjeranu obradu krmiva, konzumaciju prevelikih obroka i značajno sortiranje obroka u korist koncentrata (Humer i sur., 2018). Krave su posebno ugrožene tijekom ljetnih mjeseci, kada su pod utjecajem temperaturnog stresa koji se odražava na smanjenu mogućnost puferiranja buragovog sadržaja, netipičan raspored obroka zbog vrućine te pogreške u sastavljanju obroka na štetu fuNDV zbog smanjenog uzimanja ST (Oetzel, 2007).



Slika 1. Shematski prikaz uzroka subkliničke acidoze buraga (SARA) u mliječnim krava (prilagođeno prema izvorniku autora Enemark i sur., 2002)

Utjecaj na unos hrane

Smanjenje dobrovoljnog unosa ST je najčešći klinički znak za dijagnozu SARA (Kahn, 2005). U nekim istraživanjima kada je inducirana SARA, unos TMR obroka je smanjen za 25% (Kleen i sur., 2003). Razloge smanjenog unosa hrane možemo objasniti smanjenjem probavljivosti vlakana zbog inhibicije celulolitičkih bakterija povećanom koncentracijom NMK, naročito propionata, te osmomolarnosti u buragu (Allen, 2000). Kada su krave oboljele od SARA mogle birati krmiva, pojačano su konzumirale sijeno, ali ne i sodu bikarbonu, što se može objasniti razlikom u palatabilnosti (Keunen i sur., 2002; Keunen i sur., 2003). Nekoliko je istraživanja pokazalo da SARA uzrokovana žitaricama povećava razinu proteina akutne faze koji su indikatori upalnog odgovora u organizmu te mogu doprinijeti smanjenju unosa ST (Gozho i sur., 2007; Andersen i sur., 2000). Ova je pretpostavka potkrijepljena primjerom da indukcija SARA zamjenom sijena lucerne s peletama lucerne nije rezultirala upalom, niti je rezultirala smanjenjem unosa hrane (Khafipour i sur., 2007.). Još jedna posljedica SARA je cikličko uzimanje hrane, pri kojem krava konzumira obrok te odbija daljnje hranjenje zbog pada pH vrijednosti i povećane osmomolarnosti buragovog sadržaja. Nakon ponovnog uspostavljanja normalnih uvjeta, apetit se vraća u normalu (Fulton i sur., 1979). To može biti korisno u stadima gdje se mjeri unos hrane, ali u štalama sa slobodnim držanjem životinja, promjene u unosu hrane će se teško primijetiti. Eventualno se mogu primijetiti promjene u dužini preživanja pojedine skupine životinja, ali još uvijek ne postoji jasan podatak o postotku životinja koje bi trebale preživati u svakom trenutku. Praćenje tog parametra moglo bi omogućiti prepoznavanje ranog znaka pojave SARA (Enemark, 2008).

Promjene u sastavu mlijeka

Mliječni parametri se mijenjaju ovisno o genetici, hranidbi, stadiju laktacije, paritetu i brojnim drugim činiteljima (Chamberlain i Wilkinson, 1996). Obroci bogati koncentratima, koji su glavni uzrok SARA često imaju značajan utjecaj na postotak mliječne masti. Nizak pH buraga uzrokovan hranjenjem obrokom sa smanjenim postotkom NDV rezultira nepotpunom biohidrogenacijom masnih kiselina i povećanom apsorpcijom trans masnih kiselina, koje negativno djeluju na lipogenezu (Grinari i sur., 1998). Na pad postotka mliječne masti može se još utjecati pretjeranim davanjem nezasićenih masti i dodatkom monensina, koji inhibira bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu. Prevladava mišljenje da su

za pad postotka mliječne masti potrebni višestruki padovi pH vrijednosti dok se dovoljno ne naruši proces biohidrogenacije u buragu (Oetzel, 2007). Osim postotka mliječne masti možemo promatrati i indeks mast – bjelančevina čije su normalne vrijednosti u rasponu od 1,1 do 1,5. U krava koje boluju od SARA, zabilježen je nizak indeks mast – bjelančevina ($< 1,0$) (Li i sur., 2012). Neki autori smatraju da se niska razina uree u mlijeku može koristiti individualno ili u kombinaciji s niskom razinom mliječne masti za predviđanje rizika od pojave SARA (Gao i Oba, 2015). To se može objasniti boljom fiksacijom amonijaka, zbog intenzivnije fermentacije ili boljim protokom uree u burag zbog niskog pH, što rezultira smanjenjem njihovog izlučivanjem putem mlijeka i urina. Međutim, niska razina uree u mlijeku može biti rezultat nedostatka u buragu razgradive bjelančevine ili visoke učinkovitosti sinteze mikrobne bjelančevine (Chamberlain i Wilkinson, 1996). Još nije u potpunosti poznato zašto eksperimentalno inducirana SARA povećava postotak mliječne bjelančevine iako se pretpostavlja da viša razina obavljive organske tvari pospješuje sintezu mikrobne bjelančevine.

Dijagnostika

Dijagnostika ovog poremećaja u farmskim uvjetima je zahtjevna zbog blagih i nejasnih kliničkih simptoma. SARA se smatra problemom čitavog stada, pa se preporučuje praćenje simptoma po skupinama životinja. Također, neki simptomi se mogu pojaviti s velikim vremenskim odmakom, što dodatno otežava prepoznavanje važnosti ove bolesti u nekim stadima. Klinički simptomi koji mogu ukazivati na prisutnost SARA su: loša tjelesna kondicija, česte infekcije i veliki postotak šepavosti (Oetzel, 2017). Mjerenje pH vrijednosti sadržaja buraga trenutno predstavlja najtočniju dijagnostičku metodu, jer daje uvid u trenutno stanje u buragu (Enemark, 2008). Problem je u tome što veterinari u farmskim uvjetima najčešće imaju jednu priliku da uzmu uzorak sadržaja buraga, a to nije dovoljno za sigurno postavljanje dijagnoze.

Praćenje pH vrijednosti sadržaja buraga

Za uzorkovanje se odabiru životinje koje su u ranoj ili srednjoj laktaciji (Kahn, 2005), a skupina mora sadržavati najmanje 12 krava. Ako se kod više od 3 krave u odabranom uzorku ustanovi pH-vrijednost sadržaja buraga manja od 5,5, smatra se da je rizik za pojavu SARA velik. Također je važno da se uzorci prikupljaju ujednačeno i u pravo vrijeme nakon hranjenja, kada je pH vrijednost pala na najnižu razinu. Za stada krava koje se hrane komponentnim obrocima preporučuje se uzorkovati 2-4 sata nakon davanja koncentrata, dok se u krava hranjenih TMR obrocima preporučuje uzorkovati 6-12 sati nakon hranjenja (Krause i Oetzel, 2005). Tekućina iz buraga za analizu pH vrijednosti može se prikupiti sondom za burag ili ruminocentezom. Iako je korištenje buragove sonde manje invazivna metoda, općenito se smatra da je njezino korištenje nepraktično, zbog vremena koje je potrebno da se obavi uzorkovanje, a lokacija sonde u buragu i kontaminacija uzorka tekućine slinom utječu na varijabilnost dobivenih pH vrijednosti (Enemark i sur., 2002). Druga i pouzdanija metoda prikupljanja tekućine iz buraga je ruminocenteza, a prvi puta su je opisali Nordlund i sur., (1995). Ova metoda omogućava uzimanje buragove tekućine iz kaudalne buragove vreće uz pomoć igle koja se uvodi kroz abdomen i stjenku buraga. Granična pH vrijednost buragove tekućine, za utvrđivanje zdravih i bolesnih životinja, ovom metodom iznosi 5,5 (Garret, 1996). Pojedini autori tvrde da ovaj postupak uzrokuje samo blagi stres u krava, i ne utječe na unos ST i mliječnost te se može izvoditi sa ili bez lokalnog anestetika (Mialon i sur., 2012). Drugi pak autori smatraju da je metoda previše invazivna te da često uzrokuje posljedice poput apscesa, hematoma i septičkog peritonitisa na mjestu uboda (Kleen, 2004; Strabel i sur., 2007). Posljednjih godina sve više se koriste bežični senzori, koji se trajno nalaze u predželucima gdje kontinuirano mjere pH vrijednosti buragove tekućine. Oni se najčešće nalaze u kapuri gdje je pH u prosjeku nešto viši od ventralne buragove vreće, pa granična vrijednost za dijagnostiku SARA iznosi 6,0 (Falk i sur., 2016). Takvi senzori bi mogli biti od koristi pod uvjetom da im se produži vijek trajanja i smanji cijena.

Mjerenje debljine sluznice buraga

U posljednje vrijeme postoje indicacije da bi debljina sluznice buraga mogla poslužiti kao dijagnostička metoda za utvrđivanje SARA (Neubauer i sur., 2018a). Zadebljanje sluznice buraga, kao posljedica davanja koncentrirane hrane, može se mjeriti abdominalnim ultrazvukom s kojim veterinari na

farmama imaju dosta iskustva. Isti su autori u mliječnih krava zabilježili zadebljanje mukoze kada je obrok krava promijenjen od 40% na 60% koncentrata. Međutim, zabilježena je i niska korelacija između debljine mukoze i pH vrijednosti sadržaja buraga. Autori su također primijetili da krave koje su prošle više od 3 laktacije imaju deblju sluznicu buraga i više vrijednosti pH od mladih krava. Ova neinvazivna metoda mogla bi u budućnosti biti od velike koristi u dijagnostici SARA.

Ostale metode

Jedan od specifičnih znakova SARA je nalaz čireva na jetri na liniji klanja, koji u izlučenih životinja mogu biti zastupljeni i više od 30% (Rezac i sur., 2014). Takve bi informacije bile od velike koristi kada bi se prosljedile do farme odakle životinje potječu. U posljednje vrijeme se spominju i bežični senzori motiliteta predželudaca, koji predstavljaju praktičan i dugotrajan način za dijagnostiku atonije buraga uzrokovanu SARA (Nogami i sur., 2017).

Kontrola

Prevenција SARA zahtijeva veliku pažnju pri formulaciji i prezentaciji obroka, kao i odličan menadžment hranidbe. Općenito, krave hranjene TMR su manje izložene nastanku SARA, jer takav način unosa hranjivih tvari pretpostavlja manje obroke koncentrata i adekvatan udio vlakana pri svakom hranjenju (Krause i Oetzel, 2006). TMR bi se trebao miješati samo 3 do 5 minuta s mogućnošću dodavanja vode kako bi udio ST u obroku iznosio oko 45%, i na taj bi se način smanjilo prebiranje (Krause i Oetzel, 2006). Veličina čestica u TMR obroku kontrolira se Penn State separatorom čestica, uz preporuku da minimalno 40% čestica bude duže od 8 mm (Heinrichs i Kononoff, 2002). Također, izvor škroba je izrazito važan, pa tako pšenica i ječam brže i potpunije fermentiraju od kukuruza i sirka, naročito ako su sitno mljevene i vlažne. Učestalija dostava hrane (2-4 puta na dan) i guranje hrane pred krave smanjuju prebiranje i povećavaju broj obroka te ukupno vrijeme hranjenja što osigurava bolju distribuciju hranjenja tijekom dana (DeVries i sur., 2005). U praksi je važno spriječiti periode kada krave ne uzimaju hranu, jer oni dovode do porasta pH u buragu iznad 7, što dovodi do inhibicije rasta bakterija koje troše mliječnu kiselinu i povećava opasnost od nastanka acidoze. Takve krave često konzumiraju vrlo velike obroke prilikom slijedećeg hranjenja, što dodatno može smanjiti pH (Krouse i Oetzel, 2006). U krava u početnoj laktaciji važno je poboljšati hranidbenu aktivnost na način da se osigura više hranidbenog prostora po životinji, dok bi kravama u prvoj laktaciji trebalo davati ujednačen TMR i izbjegavati velike obroke (Oetzel, 2017). Osim procjene količine strukturnih vlakana u obroku za rano otkrivanje visoko rizičnih krava, nedavno su se pojavili elektronski uređaji za praćenje vremena žvakanja (Kröger i sur., 2016). Na manjim farmama, gdje ne postoje proizvodne skupine najčešće se ne hrani TMR obrokom nego djelomično izmiješanim obrokom i dodatnim koncentratom, ovisno o proizvodnji mlijeka. Kod takvog je hranjenja teže procijeniti odgovarajuću količinu fuNDV obroka, naročito prilikom davanja velikih količina koncentrata. Pravilo je da se za svaki kg dodatnog koncentrata s česticama koje su >19 mm, one moraju umanjiti za 2%, dok se čestice <8 mm moraju za isti postotak povećati (Zebeli i sur. 2012).

Dodaci

Dodaci hrani često se koriste za prevenciju nastanka SARA u mliječnih krava. Iako ne garantiraju da do poremećaja neće doći, mogu uz odgovarajući režim hranidbe biti koristan alat za suzbijanje ove bolesti. Tako u laktacijskim obrocima često možemo naći kvasce koji u različitim oblicima optimiziraju probavu vlakana i stimuliraju iskorištavanje mliječne kiseline (Chaucheyras-Durand i sur., 2008). Osim kvasaca, mogu se koristiti i fitobiotici koji usmjeravaju fermentaciju prema pojačanoj proizvodnji butirata (Neubauer i sur., 2018b) te djeluju na povećanje broja mikroorganizama koji koriste laktat (Ballcels i sur. 2012). Nadalje, puferi su stalno u uporabi u mliječnih krava, i to već nekoliko desetljeća, pa njihova učinkovitost u kontroli pH vrijednosti nije upitna. Bikarbonati ometaju rast populacije laktobacila te na taj način preveniraju dodatno snižavanje pH vrijednosti (Garry, 2002). Puferi se mogu koristiti u raznim dozama i kombinacijama, ali općenito imaju samo sporednu ulogu u kontroli pH buraga (Krause i Oetzel, 2006).

Tablica 1. Učestali problemi u hranidbi mliječnih krava koji dovode do nastanka SARA te moguća rješenja (prilagođeno iz Enemark i sur., 2002; Enemark, 2008).

Razdoblje	Problem	Korekcija	Učinak
Tranzicija	Prijelazni period kraći od 4 tjedna	Osigurati postepeni prijelaz od 4-6 tjedana	Optimalan razvoj stijenke i mikropopulacije buraga
	Preintenzivan preijelazni period	Maksimalno povećanje koncentrata od 0,25 kg/dan	Umjereno stvaranje NMK i laktata
	Samo jedan TMR obrok za suhostaj i laktaciju	Formulirati obroke za skupine krava u pojedinoj fazi proizvodnog ciklusa	Energetska vrijednost obroka prilagođena resorptivnoj sposobnosti mukoze buraga
Laktacija	Pogreške u opskrbi hranjivim tvarima (ST, NEL, NDV)	Otkrivanje i kontrola problema (kontrola vlage, uzorkovanje na hranidbenom stolu, precizno vaganje)	Stabilnost buraga (dobar odnos laktogenih i laktolitičkih bakterija)
	Žitarice previše usitnjene, pahuljičene, ekstrudirane ili vlažne	Procjena veličine čestica žitarica	Smanjena brzina fermentacije u buragu
	Obroci s visokim DCAB koji potiču smanjenje pH buraga	Dodatak pufera u obrok, stimulacija žvakanja i kontrakcija buraga (7% vlakana >3,5 cm), 27–30% NDV (70–80% od voluminoze za adekvatnu razinu fuNDV), 35–45% ST kao NVU	Puferiranje buragovog sadržaja direktno ili preko pojačanog lučenja sline
	Više od 15% dugačkih čestica u voluminozi (pojačava prebiranje)	Analiza uzoraka s hranidbenog stola i procjena hranidbenog prostora	Optimalna veličina čestica smanjuje prebiranje, a dovoljno hranidbenog prostora sprječava hranjenje te uzimanje prevelikih obroka
	Pretjerano miješanje i usitnjavanje TMR (presitne čestice i mala količina fuNDV)	Kontrola vremena miješanja TMR i kalibracija vaga	Homogeni obrok koji osigurava optimalnu fermentaciju u buragu

Zaključci

U suvremenoj proizvodnji mlijeka cilj je hraniti maksimalnim količinama koncentrata zbog bolje mliječnosti i profitabilnosti. Takav pristup u mliječnim stadima često ima za posljedicu nastanak SARA, koja dugoročno narušava zdravlje, plodnost i proizvodnost visoko mliječnih grla. Najvažniji faktori u prevenciji SARA su formulacija i prezentacija obroka te kvalitetan menadžment hranidbe. Mliječna stada treba kontinuirano pratiti na više razina kako bi se što prije prepoznale oboljele životinje i spriječile ekonomske štete, koje proizlaze iz tog poremećaja. Preporuke za hranidbu rizičnih skupina mliječnih krava postoje, ali ne garantiraju da osjetljivije životinje neće oboljeti, i to ponajviše zbog činjenice da je obrok koji je formuliran često značajno različit od onoga koji krava uistinu pojede. Trenutno ne postoji jedinstvena metoda za dijagnostiku SARA, a praćenje bolesti je zahtjevno zbog potrebe da se kontinuirano mjeri pH vrijednost tekućine u buragu.

Literatura

- 1.Allen, M. S. (1997): Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447–1462. 2.Allen, M. S. (2000): Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83: 1598–1624. 3.Andersen, P.H. (2000): Bovine endotoxemia: aspects of relevance to ruminal acidosis. *Dr.Vet. Sci. Thesis*, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark. 4.Antanaitis, R., V. Žilaitis, A. Kučinskas, V. Juozaitienė, K. Leonauskaitė (2015): Changes in cow activity, milk yield, and milk conductivity before clinical diagnosis of ketosis, and acidosis. *Veterinarija ir Zootechnika* 70 (92) 3–9. 5.Aschenbach, J.R., G.B. Penner, F. Stumpff, G. Gäbel (2011): Ruminant Nutrition Symposium: Role Of Fermentation Acid Absorption In The Regulation Of Ruminant Ph. *J. Animal Sci.* 89, 1092–1107. 6.Balcells J., A. Aris, A. Serrano, A. R. Seradj, J. Crespo, M. Devant (2012): Effects Of An Extract Of Plant Flavonoids (Bioflavex) On Rumen Fermentation And Performance In Heifers Fed High-Concentrate Diets. *J. Anim Sci.* 90 (13) 4975–4984. 7.Chamberlain, T., J. M. Wilkinson (1996): Manipulating The Composition Of Milk In: Feeding The Dairy Cow. Chalcombe, Usa. 129-138. 8.Chaucheyras-Durand F.W., N. D. Walker, A. Bach (2008): Effects Of Active Dry Yeasts On The Rumen Microbial Ecosystem: Past, Present And Future. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145: 5–26. 9.Devries, T.J., M.A. Von Keyserlingk, K.A. Beauchemin (2005): Frequency Of Feed Delivery Affects The Behavior Of Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 88: 3553–3562. 10.Dieho, K., J. Dijkstra, G. Klop, J. Schonewille, A. Bannink (2017): Changes In Rumen Microbiota Composition And In Situ Degradation Kinetics During The Dry Period And Early Lactation As Affected By Rate Of Increase Of Concentrate Allowance. *J. Dairy Sci.* 100: 2695–2710. 11.Enemark, J.M.D., R.J. Jørgensen, P.S. Enemark (2002): Rumen Acidosis With Special Emphasis On Diagnostic Aspects Of Subclinical Rumen Acidosis: A Review. *Veterinarija Ir Zootechnika.* 20 (42): 16-29. 12.Enemark, J. M. D. (2008): The Monitoring, Prevention And Treatment Of Sub-Acute Ruminant Acidosis (Sara): A Review. *Vet. J.* 176: 32–43. 13.Falk M., A. Munger, F. Dohme-Meier (2016): Technical Note: A Comparison Of Reticular And Ruminant Ph Monitored Continuously With 2 Measurement Systems At Different Weeks Of Early Lactation. *J. Dairy Sci.* 99(3): 1951–5. 14.Fulton, W.R., T.J. Klopfenstein, R.A. Britton (1979): Adaption To High Concentrate Diets By Beef Cattle. Adaption To Corn And Wheat Diets. *J. Animal Sci.* 49: 785–791. 15.Gao, X., M. Oba (2015): Short Communication: Noninvasive Indicators To Identify Lactating Dairy Cows With A Greater Risk Of Subacute Rumen Acidosis. *J. Dairy Sci.* 98: 5735–5739. 16.Garrett, E. F. (1996): Subacute Rumen Acidosis. In: *Large Animal Veterinarian*, X: 6–10. 17.Gozho, G.N., D.O. Krause, J.C. Plaizier (2007): Ruminant Lipopolysaccharide Concentration And Inflammatory Response During Grain Induced Subacute Ruminant Acidosis In Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90: 856–866. 18.Garry, F. B. (2002): Indigestion In Ruminants. U: *Large Animal Internal Medicine*. 3rd Ed. B.P. Smith, Ed. Mosby, St. Louis, Mo. Pp.722–747. 19.Griinari, J.M., D.A. Dwyer, M.A. Mcguire, D.E. Bauman, D.L. Palmquist, K.V. Nurmela (1998): Trans-Octadecenoic Acids And Milk Fat Depression In Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 81: 1251–1261. 20.Heinrichs, J., P. Kononoff (2002): Evaluating Particle Size Of Forages And Tmrs Using The New Penn State Forage Particle Separator. Pp 1–15. 21.Humer, E., R.M. Petri, J.R. Aschenbach, B.J. Bradford, G.B. Penner, M. Tafaj, K.H. Südekum, Q. Zebeli (2018): Invited Review: Practical Feeding Management Recommendations To Mitigate The Risk Of Subacute Ruminant Acidosis In Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 101:1–17. 22.Kahn, C. M. (2005): Subacute Ruminant Acidosis. U: *The Merck Veterinary Manual* IX Edition. Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, N. Y., U. S. A. Pp. 181-183. 23.Keunen, J. E., J. C. Plaizier, L. Kyrazakis, T. F. Duffield, T. M. Widowski, M. I. Lindinger, B. W. McBride (2002): Effects Of A Subacute Ruminant Acidosis Model On The Diet Selection Of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 85: 3304–3313. 24.Keunen, J.E., J.C. Plaizier, L. Kyrazakis, T.F. Duffield, T.M. Widowski, M. I. Lindinger, B. W. McBride (2003): Short Communication: Effects Of A Subacute Ruminant Acidosis On Free-Choice Intake Of Sodium Bicarbonate In Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 86: 954–957. 25.Khafipour, E., D.O Krause, J.C. Plaizier (2007): Induction Of Subacute Ruminant Acidosis (Sara) By Replacing Alfalfa Hay With Alfalfa Pellets Does Not Stimulate Inflammatory Response In Lactating Dairy Cows. *J. Animal Sci.* 85: 654 – 659. 26.Kleen, J.L., G.A. Hooijer, J. Rehage, J.P.T. Noordhuizen (2003): Subacute Ruminant Acidosis (Sara): A Review. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50: 406–414. 27.Kleen, J.L. (2004): Prevalence Of Subacute Ruminant Acidosis In Deutch Dairy Herds-A Field Study. Ph.D. Thesis. School Of Veterinary Medicine Hanover, Pp. 93–104. 28.Krause K. M., Oetzel

G. R. (2005): Inducing Subacute Ruminal Acidosis In Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 88(10): 3633–9.

29. Krause, K., G. Oetzel (2006): Understanding And Preventing Subacute Ruminal Acidosis In Dairy Herds: A Review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126: 215–236.

30. Kröger, I., E. Humer, V. Neubauer, N. Kraft, P. Ertl, Q. Zebeli (2016): Validation Of A Noseband Sensor System For Monitoring Ruminating Activity In Cows Under Different Feeding Regimens. *Livestock Sci.*, 193: 118–122.

31. Li, S., G. Gozho, N. Gakhar, E. Khafipour, D. Krause, J. Plaizier (2012): Evaluation Of Diagnostic Measures For Subacute Ruminal Acidosis In Dairy Cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 92, 353–364.

32. Li, S., A.M. Danscher, J.C. Plaizier (2013): Subacute Ruminal Acidosis (SARA) In Dairy Cattle: New Developments In Diagnostic Aspects And Feeding Management. *Can. J. Anim. Sci.* 94 (1): 353–364.

33. McCann, J. C., S. Luan, F.C. Cardoso, H. Derakhshani, E. Khafipour, J. J. Looor (2016): Induction Of Subacute Ruminal Acidosis Affects The Ruminal Microbiome And Epithelium. *Front. Microbiol.* 7: 701.

34. Mialon M. M., V. Deiss, S. Anderson, F. Anglard, M. Doreau, I. Veissier (2012): An Assessment Of The Impact Of Rumencentesis On Pain And Stress In Cattle And The Effect Of Local Anaesthesia. *Vet. J.* 194(1): 55–59.

35. Neubauer, V., E. Humer, I. Kröger, A. Meissl, N. Reisinger, Q. Zebeli, (2018a): Changes Of Ruminal Mucosa Thickness Measured By Transabdominal Ultrasound As Non-Invasive Method To Diagnose Subacute Ruminal Acidosis In Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* Vol. 101: 2650–2654.

36. Neubauer, V., R. Petri, E. Humer, I. Kröger, E. Mann, N. Reisinger, M. Wagner, Q. Zebeli (2018b): High-Grain Diets Supplemented With Phytochemical Compounds Or Autolyzed Yeast Modulate Ruminal Bacterial Community And Fermentation In Dry Cows. *J. Dairy Sci.* 101: 2335–2349.

37. Nocek, J. E. (1997): Bovine Acidosis: Implications On Laminitis. *J. Dairy. Sci.* 80: 1005–1028.

38. Nogami, H., S. Arai, H. Okada, L. Zhan, T. Itoh (2017): Minimized Bolus-Type Wireless Sensor Node With A Built-In Three-Axis Acceleration Meter For Monitoring A Cow's Ruminal Conditions. *Sensors (Basel)*, 17(4): 687.

39. Nordlund, K. V., E. F. Garrett, G. R. Oetzel (1995): Herd-Based Rumencentesis-A Clinical Approach To The Diagnosis Of Subacute Ruminal Acidosis. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 17: 48–56.

40. Oetzel, G. R. (2007): Subacute Ruminal Acidosis In Dairy Herds: Physiology, Pathophysiology, Milk Fat Responses And Nutritional Management. In: *Am. Assoc. Bovine Pract. 40th Annual Conference.* Vancouver, BC: University Of Wisconsin, Madison. Pp. 89–119.

41. Oetzel, G. R. (2017): Diagnosis And Management Of Subacute Ruminal Acidosis In Dairy Herds. *Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Pract.* 33: 463–480.

42. O'Grady, L., M.L. Doherty, F.J. Mulligan (2008): Subacute Ruminal Acidosis (SARA) In Grazing Irish Dairy Cows. *Vet. J.* 176: 44–49.

43. Plaizier, J.C., D.O. Krause, G.N. Gozho, B.W. McBride (2008): Subacute Ruminal Acidosis In Dairy Cows: The Physiological Causes, Incidence And Consequences. *Vet. J.* 176: 21–31.

44. Rezac, D.J., D.U. Thomson, M.G. Siemens, F.L. Prouty, C. D. Reinhardt, S. J. Bartle (2014): A Survey Of Gross Pathologic Conditions In Cull Cows At Slaughter In The Great Lakes Region Of The United States. *J. Dairy Sci.* 97: 4227–35.

45. Roche, J.R., A.W. Bell, T.R. Overton, J. L. Looor (2013): Nutritional Management Of The Transition Cow In The 21st Century—A Paradigm Shift In Thinking. *Anim. Prod. Sci.* 53: 1000–1023.

46. Stefańska, B., W. Nowak, J. Komisarek, M. Taciak, M. Barszcz, J. Skomial (2017): Prevalence And Consequence Of Subacute Ruminal Acidosis In Polish Dairy Herds. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101 (4): 694–702.

47. Stone, W.C. (2004): Nutritional Approaches To Minimize Subacute Ruminal Acidosis And Laminitis In Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 87: 13–26.

48. Strabel, D., A. Ewy, T. Kaufmann, A. Steiner, M. Kirchhofer (2007): Rumencentese: Eine Geeignete Methode Zur Ph-Bestimmung Im Pansen? *Schweizer Archiv Tierheilkunde* 149: 301–307.

49. Zebeli, Q., B.U. Metzler-Zebeli (2012): Interplay Between Ruminal Digestive Disorders And Diet-Induced Inflammation In Dairy Cattle. *Res. Vet. Sci.* 93 (3): 1099–1108.

50. Zebeli, Q., J.R. Aschenbach, M. Tafaj, J. Boghun, B.N. Ametaj, W. Drochner (2012): Invited Review: Role Of Physically Effective Fiber And Estimation Of Dietary Fiber Adequacy In High-Producing Dairy Cattle. *J. Dairy. Sci.* 95: 1041–1056.

THE USE OF PROBIOTICS TO ENHANCE ANIMAL PERFORMANCE

Shivani Katoch¹, Dragan Šefer²

¹Department of Animal Nutrition, DGCN College of Veterinary & Animal Sciences
CSK Himachal Pradesh Agriculture University, Palampur-176062, India.

²Department of Nutrition and Botany, Faculty of Veterinary medicine, University of Belgrade

Use of nutritionally well-balanced and efficient feeding is vital for economic poultry production to ensure maximum output with minimum input. More profit is the primary concern of an economical enterprise and poultry industry is no exception. Digestive efficiency in chicken can be enhanced by incorporating suitable additives to their diets, like growth promoters, fed enzymes and probiotics. Shortly after the discovery of antibiotics, it was found that sub therapeutic levels of these life saving drugs could increase feed efficiency and growth in food animals. Hence, the widespread addition of various antibiotics to feed for livestock was initiated. At present, it has led to the concerns of antimicrobial resistance and there is much of good research to support this fact due to which many countries have banned its use as growth promoters in poultry and other food animals.

In the post antibiotics ban era, there is a need to look for alternatives, which can safely and efficiently replace antibiotics as growth promoters in poultry. Variety of growth promoters have come up in this category, which could improve production and reduce the disease incidence in poultry. The application of direct fed microbial and other non-conventional feed additives have since increased to meet the demand for using more “natural” growth promoting substances. In this background, probiotics or direct fed microbial are therefore much in demand and have been accepted as an alternative feed additives for economic poultry production.

Probiotics: Under normal circumstances beneficial and harmful bacteria are present in the intestine which continuously affect and influence the activity of each other. These findings led to the “probiotic” concept, originally used to describe microbial feed supplements which stimulate the growth of farm animals as well as human. Many definitions of probiotics have been published, starting from Fuller, who defined a probiotic “a live microbial feed supplement which beneficially affects the host by improving its intestinal microbial balance”. A more recent one from FAO/WHO is: “Live microorganisms that when being administered in appropriate dose, they confer a benefit of health to the receiver.” The concept behind probiotics was introduced in the early 20th century, when Nobel laureate E. Metchnikoff (1908), known as the “father of probiotics,” proposed that consuming beneficial microorganisms could improve people’s health. The term probiotic is derived from the Latin preposition “pro,” which means “for” and the Greek word “biotic” meaning “bios” or “life”. The term was originally used to describe substances produced by one microorganism that stimulated the growth of others and was later used to describe tissue extracts that stimulated microbial growth and animal feed supplements exerting a beneficial effect on animals by contributing to their intestinal flora balance (Fuller 1989). The terms direct-fed microbials and probiotics are used interchangeably.

The genera most commonly used in probiotic preparations are *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, and *Lactococcus* and some fungal strains. Single and mixed cultures of live microorganisms are used in probiotic preparations

In the natural environment, the intestinal tract of chickens is colonised by a broad range of micro organisms at a very early age of the birds. By far the most typical source of the intestinal flora is the unsterile surface of the egg, resulting from contact with the hen in the nest. In commercial operations, however, the colonisation of the intestinal tract is a more prolonged process due to the high hygienic standard in the hatcheries and the lack of contact with the natural environment. It takes around 21 days for broilers to develop a balanced intestinal flora, and this period represents around 50% of a broiler’s life.

Unfortunately, the later the intestinal tract is colonised, the more vulnerable the intestinal ecosystem will be to pathogenic organisms. After the first 21 days, other challenges such as stress, feed changes, antibiotic interventions, and disease can upset the gastro-intestinal tract (GIT) flora and cause considerable losses.

Conventional solutions to protect the young birds typically involve feeding sub-therapeutic doses of pharmaceutical-type antibiotics. Direct-fed microbial or probiotic products consisting of natural sources of beneficial micro organisms already are available to help maintain the balance of the intestinal micro flora in a range of food animal species. Now much of the research and development is on poultry, where the challenges can be distinct from other species. However, recent trials under farm conditions suggest that probiotics with consistent efficacy are going to provide a reliable solution for managing the balance of the gastro-intestinal flora in commercial broilers.

Microbial species with applications as probiotics

There are many microorganisms which fall in the category of probiotics according to the definition given by world health organisation, WHO (2001). The most common types of microorganisms used as probiotics are lactic acid bacteria and *bifidobacteria*, although other bacteria and certain yeasts are also used (Didari et al. 2014). Katoch et al. (2011) conducted a trial to study comparative dietary response of the different strains of the *lactobacilli*, *lactococci* and yeast isolated from indigenous sources as probiotics in the commercial egg type chicken. It was concluded that *Lactobacillus plantarum* isolated from carrot seemed to be a new promising probiotic for the commercial chick production. Lactic acid bacteria are gram-positive, catalase-negative bacterial species able to produce lactic acid as main end-product of carbohydrate fermentation (Hayek and Ibrahim 2013). The genus *Lactobacillus* are a major part of the lactic acid bacteria (LAB) group (including *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* and *Leuconostoc* species). The genus *Bifidobacterium* includes various gram positive non-motile anaerobic bacteria (Klijn et al. 2005). Other genus used as probiotics in animals including poultry are *Sacchromyces*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Bacillus*. Many commercial products use multi-strain probiotics, although the benefits of using more than one strain or species in a single product has not been clearly established (Zhao et al. 2013).

What makes a microbe to behave as probiotic?

In general terms, a group of requirements have been identified as important properties for direct fed microbials to be effective probiotic organisms. These include the ability to (i) adhere to cells; (ii) exclude or reduce pathogenic adherence; (iii) persist and multiply; (iv) produce acids, hydrogen peroxide, and bacteriocins antagonistic to pathogen growth; (v) be safe and therefore noninvasive, non-carcinogenic, and nonpathogenic; and (vii) coaggregate and form a normal, balanced flora. While the expression of the factors listed above is likely important for probiotic activity, it is not easy to grade the extent to which any given property is essential or of greatest importance in vivo. It seems that adherence and expression of some antagonistic activity against pathogens, whether it be against their adhesion, growth, or ability to dominate the flora, are the most critical factors, but that fact does not exclude other properties.

Probiotic supplements should have a guaranteed shelf life such that they will contain adequate numbers of viable organisms at the time of ingestion (Kopp-Hoolihan 2001). The capacity to tolerate an acidic environment and bile varies among strains (Mishra and Prasad 2005). Another desirable characteristic is the ability to adhere to the intestinal epithelium, enabling the probiotic strain(s) to colonize the intestine (Guarner and Schaafsma 1998). In addition, ability to grow rapidly on inexpensive media is a requisite for economically viable production. According to Kabir (2009), in order to fit the criteria as functional probiotic for poultry production, the bacteria must possess the following desirable traits: the bacteria must be a gut inhabitant, it must be able to adhere to the intestinal epithelium and withstand harsh condition such as high acidity environment in stomach and tolerance to bile salts in the intestines, and competes against other gut microorganisms for colonization in the gastrointestinal tract, as well as able to exert beneficial effects in host and maintain high viability under normal storage condition and after industrial processes such as lyophilisation.

Improving gut microbiota

Maintaining gut health in animals, particularly in the context of antibiotic growth promoters being gradually phased out, through the manipulation of diet is crucial to maintain or improve the performance of production animals (Choct 2009). Probiotics can change the microbial population dynamics in the gastro intestinal tract eventually creating a more favourable microbial population due to a shift in the balance of beneficial and harmful microbes (Mountzouris et al. 2007, 2009). Healthy microbial populations in the gastro intestinal tract are often associated with enhanced animal performance, reflecting more efficient digestion and improved immunity (Niba et al. 2009). Probiotics help in increasing the number of beneficial microbes and decreasing the number of harmful or pathogenic microbes in the gut. The inhibition of pathogen by probiotics is suggested to occur via competition for adherence site on the intestinal wall and nutrient as well as production of antimicrobial compounds (Patterson and Burkholder 2003). The most common modulation of the gastro intestinal tract microflora by probiotics (for example in chickens) is an increase in the populations of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* (Landy and Kavyani 2013; Mookiah et al. 2014). The reduction in pathogenic micro-organisms in the gastro intestinal tract may be attributable to the production of antimicrobial substances such as bacteriocins (Shim et al. 2012) and adhesion of the probiotic microbes to the intestinal epithelium, thereby excluding pathogens competitively or by inducing immune system response. *Lactobacillus* adheres to the ileal epithelial cells of chickens (Jin et al. 1996). This may competitively exclude pathogenic micro-organisms from the gastro intestinal tract (Mookiah et al. 2014). Colonization of probiotic *Lactobacillus* strains has been demonstrated to have a preventive function against *Salmonella enterica serovar enteritidis* infection in chicken (E. Van Coillie et al. 2007). Similarly, bacteriocins produced by probiotic *Escherichia coli* strain have been shown to greatly reduce *Salmonella* contamination in poultry industry (Stern et al. 2006). Bacteriocin produced by lactic acid bacteria (for example Nisin) inhibits the growth of pathogenic micro-organisms by inhibiting cell wall synthesis, with the formation of pores in the bacterial surface (Wiedemann et al. 2001; Hassan et al. 2012). To achieve this, the bacteriocin binds the cell wall precursor, lipid II, forming a complex which can form a pore in the bacterial cell membrane leading to the death of the bacterium (Wiedemann et al. 2001; Bierbaum and Sahl 2009). In addition, these bacteria produce short chain fatty acids (SCFAs) such as acetic and lactic acid, which can inhibit harmful microbes in the GIT (Watkins, Miller and Neil, 1982; Jin et al. 1996; Mookiah et al. 2014). SCFAs reduce the pH in micro-environments within the intestinal lumen and can then be taken up by gastro intestinal tract (GIT) microbes in broiler chickens, reducing their intracellular pH to a lethal level for some bacteria (Daskiran et al. 2012).

How do the probiotics exert their effect?

Altogether, there is an increasing evidence that probiotics when given as direct fed microbial have an overall beneficial effect on the general well being of the man and the animal. The concept of using probiotics in animals and birds as growth promoters and for disease treatment and prevention as well as health restoration and maintenance is not new. Probiotic bacteria, including *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*, have been shown to enhance antibody responses in mammals. But the question arises as to how the beneficial effect is exerted. Various theories have been put forward advocating its role in aiding the digestion of food material in the GIT to modulating the immunological behavior which has been well accepted

The mode of action of probiotics in poultry includes (i) maintaining normal intestinal microflora by competitive exclusion and antagonism; (ii) altering metabolism by increasing digestive enzyme activity and decreasing bacterial enzyme activity and ammonia production; (iii) improving feed intake and digestion; and (iv) neutralizing enterotoxins and stimulating the immune system (Jin et al. 1997). Probiotics have various mechanisms of action although the exact manner in which they exert their effects is still not fully elucidated. These range from bacteriocin and short chain fatty acid production, lowering of gut pH, and nutrient competition to stimulation of mucosal barrier function and immunomodulation. The latter in particular has been the subject of numerous studies and there is considerable evidence that probiotics influence several aspects of the acquired and innate immune response by inducing phagocytosis and Immunoglobulin A secretion, modifying T-cell responses, enhancing Th1 responses, and attenuating Th2 responses (Isolauri et al. 2001). Although probiotics are

being promoted as a substitute for AGP (Antimicrobial growth promoters), the mechanism of action of these feed additives appears to be different (Fajardo et al. 2012). Probiotics help to prevent and control gastro-intestinal pathogens and/or improve the performance and productivity of production animals through various mechanisms. Major mechanisms of action proposed for probiotics are considered in the following sections:

Immune enhancement

Probiotics stimulate the immunity of the chickens in two ways (a) flora from pro biotic migrate throughout the gut wall and multiply to a limited extent or (b) antigen released by the dead organisms are absorbed and thus stimulate the immune system (Havenaar and Spanhaak 1994). It has been found that probiotics increase the cellularity of Peyer's patches in the ileum which indicates stimulation of immune system of intestine which respond to bacteria by secreting antibody immunoglobulin A. In addition immune-stimulation is also brought about by increasing macrophage and lymphocyte activity.

The gut and its resident microbiota play a pivotal role in shaping the immune system repertoire. Germfree animals have less developed gut-associated lymphoid tissue (GALT), but gut colonization in these animals by members of commensal gut microbiota results in the enhancement and diversification of the antibody-mediated immune response. The lamina propria of the gut contains a large population of immunoglobulin A (IgA)-producing plasma cells, while germfree animals possess a very small number of these cells. Commensal bacteria present in gut microbiota are in close contact with cells of the immune system. It has recently been demonstrated that resident dendritic cells (DC) in the gut lamina propria have the capacity to directly sample the gut lumen by projecting their dendrites through the tight junctions of epithelial cells. Commensal bacteria may also share molecular patterns recognized by *toll-like receptors*, which can recognize patterns associated mainly with pathogens. The recognition of commensal bacteria or their structural components by Toll-like receptors (TLR) present on the surfaces of DC could lead to the activation and maturation of these cells. Differential activation of DC by commensal bacteria promotes the establishment of T-helper 1 (Th1), Th2, and Th3 responses and the secretion of cytokines, some of which are important for antibody production and isotype switching. At least three different routes exist for the uptake of luminal antigens: dendritic cells, specialized M cells from the Peyer's patches, and individual M cells found in the villous epithelium. The anatomical location of the immune cells from the innate response (macrophages and dendritic cells) and the way by which these cells acquire antigens are crucial in determining the nature of the subsequent responses. Thus, the immune response induced can be the result of uptake of antigens by transepithelial sampling involving dendritic cells or by dendritic cells present in the lamina propria of the intestine or by M cells from Peyer's patches or from the intestinal villous.

There is scientific evidence that the uptake of nonpathogenic bacteria or their fragments by macrophages or dendritic cells in the lamina propria is possible through direct sampling of luminal antigens for dendritic cells, through TLRs and the CD-206 mannose receptor. These bacteria can be cleared or transported to the mesenteric lymph nodes, where they interact with T and B cells to induce specific mucosal IgA or suppress T cells.

Viability of probiotic to be effective: It was previously thought that to have an effect on the immune system, the probiotic strains must remain viable, but this fact is true only for some strains. For *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, viability is not necessary for the induction of positive cells producing cytokines, although the number of positive cells was comparatively lower than the number obtained with viable *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* organisms. The viability is critical for determining the time of residence in the gut with differences between viable and nonviable probiotic bacteria administration; nonviable bacteria are cleared more rapidly. Probiotic bacteria must remain in the gut at least 48 to 72 h to be effective; that is the time required for any particulate antigen to induce gut immunostimulation. This fact is very important, indicating the importance of daily administration in a dose established for each probiotic bacterium to have an adjuvant effect without the induction of oral tolerance.

Secretion of antibiotic like substances

Lactic acid bacteria produce several bactericidal or antibiotic like substances, which have been found effective against enteric pathogens. Probiotic bacteria produce a class of antimicrobial molecules that are collectively known as *bacteriocins* (Gregor et al. 2002). *Lactobacilli* have been reported to

produce antibacterial proteins and bacteriocins. These bacteriocins can kill pathogenic bacteria and prevent colonization actions. Some non-bacteriocin compounds are also produced by probiotics, which kill pathogens Madsen (2001).

Acid productions and lowering of pH in GIT

The lactic acid bacteria produce organic acids such as lactic acid and acetic acid, which results in lowering of pH. These organic acids are toxic for undesirable micro flora in intestine. (Ramesh *et al.* 2000) reported that birds fed *L. acidophilus* showed a lowered surface pH in the duodenum, jejunum, ileum and caecum. Similarly (Endo and Nakano 1999) found that probiotics decreased the pH value of caecal contents and increased the acetic acid concentration.

The toxicity of these organic acids produced is increased at low pH (upper part of GIT) as the disassociated forms of these organic acids have better penetration into the bacterial cells.

Digestion and absorption

DFM or probiotics have positive effect on physiological and anatomical functions of gastro intestinal tract. Probiotics or direct fed microbial increase the absorption of the metabolic end products such as lactate, succinate and the short chain volatile fatty acids (SCVFA), acetate propionate and butyrate as well as bacterial biomass. Most of the VFA formed by intestinal bacteria are absorbed and metabolized by the birds thus contributing to host energy requirements. These short chain fatty acids also affect the mineral absorption by increasing its solubility. Thus probiotics improve mineral bioavailability and have a positive effect on bone mineral density and mineral content (Kruger *et al.* 2009).

The trophic effects of probiotics include increase in the specific and total activities of the brush-border membrane enzymes in the jejunal enterocytes. Improved digestibility of nutrients and metabolizable energy of diets has been reported with the administration of probiotics in diet. (Jin *et al.* 2000) reported that supplementation of *Lactobacillus* cultures to chicken, increased the levels of amylase in the small intestine.

Probiotics also affect the anatomical functions of gastro intestinal tract. Whether probiotics supplementation increases intestinal length and weight is an issue which requires further investigations. (Ahmad 2004) reported increase of crypt cells proliferation of small intestines with the use of probiotics. (Sonmez and Eren 1999) reported that ileal villus height increases by supplementation of probiotics.

Growth stimulation and feed conversion ratio

The benefits of feeding probiotics to poultry include improved utilization of proteins, intestinal tract health, feed conversion ratio, strengthen beneficial microbial populations and suppress harmful bacterial growth in the digestive system, counteract adverse effect of antibiotics, nutrient synthesis, stimulate immune system, decreased diarrhoea and mortality. Jadhav *et al.* (2015) Further, it improves the feed intake, feed conversion ratio, body weight, lowers cholesterol in blood, serum and meat, increase the tenderness and meat quality along with carcass yield. So that feeding probiotics in broiler chicken is highly beneficial for economic production of poultry.

Various studies concerning the supplementation of probiotics to broiler diet have been consistent to report improved body weight gain in broilers and also improve general health of chicks (Lyons and Chapman, 1989; Buche *et al.*, 1992; Holoubek, 1993; Sharma and Katoch, 1996; Ghabdan, 1998), though many have reported conflicting reports as far as the effect of probiotics on weight gain is concerned. (Roth and Kirchgessner 1986) noted that probiotics supplementation (*Streptococcus faecium* M 74) did not affect live weight, but had a significant effect on the performance of broiler chicks. Contradictory to this, many scientists have reported that probiotics fed chicken had better growth and weight than control groups (Mohan *et al.* 1996). (Pietras *et al.* 2001) reported that the inoculation of chickens with *Lactobacillus rhamnosus* bacteria has a positive effect on growth performance.

Katoch *et al.* (1996) supplemented different probiotics in broiler diet and observed improvement in body weight gain in the range of 1063.47g to 1213.28g against 961.85g in control. Kaistha *et al.* (1996) reported that dietary supplementation of three isolates of microbes i.e. *Lactobacillus acidophilus* (Bottle gourd), *Streptococcus uberis* (Bitter gourd) and *Saccharomyces cerevisiae* (Bitter gourd) vis-à-vis their respective standard strains *L.bulgaricus* (L4), *S. lactis* (S1) and *Saccharomyces cerevisiae* (Y3) did not have any effect on the biological performance of the broilers during starter phase.

however during finisher phase, all the treatment showed significant ($P \leq 0.05$) improvement in weight gain. Whereas Katoch et al. (1996) reported significantly ($P \leq 0.05$) better growth performance of broilers while fed Y3 strain of *Saccharomyces cerevisiae* during 1-6 weeks age. Katoch et al. (2000) conducted an experiment to study the effect of different strains of microbes isolated from leopard (*Panthera leo*) excreta on the performance of chicks of different strains. It was found that all the combinations of microbes gave significantly higher ($P < 0.05$) gain in weight only in vancobb strain of broiler as compared to control. Katoch et al. (2013) found that supplementation of isolated DFM has the potential to improve biological growth performance of poultry broiler birds offered both standard formulated diet as well as mineral deficient diet.

Anti-cholesterol effect

Several Direct Fed Microbial have shown to be capable of hydrolyzing bile acids. This prevents its reabsorption from intestine. Bile acids are formed from cholesterol in the liver and, therefore, any increase in elimination of bile acids from body would increase the rate of conversion of cholesterol to bile acids. This eventually is supposed to decrease the level of cholesterol to blood. Many research findings have shown that probiotics decrease the cholesterol content in meat as well as serum. Studies show that probiotic-supplemented broiler chickens have lower total cholesterol, VLDL cholesterol and triglyceride concentrations in the serum. (Mohan *et al.* 1996). (Pietras *et al.* 2001) reported that the meat of chickens supplemented with probiotic for the whole period of rearing had significantly higher protein content, while their crude fat and total cholesterol contents tend to decrease.

PROBIOTICS AND HEALTH

The most commonly consumed probiotics are fermented dairy products such as yogurt and buttermilk. Probiotic therapy is not a new idea; it dates back almost 100 years to Elie Metchnikoff, who suggested that Bulgarian peasants lived longer lives because of their yogurt consumption. In the 1930s, a Japanese physician, Minoru Shirota, suggested that the right mix of bacteria in the gut could prevent disease. Miso soup, made from fermented soybean paste, is a staple of the Okinawan diet. It has been suggested that disrupting the delicate balance in the gastrointestinal tract can contribute to diarrhea (antibiotic-associated diarrhea, traveler's diarrhea, intestinal infections), gastroenteritis, constipation, irritable bowel syndrome, inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis), food allergies, and certain cancers. On the contrary, a balanced or "normal" enteric flora may competitively exclude possible pathogenic organisms, stimulate the intestinal immune system, and produce nutrients and other substances such as short-chain fatty acids, vitamins, amino acids (arginine, cysteine, and glutamine), polyamines, growth factors, and antioxidants.

PROBIOTIC SUPPLEMENTATION STUDIES

Studies show that commercial probiotic consumption often increases specific intestinal microflora, but usually not the total count of bacteria found in the intestine. It is also evident in the majority of reported research cases that specific bacteria do not increase unless subjects consume very high dosages of probiotics in the form of supplements, not those naturally found in foods. One of the early double-blind, placebo-controlled studies (20 men; 10/group) utilizing a commercially available probiotic was conducted by Spanhaak and associates, who reported an increase in *Lactobacillus* count. Benno and Mitsuoka reported that *Bifidobacterium longum* administered as a pharmaceutical in adults resulted in higher fecal bifidobacterial and lower clostridial counts, lower fecal pH, and lower fecal ammonia concentrations. A study of 64 adults by Ling et al. showed that consumption of *Lactobacillus GG* resulted in higher fecal counts of *Lactobacillus GG*, decreased fecal beta-glucuronidase, nitroreductase, and glycocholic acid hydrolase activities.

Probiotics have been reported to treat three types of diarrhea: antibiotic-associated, traveler's, and infectious. The most common side effect of antibiotic therapy is diarrhea, which occurs in about 20% of patients due to a disruption in the balance of the endogenous flora in the colon. There have been several clinical trials attempting to determine the efficacy of administering probiotics to patients experiencing antibiotic-associated diarrhea. Three randomized, double-blind, controlled studies reduced the rate of occurrence of antibiotic-associated diarrhea using orally administered *Saccharomyces*

boulardii.

Traveler's diarrhea also occurs in about half of the people who travel to underdeveloped or high-risk countries, and can range from mild to severe. At least eight clinical trials have been conducted testing the use of orally administered probiotics to prevent traveler's diarrhea. A randomized study by Black and colleagues used a mixture of probiotic strains (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum*, and *S. thermophilus*) or a placebo to treat 94 Danish tourists traveling to Egypt for 2 weeks. The incidence of traveler's diarrhea in the tourists was reduced significantly from 71% (placebo group) to 43% (probiotic group). Infection with rotavirus is the most common cause of severe diarrhea in children, and probiotic therapy (Lactobacillus GG) has been shown to be effective in reducing the duration of rotavirus enteritis infection. A meta-analysis suggested that Lactobacillus is an effective treatment for children with acute infectious diarrhea.

Inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease and ulcerative colitis, is a significant health care problem of unknown etiology which affects 0.5% of the population in northern Europe. Despite the fact that our current understanding of the complexity of the intestinal flora is very limited, many studies have shown that not all bacterial species have equal activities in promoting or reducing intestinal inflammation. This evidence has led to a new concept in the therapy of IBD based on probiotic preparations which usually contain lactobacilli, bifidobacteria, or *Escherichia coli* strains.

Inflammatory bowel disease (IBD) encompasses intestinal inflammatory diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis. These diseases all result from unknown origins, but intestinal flora disturbances and a defective mucosal barrier have been hypothesized as contributing factors. Intestinal infections sometimes mimic IBD symptoms but disappear with antibiotic therapy. There have been several IBD animal studies using probiotics with promising results, however, only a few trials have been conducted in humans. A study involving 14 children with Crohn's disease receiving *L. rhamnosus* GG found an increase in immunoglobulin A immune response.

Probiotics have been found by several researchers to decrease fecal concentrations of enzymes and secondary bile salts, and reduce absorption of harmful mutagens that may contribute to colon carcinogenesis. Other studies suggest that normal intestinal flora can influence carcinogenesis by producing enzymes (glycosidase, B-glucuronidase, azoreductase, and nitroreductase) that transform precarcinogens into active carcinogens. Certain probiotics may protect the host from this activity. *L. acidophilus* and *L. casei* supplementation in humans helped to decrease levels of these enzymes, as shown by fecal specimens. In animal studies, the bacterial enzymes aforementioned have been suppressed with the administration of Lactobacillus GG. Other lactic acid bacteria have shown similar results; however, the relationship between enzyme activity and cancer risk needs further investigation. A randomized, controlled study by Aso and Akazan of 48 Japanese patients demonstrated that the recurrence of bladder tumors was delayed with daily intake of *L. casei*. They performed another study that was larger (125 patients) and placebo-controlled, and found that *L. casei* reduced the recurrence of tumors in all patients except those with more than one recurrent tumor. The hypothesis is that lactobacilli might bind mutagenic compounds in the intestine, which would reduce the absorption of these harmful mutagens.

CONCLUSION:

Economic poultry production envisages the use of optimally well balanced and efficient feeding. In this context there has been an increasing interest in the use of Probiotics which have been defined as a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance and when administered to animals in adequate amounts, benefit the host's health. The use of direct fed microbial and other non traditional feed additives has increased in response to demands for using more 'natural' growth promoting substances. Introduction of such probiotics is believed to prevent or attenuate the growth of clinical enteric pathogens in poultry, resulting in enhanced growth and performance of the host bird. This phenomenon has prompted a widespread interest in the poultry industry of probiotic usage as an alternative to the prophylactic use of antibiotics for the prevention of disease within poultry flocks. The mechanisms by which probiotics operate include spatial exclusion, immunological stimulation, micro-environmental alterations, production of antimicrobial substances and epithelial barrier integrity. Unfortunately, failure to consistently reproduce various

mechanistic changes in animal physiology and beneficial alterations in production parameters with the usage of probiotics has failed to result in a universal acceptance of the efficacy of these supplements amongst the poultry science community. A review of the scientific literature suggests that in general, alternative additives provide little consistent growth benefit. One of the reason could be the correct combination and concentration of gastrointestinal microflora which is determined by the nature and numerous interdependent variables. Changing one factor such as concentration and trying to optimize natures delicately balanced gastrointestinal environment may very well be altering affecting the efficacy of the probiotic. There is an increasing interest in the use of probiotics in several human and veterinary medical conditions, including diarrhea, gastroenteritis, irritable bowel syndrome inflammatory bowel disease and cancer all of which are suggested by certain research studies to improve with the use of probiotics.

REFERENCE

1. Ahmad, I., 2004. Effect of probiotic (Protexin) on the growth of broilers with special reference to the small intestinal crypt cells proliferation. M. Phil Thesis. Centre of Biotechnology, Univ. of Peshawar.
2. Bierbaum, G. & Sahl, H.-G. 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1): 2–18.
3. Buche AV, Gaffar MA, Kalbande VH and Deshmukh SV (1992). Influence of Indian Standards, Manak Bhavan, 9, Bahadur Zafar Marg, New Delhi-110002, India.
4. Choct M. Managing gut health through nutrition. *Br Poult Sci*. 2009 Jan;50(1):9-15. doi: 10.1080/00071660802538632.
5. Daskiran, M., Onol, A. G., Cengiz, O., Unsal, H., Turkyilmaz, S., Tatli, O. & Sevim, O. 2012. Influence of dietary probiotic inclusion on growth performance, blood parameters, and intestinal microflora of male broiler chickens exposed to posthatch holding time. *Journal of Applied Poultry Research*, 21(3): 612–622.
6. Didari T, Solki S, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M. 2014. A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf*. 2014 Feb;13(2):227-39. doi: 10.1517/14740338.2014.872627. Epub 2014 Jan 3.
7. ENDO Tsuyoshi NAKANO Masuo. 1999. Influence of a Probiotic on Productivity, Meat Components, Lipid Metabolism, Caecal Flora and Metabolites, and Raising Environment in Broiler Production. January 1999. *Nihon Chikusan Gakkaiho* 70(4):207-218. DOI: 10.2508/chikusan.70.207.
8. E. Metchnikoff, *Optimistic studies* New York: Putman's Sons, 1908, 161-183.
9. E. Van Coillie J. Goris I. Cleenwerck K. Grijspeerdt N. Botteldoorn F. Van Immerseel J. De Buck M. Vancanneyt J. Swings L. Herman M. Heyndrickx. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella* Enteritidis. 2007. *Journal of Applied Microbiology* Volume 102, Issue 4.
10. Fajardo Paula, I Lorenzo Pastrana, Jesús Méndez, Isabel Rodríguez, Clara Fuciños, and Nelson P. Guerra. 2012. Effects of Feeding of Two Potentially Probiotic Preparations from Lactic Acid Bacteria on the Performance and Faecal Microflora of Broiler Chickens. *Scientific World Journal*. 2012: 562635. Published online 2012 May 15. doi: 10.1100/2012/5626351.
11. FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*66:365–378.
12. Gregor Reid Sung O. Kim Gerwald A. Köhler. 2006. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Volume 46, Issue 2, 1 March 2006, Pages 149–157, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00026.x>.
13. Ghadban GS (1998). Investigation on the efficacy of early probiotic treatment on the performance of broiler chicks. *Proceedings of Xth European Poultry Conference, Israel II*: 859.
14. Guarner, F. and Schaafsma, G.J. (1998) Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 237-238. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00136-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00136-0).
15. Hassan, M., Kjos, M., Nes, I., Diep, D. & Lotfipour, F. 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(4): 723–736.
16. Havenaar R, Spanhaak S 1994. Probiotics from an immunological point of view. *Curr. Opin. Biotechnol* 5:320-325.
17. Holoubek J (1993). Influence of different biostimulators on growth and feed consumption of broiler fowls. *Sbornik Vysoke Skoly Zemedelelske v praze Fakulta Agronomika Rada B Zivocisna Vyrba*, 55: 211-220. (c.f. Darekar, 1996).
18. Isolauri E1, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity *Am J Clin Nutr*. 2001 Feb;73(2 Suppl):444S-450S. doi: 10.1093/ajcn/73.2.444s.
19. Jin, L., Ho, Y., Abdullah, N., Ali, M. &

- Jalaludin, S. 1996. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Letters in Applied Microbiology*, 23(2): 67–71. **20.** Jin, L. Z., Y. W. Ho, N. Abdullah, and S. Jalaludin. 1997. Probiotics in poultry: Modes of action. *World's Poult. Sci. J.* 53:352–368. **21.** Jin, L., Ho, Y., Abdullah, N. & Jalaludin, S. 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*, 79(6): 886–891. **22.** Jadhav K, Sharma KS, Katoch S, Sharma VK and Mane BG. 2015. Probiotics in Broiler Poultry Feeds: A Review. *Journal of Animal Nutrition and Physiology* 1: 04-16. **23.**
- Kaistha M, Katoch S, Meena K, Dogra KK, Sharma CR and Kumari. 1996. Effect of dietary supplementation of useful microbes isolated from *Luffa Cylindrica* and *Momordica Charantia* on the performance of broilers. *Indian Journal of Poultry Science* 3; 31: 156-162. **24.** Katoch S. 1996. Effect of dietary supplementation of microbes isolated from faecal material of Leopard (*Panthera leo*) on the performance of broilers. *Indian Journal of Animal Nutrition* 4; 13: 197-203. **25.** Katoch S, Kaistha M, Sharma KS, Kumari M and Katoch BS. 2000. Effect of different strains of microbes isolated from the leopard (*Panthera leo*) excreta on the performance of chicks of different strains. *Indian Journal of Poultry Sciences* 1; 35: 57-61. **26.** Katoch S, Sharma KA, Chahota R, Marković R and Sefer D. 2013. Performance of broiler chicken fed varied nutrient density diets supplemented with direct fed microbial. *Acta Veterinaria (Beograd)* 63: 5-6, 643-653. **27.** Klijn A, Mercenier A, Arigoni F. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2005 Aug;29(3):491-509. **28.** Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc.* 2001 Feb;101(2):229-38; quiz 239-41. **29.** Landy, N. & Kavyani, A. 2013. Effects of using a multi-strain probiotic on performance, immune responses and caecal microflora composition in broiler chickens reared under cyclic heat stress condition. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(4): 703–708. **30.** Lyons, T. P. and J. D. Chapman. 1990. Probiotics. In: *Nontraditional feed use in sources swine production*. (Ed. P. A. Thacker and R. N. Kirkwood). Butterworth Publishers, MA. pp. 315-326. **31.** Kruger, M.C., Fear, A., Chua, WH. et al. *Dairy Sci. Technol.* (2009) 89: 219. <https://doi.org/10.1051/dst/2009012>. **32.** Madsen KL. The use of probiotics in gastrointestinal disease *Can J Gastroenterol.* 2001 Dec;15(12):817-22. **33.** Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Kalamara E, Nitsch S, Schatzmayr G, Fegeros K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poult Sci.* 2007 Feb;86(2):309-17. **34.** Mountzouris KC, Balaskas C, Xanthakos I, Tzivinikou A, Fegeros K. Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella enteritidis*. *Br Poult Sci.* 2009 Jul;50(4):467-78. doi: 10.1080/00071660903110935. **35.** Mohan B, Kadriavel R, Natarajan A and Bhaskaran M (1996). Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. *British Poultry Science*, 37(2): 395-401. **36.** Mishra V, Prasad DN. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics *Int J Food Microbiol.* 2005 Aug 15;103(1):109-15. **37.** Mookiah, S., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Abdullah, N. & Ho, Y. W. 2014. Effects of dietary probiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2): 341348. **38.** Niba AT, Beal JD, Kudi AC, Brooks PH. Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non-ruminants: influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. *Trop Anim Health Prod.* 2009 Oct;41(7):1393-407. doi: 10.1007/s11250-009-9327-6. Epub 2009 Mar 13. **39.** Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci.* 2003 Apr;82(4):627-31. **40.** Pietras, M. 2001. The effect of probiotic on selected blood and meat parameters of broiler chickens. *J. Anim. Feed. Sci.* 10 (suppl 2):297-302. **41.** Ramesh BK, Satynarayana ML, Gowda RNS, Vijayasarithi, SK and Suguna Rao (2000). Effect of *Lactobacillus acidophilus* on gut pH and viable bacterial count in experimental fowl typhoid in broilers. *Indian Veterinary Journal*, 77(6): 544-546. **42.** Roth F. and M. Kirchgessner, 1986: Zur nutritiven Wirksamkeit von *Streptococcus faecium* (Stamm M 74) in der Kukenmast. *Arch. Geflügelk.* 50, 225–228. **43.** S. M. Lutful Kabir. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *Int J Mol Sci.* 2009 Aug; 10(8): 3531–3546. Published online 2009 Aug 12. doi: 10.3390/ijms10083531. **44.** Saeed A. Hayek, Salam A. Ibrahim. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 2013, 4, 73-87 Published Online November 2013 (<http://www.scirp.org/journal/fns>) <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.411A010>. **45.**

Shim, Y., Ingale, S., Kim, J., Kim, K., Seo, D., Lee, S., Chae, B. & Kwon, I. 2012. A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers. *British Poultry Science*, 53(4): 482–490. **46.** Sonmez, G., and M. Eren. 1999. Effects of supplementation of zinc bacitracin, mannanoligosaccharide and probiotic into the broiler feed on morphology of the small intestine. *Vet. Fak. Derg. Uludag Univ.* 18:125–138. **47.** Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Pereygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Pokhilenko VD, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3111–6. **48.** Watkins, B.A., Miller, B.F. & Neil, D.H. 1982. In vivo inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. *Poultry Science*, 61(7): 1298– 1308. **49.** Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. & Sahl, H.-G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3): 1772–1779. **50.** Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Sep;11(9):639-47. doi: 10.1038/nrmicro3089. Epub 2013 Aug 5.

UPOTREBA PROBIOTIKA U POVEĆANJU PRODUKTIVNOSTI U STOČARSTVU

Shivani Katoch¹, Dragan Šefer²

¹Departman ishrane životinja, DGCN Koledž veterinarskih i nauka o životinjama, CSK Himachal Pradesh Poljoprivredni Univerzitet, Palampur-176062, Indija

²Katedra za ishranu i botaniku, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Upotreba nutricionistički dobro izbalansirane i efikasne hrane za životinje je vitalna u ekonomski opravdanoj živinarskoj proizvodnji, a radi obezbeđivanja maksimalnog efekta sa što manje troškova. Veći profit je od primarnog značaja za ekonomski zasnovanu proizvodnju a to važi i za proizvodnju u živinarstvu. Efikasnost digestivnog trakta kod pilića može da se poboljša dodavanjem podesnih aditiva hrani za živinu, kao što su to promotori rasta, enzimi hraniva i probiotici. Neposredno posle pronalaska antibiotika, uočeno je da subterapijske koncentracije ovih supstancija tj. lekova koji mogu da spase živote, mogu da koriste u cilju efikasnosti ishrane kao i rasta kod životinja koje se gaje radi ishrane ljudi. Otuda je počela široka primena i dodavanje različitih antibiotika hranivima za životinje. U odnosu na sadašnje stanje, ova praksa je dovela do povećane zabrinutosti u odnosu na rezistenciju na antibiotike. U novije vreme je obavljen veći broj ozbiljnih studija koje podržavaju činjenicu, a kao posledica rezultata ovih studija, veći broj zemalja je zabranio upotrebu promotora rasta u živinarskoj industriji kao i u tehnologiji uzgoja ostalih vrsta životinja koje se koriste za ishranu ljudi.

U ovoj, post-antibiotskoj eri, postoji potreba za pronalaženjem alternativa koje mogu da bezbedno i efikasno zamene antibiotike kao promotore rasta u živinarstvu. Poznato je da veći broj promotora rasta koji mogu da poboljšaju produktivnost i smanje incidenciju oboljevanja u živinarstvu, spada u navedenu kategoriju. Primena direktne ishrane mikrobima kao i ostalih ne-konvencionalnih aditiva stočnoj hrani je povećana i praktično uspeva da zadovolji tražnju za „prirodnim“ proizvodima i supstancijama koje poboljšavaju rast. Imajući ovo na umu, postoji sve veća potreba za probioticima kao i za direktnom ishranom mikrobima, s obzirom da su ove supstancije u ekonomski zasnovanom živinarstvu, široko prihvaćene kao alternativa aditivima stočnoj hrani.

Probiotici: U normalnim uslovima, bakterije koje su prisutne u intestinalnom traktu, a koje mogu da budu korisne ili štetne, stalno su u kompeticiji i međusobno utiču na fiziološko stanje creva. Ova činjenica je upotrebljena za tzv. „probiotički koncept“, koji je u početku upotrebljen da bi se opisao uticaj mikrobiološke suplementacije hranivima za životinje, koji stimulišu rast farmских vrsta životinja i ljudi. Do sada je dato više definicija probiotika, počevši od Fullera koji je probiotike definisao kao: „suplementacija živim mikroorganizmima hraniva za životinje sa povoljnim efektom za domaćina koji se ogleda u poboljšanju mikrobiološke ravnoteže u intestinalnom traktu“. Novija definicija koju je dala svetska organizacija za hranu (FAO) i svetska organizacija za zdravlje ljudi (WHO) glasi: „probiotici su živi mikroorganizmi koji se daju u propisanoj dozi, a radi postizanja povoljnog efekta po zdravlje korisnika“. U osnovi, koncept probiotika je uspostavljen na početku 20. veka kada je dobitnik Nobelove nagrade E. Metchnikoff (1908), poznat inače kao „otac probiotika“, predložio da se ishranom mikroorganizmima koji povoljno deluju na zdravlje, poboljšava zdravlje ljudi. Sam termin „probiotik“ je nastao kao složenica od Latinskog predloga „pro“ što znači za i Grčke reči „biotic“ što znači bios ili život. Termin je u početku upotrebljavan da bi se opisale supstancije proizvedene od strane jednog mikroorganizma, koje su stimulisale rast drugih mikroorganizama. Kasnije, pod terminom probiotid, podrazumevali su se ekstrakti tkiva koji su stimulisali rast mikroorganizama kao i suplementi hrani za životinje koja bi imala povoljan efekat na životinje tako što bi doprinosila mikrobiološkom balansu intestinalne mikroflore (Fuller 1989). U današnje se vreme ravnopravno koriste oba termina: direktna ishrana mikrobima i probiotik.

U pripremi probiotika se najčešće koriste preparati na bazi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Lactococcus* kao i neke vrste gljivica. U probiotskim preparatima, koriste se pojedinačne vrste i sojevi živih bakterija ili više njih, zajedno.

U prirodnom okruženju, u intestinalnom traktu sasvim mladih pilića nalazi se veći broj vrsta mikroorganizama. Najznačajniji izvor ove intestinalne mikroflore jeste nesterilna površina ljuske jaja što je posledica kontakta nosilje u gnezdu. Međutim, u uslovima komercijalne proizvodnje u živinarstvu, kolonizacija intestinalnog trakta je proces koji je produžen usled visokih higijenskih standarda u inkubatorima i kao posledica nedostatka kontakta sa prirodnim okruženjem tek izleženog pileteta. Smatra se da je potrebno da u slučaju brojlera prođe 21 dan da bi se razvila izbalansirana intestinalna mikroflore pri čemu ovaj period vremena praktično traje polovinu ukupnog života brojlera. Na žalost, što kasnije dođe do kolonizacije intestinalnog trakta mikroflorom, to će intestinalni ekosistem biti ranjiviji i u većoj opasnosti, a kao posledica prisustva patogenih mikroorganizama. Posle prvih 21 dana života, ptica prolazi kroz druge vrste izazova u vidu stresa, promene u hranivu, tretman antibiotcima kao i druga oboljenja. Sve ovo može da utiče i poremeti floru gastro-intestinalnog trakta (GIT) izazivajući značajne gubitke.

Konvencionalna rešenja kojima bi se štitile mlade ptice, po pravilu obuhvataju hranjenje subterapijskim dozama antibiotika. Direktna ishrana mikrobima ili proizvodima koji sadrže probiotike koji potiču iz prirode, koji u sebi imaju korisne mikroorganizme i koji se već nalaze na tržištu pomažu da se održi balans intestinalne mikroflore kod većeg broja vrsta domaćih životinja. U novije vreme, obavlja se veći broj studija u cilju razvoja primene probiotika u živinarstvu pri čemu se u ovoj grani proizvodnje nalazi i veći broj izazova koji su posledica razlika između vrsta. Međutim, nedavna istraživanja u uslovima farmske proizvodnje, ukazuju da će probiotici sa konzistentnom efikasnošću obezbediti pouzdano rešenje u odnosu na uspostavljanje i održavanje balansa gastro-intestinalne flore komercijalno uzgajanih brojlera.

Vrste mikroorganizama koji se koriste kao probiotici

Postoji veći broj mikroorganizama koji spadaju u kategoriju probiotika, a prema definiciji koju je dala svetska zdravstvena organizacija (WHO, 2001). Kao probiotici, najčešće se koriste mikroorganizmi koji spadaju u grupu bakterija mlečno kiselinskog vrenja kao i bifidobacteria. Međutim, koriste se i druge vrste bakterija kao i neki kvasci (Didari i sar., 2014). Katoch i saradnici su (2011) obavili uporednu studiju odgovora na vrstu hrane u odnosu na različite sojeve *Lactobacillus-a*, *Lactococcus-a* i gljivica koje su izolovane iz lokalnih tj. terenskih izvora i koje su upotrebljene kao probiotici na farmi komercijalnih nosilja. Zaključeno je da *Lactobacillus plantarum*, izolovan iz šargarepe može da igra ulogu probiotika, u komercijalnim uslovima upotrebe. Bakterije mlečno kiselinskog vrenja su gram-pozitivne, katalaza-negativne vrste bakterijskih ćelija koje su sposobne da proizvode mlečnu kiselinu kao glavni kranji proizvod fermentacije uljenih hidrata (Hayek i Ibrahim, 2013). Rod *Lactobacillus* čini najveći deo populacije bakterija mlečno kiselinskog vrenja (LAB) koja obuhvata vrste kao što su *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc*. Rod *Bifidobacterium* obuhvata različite gram pozitivne, nepokretne anaerobne bakterije (Klijn i sar., 2005). Ostali rodovi koji se koriste kao probiotici u stočarstvu, uključujući i živinarstvo su *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Bacillus*. Mnogi komercijalni proizvođači probiotika koriste prepaate sa većim brojem bakterija, iako do sada nije dokazano da postoje pozitivni efekti ako se koristi više od jedne vrste bakterija u proizvodu (Zhao i sar., 2013).

Šta čini da se mikrobi ponašaju kao probiotici

Uopšteno govoreći, postoji nekoliko grupa zahteva koji su identifikovani kao značajne karakteristike da se mikrobi koji se direktno dodaju hrani ponašaju kao probiotici. Ovi zahtevi uključuju: (i) sposobnost adherencije na ćelije; (ii) uklanjanje ili redukciju adherencije patogenih mikroba ili supstancija; (iii) održivost i replikacija; (iv) proizvode kiseline, vodonik peroksid kao i bakteriocine koji su antagonisti rastu patogenih mikroorganizama; (v) sigurnost i samim tim i neinvazivnost, ne-kancerogenost i ne-patogenost i na posletku (vi) koagregacija i na taj način formiranje normalne, izbalansirane mikroflore u intestinalnom traktu.

Ekspersija navedenih faktora koji su navedeni su veoma značajni za probiotičku aktivnost. Međutim, nije jednostavno da se u *in vivo* uslovima uspostave kriterijumi i nivoi pojedinih karakteristika

probiotika, a koji su esencijalni za efekat. Izgleda da je sposobnost adherencije kao i ekspresija antagonističkih aktivnosti u odnosu na patogene, bilo da se radi i sprečavanju njihove adhezije, sprečavanje njihovog rasta ili sposobnosti da dominiraju u mikroflori creva, od ključnog značaja. Međutim, ovo u svakom slučaju ne isključuje i ostale navedene karakteristike probiotika.

Suplementi probiotika u hranivu treba da imaju garantovani period vremena čuvanja u spoljašnjoj sredini čime se obezbeđuje adekvatan broj vijabilnih mikroorganizama u vreme ingestije (Kopp-Hoolahan, 2001). Postoje značajne varijacije u sposobnosti mikroorganizama koji se koriste kao probiotici u odnosu na toleranciju prema kiseloj sredini creva i prema žuči (Mishra i Prasad 2005). Sedeća poželjna karakteristika probiotika jeste sposobnost da adheriraju za povišinu epitela intestinalnog trakta, omogućavajući da se probiotički sojevi (ili soj) kolonizuje u crevima (Guarner i Schaafsma, 1998). Pored toga, za ekonomski aspekt i isplativost primene probiotika značajna je isposobnost brzog rasta u relativno jevtinim mikrobiološkim medijumima. Prema Kabir-u (2009), radi zadovoljavanja navedenih kriterijuma, pri čemu se postiže funkcionalnost probiotika u živinarstvu, bakterije moraju da poseduju sledeće poželjne karakteristike: bakterije moraju da su normalni stanovnik digestivnog trakta ptica, moraju da adheriraju za intestinalni epitel i da izdrže oštre uslove koji tu vladaju (velika kiselost sredine u želudcu i tolerancija prema žučnim solima u crevima), da su uspešne u kompeticiji sa ostalim mikroorganizmima creva u smislu kolonizacije intestinalnog trakta kao i da su sposobne da izazivaju povoljne efekte u odnosu na domaćina. Pored ovih karakteristika, bakterije koje se koriste u probiotičke svrhe, trebaju da održavaju visok stepen vijabilnosti u uslovima čuvanja u magacinu kao i da ostanu vijabilne tokom nekih tehnoloških procesa proizvodnje (liofilizacija na primer).

Poboljšanje mikrobiote creva

Naročito u situaciji kada se antibiotski promotori rasta u stočarstvu sve manje koriste, za održavanje zdravstvenog stanja intestinalnog trakta životinja, od naročitog je značaja manipulacija sa hranivima, a radi poboljšanja performansa i produktivnosti tokom proizvodnje (Choct, 2009). Probiotici mogu da promene dinamiku populacije mikroorganizama u gastro intestinalnom traktu pri čemu se kao krajnji rezultat dobijaju populacije mikroba koje su poželjne. Probiotici to čine tako što promene ravnotežu između korisnih i patoloških mikroorganizama, na štetu ovih drugih (Mountzouris i sar., 2007, 2009). Populacije „zdravih“ tj. poželjnih mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu su često povezane sa povećanjem performansa i produktivnosti životinja što je po pravilu odraz bolje digestije hrane i povećanja imuniteta (Niba i sar., 2009). Probiotici pomažu tako što u crevima povećavaju broj poželjnih vrsta mikroorganizama istovremeno smanjujući broj onih koji mogu da nanese štetu ili su patogeni. Smatra se da se inhibicija patogenih mikroorganizama pomoću probiotika odvija putem mehanizama kompeticije u odnosu na situse adherencije za epitelni zid intestinalnog trakta i u odnosu na hranljive materije, kao i putem proizvodnje antimikrobnih supstancija (Patterson i Burkholder, 2003). Najčešći način modulacije mikroflora intestinalnog trakta putem probiotika (na primer kod živine), je povećanje populacije *Lactobacillus* i *Bifidobacteria* (Landy i Kavyani, 2013; Mookiah i sar., 2014). Redukcija patogenih mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu može da bude i posledica proizvodnje antimikrobnih supstancija kao što su to bakteriocini (Shim i sar., 2012). Adhezija probiotskih mikroorganizama za epitel intestinuma pri čemu se kompetitivno isključuju patogeni mikrobi kao stimulacija i indukcija imunskog odgovora su takođe načini delovanja probiotika. *Lactobacillus* adherira za epitelijalne ćelije ileuma kod pilića (Jin i sar., 1996). Na ovaj način, moguće je da kompetitivno isključuje patogene mikroorganizme iz gastrointestinalnog trakta (Mookiah i sar., 2014). Dokazano je da kolonizacija probiotskih sojeva *Lactobacillus*-a ima preventivne funkcije protiv *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* infekcije kod pilića (E. Van Coillie i sar., 2007). Na sličan način, dokazano je da bakteriocini koje proizvode probiotski sojevi *Escherichia coli*, postepeno smanjuju kontaminisanost *Salmonella*-ma u živinarskoj industriji (Stern i sar., 2006). Baktericin koji proizvode laktto-bakterije (na primer Nisin), inhibira rast patogenih mikroorganizama inhibišući sintezu ćelijskog zida, formiranjem pora na površini bakterije (Wiedemann i sar., 2001; Hassan i sar., 2012). Da bi se dobio ovaj efekat, bakteriocin se vezuje za prekursor u ćelijskom zidu, lipid II, pri čemu se formira kompleks koji može da formira pore u membrani bakterijske ćelije što na kraju kao posledicu ima smrt bakterijske ćelije (Wiedemann i sar., 2001; Bierbaum i Sahl 2001). Pored toga, ove bakterije proizvode i masne kiseline kratkih lanaca (SCFA) kao što su to sircetna i mlečna kiselina, koje inhibišu štetne mikroorganizme iz

gastrointestinalnog trakta (Watkins, Miller i Neil, 1982; Jin i sar., 1996; Mookiah i sar., 2014). Masne kiseline kratkih lanaca redukuju pH u mikro-okruženju u lumenu gastro intestinalnog trakta. Kod brojlera, ove masne kiseline se zatim unose u bakterije creva što kao rezultat ima redukciju intracelularnog pH. Na taj se način postiže smanjenje pH unutar bakterijskih ćelija na letalni nivo za same bakterije (Daskiran i sar., 2012).

Kako probiotici ispoljavaju svoj efekat?

Ukupno gledano, sve je više podataka da probiotici, kada se mikrobi daju direktno u hranu, imaju povoljan efekat na opšte zdravstveno stanje čoveka i životinja. Koncept primene probiotika u stočarstvu i živinastvu u vidu promotora rasta i tretmana i preveniranja bolesti kao i uspostavljanja i održavanja zdravlja, nije nov. Poznato je naime da probiotske bakterije, uključujući *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*, povećavaju humoralni imunski odgovor kod sisara. Međutim, postavlja se pitanje na koji način bakterije ispoljavaju ovaj povoljan efekat? Do danas su postavljene mnoge teorije koje ukazuju na ulogu probiotika u digestiji hranljivih materija u gastrointestinalnom traktu kao i na opšte prihvaćeni mehanizam koji ukazuje na ulogu u modulaciji imunoloških mehanizama.

Način delovanja probiotika kod živina obuhvata: (i) održavanje normalne mikroflore intestinalnog trakta mehanizmom kompetitivnog isključivanja i antagonizmom; (ii) uticaj na metabolizam putem povećanja aktivnosti digestivnih enzima i smanjenje aktivnosti bakterijskih enzima i proizvodnju amonijaka; (iii) poboljšanjem iskorišćavanja hrane i digestije; i (iv) neutralizaciju enterotoksina i stimulaciju imunskog sistema (Jin i sar., 1997). Uprkos činjenici da se tačni načini kako probiotici ostvaruju svoje efekte ne poznaju, smatra se da postoji veći broj mehanizama njihove aktivnosti. Ovi mehanizmi obuhvataju bakteriocine kao i masne kiseline kratkih lanaca, smanjenje pH u crevima preko kompeticije za hranljive materije pa sve do stulacije funkcionisanja mukozne barijere i imunomodulacije. Posebno je interesantna imunomodulacija koju obavljaju probiotici. Ovaj aspekt delovanja probiotika je bio predmet mnogobrojnih studija i da danas postoji veći broj podataka da probiotici utiču na nekoliko aspekata stečenog imunskog odgovora indukujući fagocitozu i stimulaciju sekrecije imunoglobulina IgA, modifikujući T-ćelijski imunski odgovor, pojačavajući Th1 i smanjujući Th2 imunski odgovor (promotori antimikrobnog rasta), pri čemu se radi o različitim mehanizmima delovanja ovih aditiva hranivima (Fajardo i sar., 2012). Probiotici pomažu u sprečavanju i kontroli patogenih mikroorganizama gastrointestinalnog trakta i/ili poboljšavaju performans i produktivnost proizvodnje u stočarstvu, putem različitih mehanizama. Osnovni mehanizmi koji se smatraju da imaju ulogu u delovanju probiotika su:

Pojačvanje imunskog statusa

Probiotici stimulišu imunski sistem pilića na dva načina: (a) flora koju čine probiotske bakterije migrira kroz creva duž zida creva i umnožava se do ograničenog nivoa ili (b) antigeni koji se oslobađaju posle uginjavanja bakterija u crevima, bivaju absorbovani i na taj način stimulišu imunski sistem (Havenaar i Spanhaak, 1994).

Ustanovljeno je da probiotici povećavaju broj ćelija u pajerovim pločama ileuma što predstavlja pokazatelj stimulacije imunskog sistema koji odgovara na bakterije tako što vrši sekreciju antitela klase A (IgA). Pored toga, imunska stimulacija se ogleda i u povećanju aktivnosti makrofaga i limfocita. Creva kao i fiziološka mikrobiota u njima, igraju ključnu ulogu u definisanju i razvoju repertoara imunskog sistema. Poznato je da životinje koje ne poseduju mikrofloru intestinalnog trakta imaju manje razvijen limfni sistem creva (GALT). Međutim, ako se ovim životinjama da u hrani suspenzija bakterija koje čine komensalnu mikrofloru intestinalnog trakta, doći će do povećanja i diverzifikacije imunskog sistema i humoralnog imunskog odgovora (imunoglobulini).

Lamina propria creva zdravih ptica sadrži veliku populaciju plazma ćelija koje poroizvode imunoglobulin klase A (IgA). Međutim, životinje koje ne poseduju normalnu mikrofloru creva, imaju sasvim mali broj ovih ćelija. Bakterije koje kao komensali naseljavaju creva i čine mikrobiotu gastrointestinalnog trakta, u tesnom su kontaktu sa ćelijama imunskog sistema. Pokazano je da rezidentne dendritičke ćelije koje se nalaze u okviru *Lam. propria* creva, imaju kapacitet direktnog uzorkovanja iz lumena creva tako što svojim nastavcima (dendritima) prolaze kroz međuprostor između epitelijalnih ćelija. Bakterije, komensali mogu da poseduju molekule koje prepoznaju receptori slični toll-like receptorima. Radi se o fiziološkim putevima koji su povezani većim delom sa patogenim

mikroorganizmima. Prepoznavanje bakterija-komensala ili njihovih strukturnih komponenti od strane Toll-like receptora (TLR) koji se nalaze na površini dendritičnih ćelija, može da vodi ka aktivaciji i sazrevanju ovih ćelija. Diferencijalna aktivacija dendritičnih ćelija od strane bakterija-komensala, pojačava uspostavljanje T-pomoćničkih-1 (Th1), Th2 i Th3 imunskog odgovora kao i sekreciju citokina od kojih su neki veoma značajni za proizvodnju antitela i promenu izotipa imunoglobulina.

Postoje barem tri različita načina uzimanja antigena iz lumena creva: putem dendritičnih ćelija, specijalizovanim M ćelijama koje se nalaze u okviru Pajerovih ploča kao i putem individualnih M ćelija koje se nalaze u epitelu intestinalnih vila. Anatomska lokacija imunskih ćelija urođenog imunskog sistema (makrofagi i dendritične ćelije) kao i način kako ove ćelije dolaze u kontakt sa antigenom, od bitnog su značaja u određivanju prirode kasnijeg imunskog odgovora. Iz tog razloga imunski odgovor koji nastaje može da bude posledica uzimanja antigena putem mehanizma trasepitelijalnog uzorkovanja što obuhvata dendritične ćelije ili su u pitanju dendritične ćelije koje su prisutne u *lam. propria* intestinalnog trakta ili se radi o uzimanju antigena od strane M ćelija Pajerovih ploča ili se M ćelije nalaze u strukturi intestinalnih vila.

Naučno je dokazano da uzimanje ne-patogenih bakterija ili njihovih fragmenata od strane makrofaga ili dendritičnih ćelija u okviru *lam. propria* je moguće putem direktnog uzorkovanja antigena u lumen creva. U slučaju dendritičnih ćelija, u ovom procesu učestvuju Toll-like receptori kao i CD-206 manozni receptor. Na ovaj način, bakterije se pročišćavaju ili transportuju do mezenterijalnih limfnih čvorova, u kojima dolazi do njihove reakcije sa T ili B ćelijama. Kao krajnji rezultat ovog procesa, dolazi do indukcije specifičnog IgA imunskog odgovora sluznice ili dolazi do supresije T ćelija.

Vijabilnost probiotika kao uslov njihove efektivnosti

Na početku primene probiotika, bilo je uvreženo mišljenje da bakterije moraju da budu vijabilne (žive) da bi bilo efekta na imunski sistem. Međutim, ovo je tačno samo u slučaju nekih sojeva bakterija. Na primer, u slučaju *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*, vijabilnost nije uslov za izazivanje pozitivnih efekata na ćelije koje proizvode citokine uprkos činjenici da je broj pozitivnih imunskih ćelija bio manji u poređenju sa brojem ćelija koje su dobijene u slučaju kada su upotrebljene vijabilne *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterije. Vijabilnost bakterija je kritična u slučaju određivanja vremenskog perioda ostanka i preživljavanja u crevima pri čemu se razlike odnose na administraciju vijabilnih i nevijabilnih bakterija; ne-vijabilne bakterije se uklanjaju u kraćem vremenskom periodu. Da bi bile efektivne, probiotičke bakterije moraju da ostanu u crevima najkraće 48 do 72 sata. Ovaj je period potreban da bi bilo koji antigen izazvao imunsku stimulaciju u gastrointestinalnom traktu. Ovo je od velikog značaja i ukazuje na važnost svakodnevne administracije propisane doze koja je definisana za svaku probiotsku bakteriju koja bi imala efekat adjuvansa, a bez izazivanja oralne tolerancije.

Sekrecija supstancija koje nalikuju na antibiotike

Lakto bakterije proizvode više vrsta baktericidnih i antibiotskih supstancija, za koje je ustanovljeno da su efikasni u odnosu na patogene crevnog trakta. Probiotske bakterije proizvode molekule koji imaju antibiotske supstancije koje imaju zajednički naziv bakteriocini (Gregor i sar., 2002). Poznato je da *Laktobacillus* bakterije proizvode antibiotske proteine i bakteriocine. Ovi bakteriocini mogu da ubiju patogene vrste bakterija kao i da spreče njihovu kolonizaciju u crevima. Neke probiotske bakterije proizvode ne-bakteriocinske supstancije, a koje imaju sposobnost ubijanja patogenih bakterija (Madsen, 2001).

Proizvodnja kiselina i snižavanje Ph u gastrointestinalnom traktu

Mlečno kiselinske (lakto) bakterije proizvode organske kiseline kao što su to mlečna kiselina i sirćetna kiselina, koje uslovljavaju snižavaju pH. Ove organske kiseline su toksične za patogenu i svakako neželjenu mikrofloru u intestinalnom traktu. Ramesh i sar. 2000. su objavili da su ptice koje su hranjene sa *L. acidophilus*, imale smanjenje površinskih vrednosti pH u duodenumu, jejunumu, ileumu i cekumu. Na isti način su Endo i Nakano (1999) pokazali da su probiotici snižavali pH vrednosti sadržaja cekuma kao i da su povećavali koncentraciju sirćetne kiseline.

Toksičnost ovih proizvedenih organskih kiselina je povećana pri niskim vrednostima pH (gornje partije gastrointestinalnog trakta) pošto disocijativne forme ovih organskih kiselina poseduju

bolju sposobnost da penetriraju u unutrašnjost bakterijskih ćelija.

Digestija i absorpcija

Direktno hranjenje sa mikrobima odnosno, probiotici imaju pozitivan efekat na fiziološke i anatomske funkcije gastrointestinalnog trakta. Probiotici odnosno, direktno hranjenje mikrobima povećava absorpciju krajnjih proizvoda metabolizma kao što su to soli mlečne kiseline (laktati), soli ćilibarne kiseline (sukcinati) kao i isparljive masne kiseline kratkih lanaca (SCVFA), acetat pripionat i butirrat kao i biomase bakterijskih ćelija. Kod ptica, većina isparljivih masnih kiselina koje se formiraju od stane bakterija intestinalnog trakta biva absorbovano i metabolizovano što u svakom slučaju doprinosi potrebama u energiji domaćina. Ove masne kiseline kratkih lanaca takođe utiču na absorpciju minerala tako što povećavaju njihovu rastvorljivost. Na taj način, probiotici povećavaju bioraspoloživost minerala i uz to imaju pozitivan efekat na mineralnu gustinu kostiju kao i na sadržaj minerala u kostima (Kruger i sar., 2009).

Hranljivi efekat probiotika uključuje povećanje specifičnih i ukupnih aktivnosti enzima trepljastog epitela enterocita jejunuma. Povećani nivo svarljivosti hranljivih materija i energije koja može da se iskoristi u metaboličkim putevima kroz koji prolazi hrana, opisan je u slučaju ishrane hranivima sa dodatkom probiotika. Jin i saradnici (2000) su opisali da suplementacija kulturom *Lactobacillus*-a, pilićima, povećava koncentraciju amilaza u tankim crevima.

Probiotici takođe utiču i na anatomske funkcije gastrointestinalnog trakta. Potrebna su dodatna ispitivanja koja bi dala odgovor na pitanje da li je delovanje u smislu povećanja dužine i težine intestinalnog trakta. Ahmad je (2004) ukazao da posle primene probiotika nastaje povećanje proliferacije ćelija kripti tankih creva. Sonmez i Eren su (1999) objavili rezultate koji ukazuju da se visina cilija ćelija ileuma povećava u slučaju suplementacije hraniva probioticima.

Stimulacija rasta i konverzija hrane

Korist od ishrane probioticima u živinarskoj industriji obuhvataju poboljšanje iskorišćavanja proteina, bolje zdravstveno stanje intestinalnog trakta, poboljšanje konverzije hrane, jačanje populacije fiziološke i povoljne mikroflore creva kao i supresija štetnih vrsta bakterija. Istovremeno, probiotici deluju tako što sprečavaju negativne efekte antibiotika, potpomazu sintezu nutritivnih materija, stimulišu imunski sistem, smanjuju incidenciju proliva kao i mortalitet ptica (Jadhav i sar., 2015). Nadalje, probiotici poboljšavaju unošenje hraniva, stepen konverzije hrane, povećavaju telesnu masu ptica, smanjuju koncentraciju holesterola u krvi, serumu i mesu ptica, povećavaju stepen mekoće i kvaliteta mesa i uz to, dovode do boljeg randmana mesa prilikom klanja. Može da se zaključi da ishrana brojlera probioticima predstavlja značajan faktor u poboljšanju ekonomskih parametara u živinarstvu.

Do sada je veći broj raznovrsnih studija ukazao da dodavanjem probiotika u hranivu za brojlere ima povoljan efekat na povećanje telesne mase kao i da se na ovaj način poboljšava zdravstveno stanje pilića (Lyons i Chapman, 1989; Buche i sar., 1992; Holoubek, 1993; Sharma i Katoch, 1996; Ghabdan, 1998). Ipak, treba naglasiti da postoje oprečna mišljenja i rezultati ispitivanja kada su efekti probiotika na prirast u pitanju. Roth i Kirchgessner su 1986. ukazali da dodavanjem probiotika (*Streptococcus faecium* M 74) nije imalo uticaja na telesnu masu živih ptica ali je imalo značajan efekat na performans brojlera u živinarstvu. U suprotnosti sa ovim nalazom, veći broj naučnika je prikazao rezultati koji govore u prilog tome da su pilići hranjeni probioticima imali bolji prirast i veću telesnu masu u odnosu na kontrolne grupe (Mohan i sar., 1996). Pietras i sar., su 2001. godine, objavili da je inokulacija pilića sa *Lactobacillus rhamnosus* bakterijama, imalo pozitivan efekat na tovni performans.

Katoch i saradnici su 1996. godine dodavali različite probiotike u hranu brojlerima. Ustanovljeno je povećanje u prirastu telesne mase u opsegu od 1063.47 grama do 1213.28 grama u odnosu na kontrolnu grupu koja je imala prirast od 961.85 grama. Kaistha i saradnici su 1996. godine, objavili da dodavanjem tri izolata mikroorganizama i to: *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus uberis* i *Saccharomyces cerevisiae*, a prema njihovim standardnim sojevima *L.bulgaricus* (L4), *S. lactis* (S1) i *Saccharomyces cerevisiae* (Y3), nije bilo nikakvih efekata na biološki performans kod brojlera tokom početne (starter) faze. Međutim, tokom završne faze tova, svi su tretmani imali značajne ($P \leq 0.05$) efekte u smislu povećanja prinosa telesne mase. Sa druge strane Katoch i saradnici su 1996. godine objavili rezultate koji ukazuju na značajno ($P \leq 0.05$) bolji performans brojlera kada su hranjeni sa Y3 sojem

Saccharomyces cerevisiae, u periodu od 1 do 6 nedelja starosti. Katoch i saradnici su 2000. godine obavili eksperiment u okviru koga su ispitivali efekte različitih sojeva mikroorganizama izolovanih iz ekskreta leoparda (*Panthera leo*), na performans kod pilića različitih rasa. Dobijeni rezultati ukazuju da su sve kombinacije mikroorganizama imale značajno ($P < 0.05$) veći prinos u telesnoj masi u poređenju sa kontrolnim grupama, samo kod vancobb rase brojlera. Katoch i saradnici su 2013. godine ustanovili da je dodavanjem izolovanih DFM (direktna ishrana mikrobima) imalo potencijal poboljšanja performansa biološkog rasta kod brojlera koji su hranjeni kako standardnom formulisanom hranom tako i hranom u kojoj je bilo deficita u mineralima.

Anti-holesterolski efekat

Nekoliko mikroorganizama koji se koriste u DFM (direktna ishrana mikrobima) sistemu ima kapacitet da hidrolizuje žučne kiseline. Na ovaj se način sprečava njihova reapsorpcija iz intestinalnog trakta. Žučne kiseline se stvaraju iz holesterola u jetri i otuda, bilo koje povećanje njihove eliminacije iz tela, povećava stepen konverzije holesterola u žučne kiseline. Ovo na posletku vodi ka pretpostavci da se na ovaj način smanjuje hivo holesterola u krvi. Veći broj studija su ukazale da primena probiotika dovodi do smanjivanja sadržaja holesterola u mesu i u serumu. Rezultati su pokazali da su brojleri koji su hranjeni hranivima kojima su dodavani probiotici, imali manje količine ukupnog holesterola, kao i manje koncentracije VLDL holesterola i triglicerida u serumu (Mohan i sar., 1996). Pietras i saradnici su 2001. godine objavili rezultate koji pokazuju da je meso pilića koji su hranjeni sa probioticima, tokom celog perioda tova imalo značajno veći sadržaj proteina. Istovremeno, postojala je tendencija smanjivanja masti kao i sadržaja ukupnog holesterola.

PROBIOTICI I ZDRAVLJE

Do sada najčešće korišćeni probiotici u ishrani ljudi jesu fermentisani proizvodi mleinarske industrije, kao što su to jogurt i mlaćenica (buttermilk - tj. surutka kao ostatak posle pravljenja maslaca). Terapija probioticima je stara ideja i datira iz vremena od pre više od 100 godina kada je Elie Metchnikoff ukazao da seljaci u Bugarskoj žive duže zato što se hrane jogurtom. Japanski lekar Minoru Shiroto je 1930-godina, ukazao da pravilna mešavina suspenzije bakterija u crevima može da spreči pojavu oboljevanja. Miso supa, napravljena od fermentisane sojine paste, predstavlja osnovu Okinawa dijeta. Ukazano je da poremećaji u osetljivoj ravnoteži u gastrointestinalnom traktu može da dovede do pojave dijareje (dijareja izazvana primenom antibiotika, putna dijareja, intestinalne infekcije), gastroenteritisa, konstipacije, sindrom iritabilnog želuca, zapaljenje želuca (Crohn-ova bolest i ulcerativni kolitis), alergije na hranu kao i pojedinih malignih oboljenja. Nasuprot ovome, balansirana ili „normalna“ enteralna flora može da kompetitivnim mehanizmima dovede do uklanjanja patogenih mikroorganizama, da stimuliše imunski sistem creva i da proizvede nutritivne i druge supstance kao što su masne kiseline kratkog lanca, vitamine, amino-kiseline (arginin, cistein i glutamin), poliamine, faktore rasta kao i antioksidanse.

STUDIJE ISPITIVANJA DODAVANJA PROBIOTIKA

Brojna ispitivanja uticaja probiotika su pokazala da ishrana ovim preparatima može da često poveća količinu specifične mikroflore u intestinumu ali se ovo povećanje ne odnosi na ukupni broj bakterija u crevima. Isto tako, u većini objavljenih studija, broj specifičnih baktetrija se ne povećava osim u slučajevima kada jedinka ne uzima veoma velike doze probiotika u formi suplementa, dakle doze koje se prirodno ne nalaze u hrani. Jedna od prvih dvostruko-slepih placebo-kontrolisanih studija (20 ljudi; 10 po grupi) u okviru koje je upotrebljen komercijalno dostupan probiotik, obavili su Spnhaak i saradnici koji su ustanovi da postoji povećanje broja *Lactobacillus*-a. Beno i Mitsuoka su prikazali rezultate ispitivanja u okviru kojih je *Bifidobacterium longum* davan kao farmaceutik odraslima što je rezultiralo većim brojem bifidobakterija i manjim brojem klostridija u fecesu, manjom vrednošću pH fecesa kao i manjom koncentracijom amonijaka u fecesu. Ispitivanja koja su obavili Ling i saradnici, na 64 odrasle osobe, pokazala su da kod primene probiotika u hrani (*Lactobacillus* GG) postoji veći broj *Lactobacillus*-a GG u fecesu, smanjenje aktivnosti fekalne beta-glukuronidaze, nitroreduktaze i hidrolaze glikoholične kiseline.

Dokazano je da probiotici uspešno leče tri tipa dijareja: dijareju izazvanu antibioticima, putnu

dijareju i dijareju infektivne etiologije. Najčešća posledica uzimanja antibiotika jeste dijareja, koja se nalazi kod oko 20% pacijenata, a kao posledica poremećaja balansa endogene mikroflore kolona. Obavljeno je nekoliko kliničkih studija koje su imale za cilj da odrede efikasnost davanja probiotika pacijentima koji su imali dijareju izazvanu antibioticima. U okviru tri studije u kojoj su poštovani principi slučajnog uzorkovanja, dvostruko-slepih i kontrolisanih studija su pokazala da prilikom korišćenja oralno aplikovanog *Saccharomyces boulardii*, postoji smanjenje pojavljivanja dijareje izazvane antibioticima.

Putna dijareja se takođe pojavljuje kod oko polovine ljudi koji putuju u nerazvijene zemlje ili u zemlje visokog rizika. Simptomi mogu da budu od slabih pa do teških. Do sada je u najmanje osam kliničkih studija obavljeno ispitivanje upotrebe tj. oralne administracije probiotika sa ciljem sprečavanja pojavljivanja putne dijareje. Black i saradnici su obavili studiju sa slučajno-verovatno odabranim uzorcima pri čemu su ispitivali mešavinu probiotskih sojeva bakterija (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum*, and *S. thermophilus*). Studijom je obuhvaćena i placebo grupa. Ukupno je u studiji učestvovalo 94 Danskih turista koji su putovali u Egipat, u trajanju od 2 nedelje. Incidencija putne dijareje kod turista je značajno bila manja i iznosila je 43% u grupi koja je uzela probiotik u poređenju sa kontrolnom (placebo) grupom u kojoj je incidencija dijareje bila 71%. Infekcija rotavirusima je najčešći uzrok teških dijareja kod dece. Terapija probioticima (*Lactobacillus* GG) se pokazala efektivnom u odnosu na dužinu trajanja simptoma rotavirusnih enteralnih infekcija. Meta-analiza je ukazala aplikacija probiotika sa *Laktobacillus*-om predstavlja efektivan tretman akutne infektivne dijareje kod dece.

Infektivno stomačno oboljenje (IBD), uključujući i Crohn-ovu bolest i ulcerozni kolitis je ozbiljan zdravstveni problem nepoznate etiologije, a koji se nalazi kod oko 0.5% ljudske populacije severne Evrope. Uprkos činjenici da je naše današnje poznavanje kompleksnosti intestinalne flore veoma ograničeno, veći broj studija je pokazao da sve vrste bakterija nemaju istu aktivnost u promovisanju ili redukciji zapaljenja u intestinalnom traktu. Na osnovu ovoga, stvoren je novi koncept infektivnog stomačnog oboljenja, zasnovano na upotrebi probiotskih preparata koji obično sadrže laktobacile, bifidobakterije ili sojeve *Escherichia coli* bakterije.

Infektivno stomačno oboljenje kao pojam obuhvata zapaljensku reakciju u crevima kao što su to Crohn-ovo oboljenje i ulcerativni kolitis. Etiologija ovih oboljenja nije poznata ali je postavljena hipoteza da poremećaj u intestinalnoj flori kao i defektna mukozna barijera značajno doprinose nastanku simptoma. Infekcije u intestinalnom traktu po nekada po simptomima, nalikuju infektivnom stomačnom oboljenju. Ovi simptomi međutim, nestaju sa primenom antibiotske terapije. Do sada je obavljeno nekoliko studija infektivnog stomačnog oboljenja na životinjama pri čemu su upotrebljavani probiotici, sa obećavajućim rezultatima. Međutim, samo je mali broj oglada obavljen sa ljudima. U jednoj studiji, 14-toro dece sa Crohn-ovim oboljenjem, koja su primala *L. rhamnosus* GG, imala su povećani IgA imunski odgovor.

Ustanovljeno je od strane nekoliko istraživača da probiotici smanjuju koncentraciju enzima i sekundarnih žučnih soli u fecesu, da smanjuju absorpciju štetnih mutagenih faktora, a koji mogu da doprinesu kancerogenezi u kolonu.

Druge studije su ukazale da normalna intestinalna mikroflora može da utiče na kancerogenezu tako što proizvodi enzime (glikozidaze, B-glukuronidaze, azoreduktaze, and nitroreduktaze), koje obavljaju transformaciju pre-kancerogenih supstancija u aktivne kancerogene. Neki od probiotika mogu da štiteću domaćina od ove aktivnosti. *L. acidophilus* i *L. casei* suplementacija hrani za ljude može da pomogne u smislu smanjenja koncentracije navedenih enzima, što je dokazano u uzorcima fecesa ljudi. U studijama u kojima su ispitivanja obavljena na životinjama, navedeni bakterijski enzimi su bili suprimirani sa davanjem *Lactobacillus* GG probiotika. Ostale bakterije mlečno-kiselinskog vrenja su pokazale da imaju sličan efekat. Međutim, odnos i međusobna zavisnost između aktivnosti navedenih enzima i rizika od nastanka tumora treba detaljnije da se istraži. Aso i Akazan su u studiji sa slučajnim-verovatnim uzorkovanjem ispitivali 48 Japanskih pacijenata. U okviru rezultata, prikazano je da su se recidivi tumora mokraćne bešike pojavljivali značajno kasnije u slučaju uzimanja *L. casei*. Isti su autori obavili studiju na većem broju ljudi (125 pacijenata) u kojoj je bila kontrolna-placebo grupa. Rezultati su pokazali da je uzimanje *L. casei* redukovao ponovno pojavljivanje tumora kod svih pacijenata osim kod onih kod kojih je postojao više od jednog rekurentnog tumora. Na osnovu rezultata je postavljena hipoteza da laktobacili mogu da vezuju mutagene supstancije iz intestinalnog trakta što kao posledicu ima redukciju absorpcije ovih štetnih mutagenih agenasa.

ZAKLJUČAK:

Ekonomska proizvodnja u živinarstvu podrazumeva optimalnu, dobro balansiranu i efikasnu ishranu. U ovom kontekstu, postoji povećano interesovanje za upotrebu Probiotika koji se definišu kao živi mikroorganizmi koji se dodaju hrani za životinje, a koji imaju povoljne efekte na životinje poboljšavanjem mikrobiološkog balansa intestinalnog trakta. Kada se daju životinjama u hranivu, u pravilno odabranoj količini, povoljno deluju na zdravstveno stanje životinja. Primena direktnog hranjenja sa mikroorganizmima kao i primena drugih ne-tradicionalnih dodataka hranivima, povećava se kao odgovor na sve prisutniju tražnju za „prirodnim“ proizvodima koji promovišu rast u stočarstvu. Veruje se da upotreba ovakvih preparata tj. probiotika, sprečava ili smanjuje rast patogenih mikroorganizama u intestinalnom traktu živine što kao rezultat ima povećanje rasta i performansa ptica. Ovaj je fenomen izazvao veliko interesovanje u živinarskoj industriji pri čemu se upotreba probiotika smatra alternativom profilaktičkoj upotrebi antibiotika u cilju sprečavanja oboljenja u jatima ptica. Mehanizmi delovanja probiotika uključuju fizičko tj. prostorno uklanjanje patogenih mikroorganizama, stimulaciju imunskog sistema, promene u mikro-sredini creva, proizvodnja antimikrobnih supstancija i održavanje integriteta graničnog sloja epitela u crevima. Na žalost, do sada nije uspelo uspešno i konzistentno ponavljanje različitih mehanističkih promena u fiziologiji životinja kao i poželjnih promena u proizvodnim parametrima koji bi bili povezani sa upotrebom probiotika. Otuda u naučnoj i stručnoj javnosti, odnosno u živinarstvu, ne postoji unierzalno prihvatanje efikasnosti ovih dodataka hranivu za životinje. Prikaz dosadašnjih shvatanja, a na osnovu naučne literature ukazuje da uopšteno, alternativni aditivi hranivima za životinje ukazuju na ne-konzistentne povoljne efekte na rast. Jedan od razloga ovome svakako može da bude pravilna kombinacija i koncentracija gastrointestinalne mikroflore koja je prirodno definisana kao i brojne nezavisne promenljive vrednosti. Izmena jednog od faktora kao što je to koncentracija i pokušaji da se optimizuje prirodno delikatan balans koji postoji u gastrointestinalnom traktu može lako da promeni uticaj i efikasnost probiotika. U novije vreme postoji povećani interes u odnosu na upotrebu probiotika u slučaju većeg broja stanja poremećaja zdravlja ljudi i životinja, a koji se odnose na dijareju, sindrom iritabilnog intestinuma, inflamatorno oboljenje creva kao i kanceri. Veći broj autora ukazuje da u slučaju svih nabrojanih poremećaja zdravlja, postoji povoljan efekat prilikom primene probiotika.

Литература

1. Ahmad, I., 2004. Effect of probiotic (Protexin) on the growth of broilers with special reference to the small intestinal crypt cells proliferation. M. Phil Thesis. Centre of Biotechnology, Univ. of Peshawar. 2. Bierbaum, G. & Sahl, H.-G. 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1): 2–18. 3. Buche AV, Gaffar MA, Kalbande VH and Deshmukh SV (1992). Influence of Indian Standards, Manak Bhavan, 9, Bahadur Zafar Marg, New Delhi-110002, India. 4. Choct M. Managing gut health through nutrition. *Br Poult Sci*. 2009 Jan;50(1):9-15. doi: 10.1080/00071660802538632. 5. Daskiran, M., Onol, A. G., Cengiz, O., Unsal, H., Turkyilmaz, S., Tatli, O. & Sevim, O. 2012. Influence of dietary probiotic inclusion on growth performance, blood parameters, and intestinal microflora of male broiler chickens exposed to posthatch holding time. *Journal of Applied Poultry Research*, 21(3): 612–622. 6. Didari T, Solki S, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M. 2014. A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf*. 2014 Feb;13(2):227-39. doi: 10.1517/14740338.2014.872627. Epub 2014 Jan 3. 7. ENDO Tsuyoshi NAKANO Masuo. 1999. Influence of a Probiotic on Productivity, Meat Components, Lipid Metabolism, Caecal Flora and Metabolites, and Raising Environment in Broiler Production. January 1999. *Nihon Chikusan Gakkaiho* 70(4):207-218. DOI: 10.2508/chikusan.70.207. 8. E. Metchnikoff, *Optimistic studies* New York: Putman's Sons, 1908, 161-183. 9. E. Van Coillie J. Goris I. Cleenwerck K. Grijspeerd N. Botteldoorn F. Van Immerseel J. De Buck M. Vancanneyt J. Swings L. Herman M. Heyndrickx. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control Salmonella Enteritidis. 2007. *Journal of Applied Microbiology* Volume 102, Issue 4. 10. Fajardo Paula, Lorenzo Pastrana, Jesús Méndez, Isabel Rodríguez, Clara Fuciños, and Nelson P. Guerra. 2012. Effects of Feeding of Two Potentially Probiotic Preparations from Lactic Acid Bacteria on the Performance and Faecal Microflora of Broiler Chickens. *Scientific World Journal*. 2012: 562635. Published online 2012 May 15. doi: 10.1100/2012/5626351. 11. FULLER, R.

1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365–378. **12.** Gregor Reid Sung O. Kim Gerwald A. Köhler. 2006. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Volume 46, Issue 2, 1 March 2006, Pages 149–157, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2005.00026.x>. **13.** Ghadban GS (1998). Investigation on the efficacy of early probiotic treatment on the performance of broiler chicks. *Proceedings of Xth European Poultry Conference, Israel II*: 859. **14.** Guarner, F. and Schaafsma, G.J. (1998) Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 237-238. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00136-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00136-0). **15.** Hassan, M., Kjos, M., Nes, I., Diep, D. & Lotfipour, F. 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(4): 723–736. **16.** Havenaar R, Spanhaak S 1994. Probiotics from an immunological point of view. *Curr. Opin. Biotechnol* 5:320-325. **17.** Holoubek J (1993). Influence of different biostimulators on growth and feed consumption of broiler fowls. *Sbornik Vysoke Skoly Zemedelske v praze Fakulta Agronomika Rada B Zivocisna Vyrba*, 55: 211-220. (c.f. Darekar, 1996). **18.** Isolauri E1, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity *Am J Clin Nutr.* 2001 Feb;73(2 Suppl):444S-450S. doi: 10.1093/ajcn/73.2.444s. **19.** Jin, L., Ho, Y., Abdullah, N., Ali, M. & Jalaludin, S. 1996. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Letters in Applied Microbiology*, 23(2): 67–71. **20.** Jin, L. Z., Y. W. Ho, N. Abdullah, and S. Jalaludin. 1997. Probiotics in poultry: Modes of action. *World's Poult. Sci. J.* 53:352–368. **21.** Jin, L., Ho, Y., Abdullah, N. & Jalaludin, S. 2000. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*, 79(6): 886–891. **22.** Jadhav K, Sharma KS, Katoch S, Sharma VK and Mane BG. 2015. Probiotics in Broiler Poultry Feeds: A Review. *Journal of Animal Nutrition and Physiology* 1: 04-16. **23.** Kaistha M, Katoch S, Meena K, Dogra KK, Sharma CR and Kumari. 1996. Effect of dietary supplementation of useful microbes isolated from *Luffa Cylindrica* and *Momordica Charantia* on the performance of broilers. *Indian Journal of Poultry Science* 3; 31: 156-162. **24.** Katoch S. 1996. Effect of dietary supplementation of microbes isolated from faecal material of Leopard (*Panthera leo*) on the performance of broilers. *Indian Journal of Animal Nutrition* 4; 13: 197-203. **25.** Katoch S, Kaistha M, Sharma KS, Kumari M and Katoch BS. 2000. Effect of different strains of microbes isolated from the leopard (*Panthera leo*) excreta on the performance of chicks of different strains. *Indian Journal of Poultry Sciences* 1; 35: 57-61. **26.** Katoch S, Sharma KA, Chahota R, Marković R and Sefer D. 2013. Performance of broiler chicken fed varied nutrient density diets supplemented with direct fed microbial. *Acta Veterinaria (Beograd)* 63: 5-6, 643-653. **27.** Klijn A, Mercenier A, Arigoni F. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2005 Aug;29(3):491-509. **28.** Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc.* 2001 Feb;101(2):229-38; quiz 239-41. **29.** Landy, N. & Kavyani, A. 2013. Effects of using a multi-strain probiotic on performance, immune responses and caecal microflora composition in broiler chickens reared under cyclic heat stress condition. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(4): 703–708. **30.** Lyons, T. P. and J. D. Chapman. 1990. Probiotics. In: *Nontraditional feed use in sources swine production*. (Ed. P. A. Thacker and R. N. Kirkwood). Butterworth Publishers, MA. pp. 315-326. **31.** Kruger, M.C., Fear, A., Chua, WH. et al. *Dairy Sci. Technol.* (2009) 89: 219. <https://doi.org/10.1051/dst/2009012>. **32.** Madsen KL. The use of probiotics in gastrointestinal disease *Can J Gastroenterol.* 2001 Dec;15(12):817-22. **33.** Mountzouris KC, Tsiros P, Kalamara E, Nitsch S, Schatzmayr G, Fegeros K. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poult Sci.* 2007 Feb;86(2):309-17. **34.** Mountzouris KC, Balaskas C, Xanthakos I, Tzivinikou A, Fegeros K. Effects of a multi-species probiotic on biomarkers of competitive exclusion efficacy in broilers challenged with *Salmonella enteritidis*. *Br Poult Sci.* 2009 Jul;50(4):467-78. doi: 10.1080/00071660903110935. **35.** Mohan B, Kadriyel R, Natarajan A and Bhaskaran M (1996). Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. *British Poultry Science*, 37(2): 395-401. **36.** Mishra V, Prasad DN. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics *Int J Food Microbiol.* 2005 Aug 15;103(1):109-15. **37.** Mookiah, S., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Abdullah, N. & Ho, Y. W. 2014. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation

concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(2): 341348. **38.** Niba AT, Beal JD, Kudi AC, Brooks PH. Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non-ruminants: influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. *Trop Anim Health Prod.* 2009 Oct;41(7):1393-407. doi: 10.1007/s11250-009-9327-6. Epub 2009 Mar 13. **39.** Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci.* 2003 Apr;82(4):627-31. **40.** Pietras, M. 2001. The effect of probiotic on selected blood and meat parameters of broiler chickens. *J. Anim. Feed. Sci.* 10 (suppl 2):297-302. **41.** Ramesh BK, Satynarayana ML, Gowda RNS, Vijayasarithi, SK and Suguna Rao (2000). Effect of *Lactobacillus acidophilus* on gut pH and viable bacterial count in experimental fowl typhoid in broilers. *Indian Veterinary Journal*, 77(6): 544-546. **42.** Roth F. and M. Kirchgessner, 1986: Zur nutritiven Wirksamkeit von *Streptococcus faecium* (Stamm M 74) in der Kukenmast. *Arch. Geflügelk.* 50, 225–228. **43.** S. M. Lutful Kabir. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *Int J Mol Sci.* 2009 Aug; 10(8): 3531–3546. Published online 2009 Aug 12. doi: 10.3390/ijms10083531. **44.** Saeed A. Hayek, Salam A. Ibrahim. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 2013, 4, 73-87 Published Online November 2013 (<http://www.scirp.org/journal/fns>) <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.411A010>. **45.** Shim, Y., Ingale, S., Kim, J., Kim, K., Seo, D., Lee, S., Chae, B. & Kwon, I. 2012. A multi-microbe probiotic formulation processed at low and high drying temperatures: effects on growth performance, nutrient retention and caecal microbiology of broilers. *British Poultry Science*, 53(4): 482–490. **46.** Sonmez, G., and M. Eren. 1999. Effects of supplementation of zinc bacitracin, mannanoligosaccharide and probiotic into the broiler feed on morphology of the small intestine. *Vet. Fak. Derg. Uludag Univ.* 18:125–138. **47.** Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Pokhilenko VD, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:3111–6. **48.** Watkins, B.A., Miller, B.F. & Neil, D.H. 1982. In vivo inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. *Poultry Science*, 61(7): 1298– 1308. **49.** Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. & Sahl, H.-G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3): 1772–1779. **50.** Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Sep;11(9):639-47. doi: 10.1038/nrmicro3089. Epub 2013 Aug 5.

УТИЦАЈ ДОДАВАЊА НИАЦИНА У ХРАНИ НА МЕТАБОЛИЧКО ЗДРАВЉЕ
И ПРОДУКТИВНОСТ КРАВА У РАНОЈ ЛАКТАЦИЈИ

*INFLUENCE OF NIACIN SUPPLEMENTATION IN DIET ON METABOLIC HEALTH AND
PRODUCTIVITY OF COWS DURING EARLY LACTATION*

*Талија Христовска¹, Марко Р. Цинцовић², Бранислава Белић²,
Мира Мајкић², Ивана Лакић²*

¹Ветеринарски факултет Битољ, Македонија;

²Департаман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду,
Србија

Кратак садржај

У говедарској производњи се интензивно испитују различите стратегије и могућности да се липомобилизација, кетогенеза или инфламација у овом периоду ублаже и ставе под контролу. Ниацин је витамин са антилиполитичким деловањем, чији витаминер никотинска киселина значајно утичу на степен липомобилизације тако што је смањују. Антилиполитичко деловање ниацина углавном је био предмет истраживања бројних студија у прошлом веку у хуманој и ветеринарској медицини. Ниацин се често описује као једињење са два лица једно је витамин а друго је лек за регулисање липидног ткива. Нова бројна истраживања указују на позитивне ефекте употребе фармаколошке дозе ниацина на метаболизам и продукцију код високомлечних крава у перипарталном период. Ниацин односно његов витаминер никотинамид је реактивна половина никотинамид аденин динуклеотида (NAD) и никотинамид аденин динуклеотид фосфата (NADP), који учествују у бројним метаболичким редокс реакцијама у организму, због чега је њихов значај изузетно велики.

Кључне речи: краве, ниацин, храна, метаболизам, здравље

Утицај ниацина на метаболичку адаптацију

Ниацин испољава различите метаболичке ефекте у раној лактацији. Најважнији су антилиполитички ефекат и промене у метаболизму масти, као и промене које се односе да смањење инсулинске резистенције и смањене повезаности параметара метаболичке адаптације са степеном липолизе и кетогенезе у раној лактацији (1-3). Антилиполитички ефекат је најважнији ефекат који овај испољава код крава у перипарталном периоду. У прегледном раду (4) у коме се анализирају студије у којима се користи ниацин који није заштићен од разграђивања у румену дошло се до закључка да вредности НЕФА могу бити смањени услед дејства никотинске киселине под одређеним условима али не и од никотиамида. Након престанка ефекта никотинске киселине дешава се повратак НЕФА изнад базалних вредности које се затим враћају у нормалу. Да би се постигао ефекат ниацина количина ниацина која пристиже у дуоденум мора бити на високом нивоу, што се може постићи додатком ниацина у исхрани у великим фармаколошким дозама. У веома високој дози никотинска киселина има способност да супримира ослобађање масти из депоа (5). *In vivo* студије показују да апликација фармаколошких доза никотинске киселине смањује ниво плазматске НЕФА тако што инхибише липолизу код говеда. Овакав антилиполитички потенцијал никотинске киселине највероватније се остварује преко деловања на ниацински рецептор GPR109A. Недавно је доказано да GPR109A антилиполитички пут, који је већ описан код других

врста животиња, постоји у функционалној форми и код говеђег ткива у ин витро условима. Са друге стране никотинамид има веома мали афинитет везивања са GPR109A (6,7,8,9).

Говеда GPR109A лиганд, никотинска киселина, никотинамид и БХБ, показали су различити ниво ефикасности у индукованој антилиполизи у ин витро услова. Никотинска киселина смањује фосфорилацијухормон сензитивне липазе и тако редукује липолитички одговор, никотинамид није способан да супримира липолитичку активност код говеђег ткива у ин витро условима, а БХБ само у највећој концентрацији индукује значајно смањење у ослобађању глицерола и фосфорилацију хормон сензитивне липазе (10,11) апликовали су абомазалну инфузију у различитим дозама никотинске киселине (0, 6, 30, 60 mg/kg тт) код Холштајн крава, које су биле у рестриктивном режиму исхране. Абомазална инфузија је била аплицирана као појединачна болус доза 48 сати након почетка рестрикције храном. Концентрација плазматске НЕФА била је смањена од 546 $\mu\text{Eq/l}$ на 208 $\mu\text{Eq/l}$ један сат по апликацији абомазалне инфузије од 6 mg никотинске киселине по kg/tm и мање од 100 $\mu\text{Eq/L}$ за 3 сата после абомазалне инфузије двеју највиших доза никотинске киселине. Резултати показују да се драстично враћање концентрација НЕФА одвија по прекидању инфузије са никотинском киселином. Враћање се одвија након иницијалног смањења концентрација НЕФА у плазми и тај повратак је трајао 9 часова за дозу од 30 mg/kg никотинске киселине, односно 6 часова за дозу од 6 mg/kg никотинске киселине. Тиме су (11) доказали да је никотинска киселина моћан антилиполитички агенс код говеда, који имају негативан енергетски биланс за време рестрикције храном и да одрживо смањење НЕФА може се постићи све док има дотока никотинске киселине у доњем делу гастроинтестиналног тракта где се може абсорбовати. Антилиполитичка својства никотинске киселине могу показати као корисни код млечних крава уколико се ниацин користи у оптималној дози и форми и обезбеди се пострумални извор никотинске киселине. Ипак, прво треба утврдити оптималну дозу никотинске киселине која ће имати умерени степен инхибиције липолизе и НЕФА, зато што НЕФА која потиче из масног ткива представља важан извор енергије и прекурсор за синтезу масних киселина у почетку лактације те како обезбедити стабилан извор никотинске киселине да би се избегло драматично враћање НЕФА. У истраживању (12) где се користио ниацин заштићен од разграђивања у румену, доза од 24 грама инкапсулираног ниацина (која обезбеђује биорасположливост од 9.6 грама на дан) показало се успешним у инхибицији липолизе код постпарталних крава, јер се смањењем концентрација постпарталне вредности НЕФА. Исто тако (12) указују на то да протоколи третмана који се употребљавају у њуховој студији су једини који јасно супресирају липолизу код говеда без проузроковања повратне липолизе. Доза од 12 грама дневно инкапсулираног ниацина обезбеђује биорасположливи извор ниацина који модификује липидни метаболизам (13).

Иако постоји висок инфлуks НЕФА у хепатоците код крава у раној лактацији, нађена је смањена концентрација триглицерида у јетри код крава храњених са заштићеним ниацином. Пошто је акумулација хепатичних триглицерида директно повезана са концентрацијом НЕФА у крви редуковањем концентрације НЕФА код крава храњених ниацином постпартум могуће је довести до смањене акумулације триглицерида (13). Поред масне јетре, настанак кетозе представља другу негативну последицу високе концентрације НЕФА и његовог некомплетног метаболисања, када настају кетонска тела. Једна од метода превенције кетозе је давање суплемената ниацина и употреба ниацина заједно са прекурсорима гликогена као пропилен гликол или натријум пропионате (14,15). Истраживања су показала да суплементи ниацина редукују концентрацију БХБА и НЕФА у крвној плазми са повећањем нивоа глукозе у серуму (16,17,18) су добили резултате са сигнификантним ефектима ниацина на БХБ где је ниво концентрације БХБ у плазми било ниже код крава храњених са ниацином у односу са контролну групу. Сигнификантну редукацију ($p < 0.01$) концентрације БХБ је добијено код крава храњених са ниацином (у форми кристалног пудера) 12 грама по крави дневно и смањење у мањој мери код крава који су добили 6 грама по крави на дан ако се упореди са контролном групом (19).

Инсулинска резистенција код крава у перипарталном периоду настаје због приоритетне употребе глукозе за раст плода, развој вимена и лактацију. Инсулинска резистенција код Хоштајн крава је повезана и са повећаном концентрацијом НЕФА у плазми (6). Обзиром да ниацин помаже у смањењу липолизе и подиже гликемију, може повећати лучење и ефикасност инсулина и смањити инсулинску резистенцију.

Подаци пријављени од (20) су показали промењен метаболизам глукозе за време апликавања фармаколошке дозе никотинске киселине код преживара и то: повећање концентрације глукозе и инсулина у плазми, редуцију толеранције на глукозу и резистенцију на инсулин. Значајно повећање концентрације глукозе у крви су добили (21) након апликације никотинске киселине у дози 36 грама по крави на дан. Овакво повећање може да индукује побољшану глуконеогенетску активност на ћелијском нивоу промовисану од стране парцијалне супресије липогенезе проузроковане од никотинске киселине.

Краве које су примале ограничене оброке и које су примале фармаколошку дозу никотинске киселине као абомазалну инфузију, имале су повећану концентрацију инсулина и 4-8 часа након престанка апликације никотинске киселине. Концентрација глукозе је повећана и за време повратка концентрације НЕФА на виши ниво у крвној плазми, док концентрација инсулина следи сличан модел као концентрација НЕФА у време повратне фазе (6) указују на то да нижа концентрација НЕФА које је постигнута са апликацијом никотинске киселине код холштајн говеда на рестриктивној исхрани, побољшава одговор инсулина и искоришћење глукозе са повећањем инсулинске сензитивности, имплицирајући на то да је НЕФА у крви важан фактор за настанак инсулинске резистенције код млечних крава за време негативног енергетског биланса. Овакви резултати су подржани од студије спроведених код људи код којих се употребљава аципимох (никотинска киселина дугог дејства) када долази доредуковања НЕФА у крви, до побољшаног одговора на орални глукоза толерантан тест до побољшања инсулином стимулисаног искоришћавања глукозе од периферних ткива за време извођења хиперинсулинемијског еугликемијског клампа (20,21).

Ниацин значајно утиче на концентрацију глукозе. Повећање концентрације глукозе је било зависно од концентрације ниацина и дужине третмана. (22) наводе да је нејасан механизам којим никотинска киселина повећава концентрацију глукозе у плазми је, а то може бити резултат повећане хепатичне продукције глукозе, смањеног клиренса глукозе из крви или обоје. Концентрација инсулина у крви имала је сличну динамику кретања као глукоза. Повећање концентрације глукозе било је примећено као одговор на давање инфузије са никотинском киселином 10. и 12. дана и ово повећање је трајало један дан по прекиду третмана, а за време третмана никотинском киселином примећено је било и повећање концентрације инсулина у крви.(7) наводе да је тешко увидети да ли повећање вредности глукозе доводи до повећања инсулина или инсулинска резистенција доводи до повећања глукозе, а њихов модел се не слаже с тим да је повећања концентрације НЕФА повезана са инсулинском резистенцијом за време третмана са никотинском киселином.

Овакви различити резултати делимично се могу објаснити са различитим нивоом снабдевања са енергијом и степеном липолизе, и може се закључити да је инсулин укључен у утицај ниацина са глукозом у крви. Концентрација глукагона у студији (7) није била значајно измењена што показује на то да је његова улога веома мала или уопште је нема у ефекту никотинске киселине на гликозу у крви.

Утицај ниацина на производњу млека

У само два истраживања су испитиване концентрације ниацина у млеку код крава. Неки аутори (23) пронашли су само никотин амид, док су други (24) испитивали укупну количину ниацина и нису урадили разлику између витамера. Садржај никотина амида у млеку је био побољшан са додатком суплемента са никотинском киселином, али највиша аплицирана доза ниацина резултирала је најнижом концентрацијом ниацина у млеку. Руминална концентрација ниацина исто тако је била измерена али није нађена веза између концентрације ниацина у румену и концентрације ниацина у млеку. У многим студијама је вршено испитивање приноса млека код млечних крава након додавања суплемената ниацина пријављено је да производња млека није била значајно измењена и поред тога што је концентрација ниацина у плазми била повишена. Објашњење изостанка ефекта ниацина на млечност је та што су краве у појединим студијама биле у позитивном енергетском билансу и у различитим фазама лактације.(25) указују на то да је ниацин најефикаснији уколико се употребљава код крава у раној лактацији и у њиховој студији краве који су биле у раној лактацији и којима је било суплементирано 14 грама ниацина имале су

бољи принос млека од контролне групе. У другим студијама (26,27) нађено је повећање приноса млека након додатка суплементације ниацина у исхрани. У испитивањима где се користило 12 грама на дан ниацина заштићеног од руминалног раграђивања нису била примећена побољшања у приносу млека. Третман ниацином није имао ефекат на компоненте млека, проценат протеина у млеку, принос протеина у млеку и принос масти у млеку. У испитивањима (13) где се користио инкапсулирани ниацин као суплемент дошло је до редукције процента масти у млеку и примећена је тенденција значаја за интеракцију третман×време ($p < 0.1$) за принос масти у млеку. Ови аутори наводе да добијени подаци подржавају концепт да ниацин блокира мобилизацију масних киселина и зато редукује губитак енергије преко млека постпартално.

Литература

1. Hristovska T, Cincović R. M, Belić B, Stojanović D, Jezdimirović M, Đoković R, Toholj B. Effects of niacin supplementation on the insulin resistance in Holstein cows during early lactation. *Acta Vet. Brno, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences of Brno, Czech Republic*, Jun, 2017, 86:231-238;
2. Cincović M. R., Hristovska T., Belić B., Đoković R., Kovačević Z., Petrović M., Došenović M., Delić B.: Influence of niacin on lipid metabolism in dairy cows during early lactation. *Savremena Poljoprivreda*, 2015;64(1-2): 72-77;
3. Hristovska T, Cincović M, Stojanović D, Belić B, Kovačević Z, Jezdimirović M. Influence of Niacin Supplementation on the Metabolic Parameters and Lipolysis in Dairy Cows During Early Lactation. *Kafkas Univ Vet Fak Derg, Veterinary fakulty Kafkas*, Jun 2017; 23 (5): 773-778;
4. Niehoff I.D., Huther L., Lebzien P.: Niacin for cattle: A review. *Br. J. Nutr.* 101:5-19, 2009.
5. Pires J.A.A., Pescara J.B., Grummer R. R.: Reduction of plasma NEFA concentration by nicotinic acid enhances the response to insulin in feed-restricted Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 90:4635-4642, 2007.
6. Pires J.A.A., Souza A.H., Grummer R.R.: Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 90:2735-2744, 2007a.
7. Titgemeyer E., Spivey K., Mamedova L., Bradford B.: Effects of pharmacological amounts of nicotinic acid on lipolysis and feed intake in cattle. *Int. J. Dairy Sci.* 6:134-141, 2011.
8. Gille A., Bodor E.T., Ahmed K., Offermanns S.: Nicotinic acid: Pharmacological effects and mechanisms of action. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48:79-106, 2008.
9. Offermanns S.: The nicotinic acid receptor GPR109A (HM74A or PUMA-G) as a new therapeutic target. *Trends. Pharmacol. Sci.* 27 (7):384-390, 2006.
10. Kenéz A., Locher L., Rehage J., Dänicke S., Huber K.: Agonists of the G protein-coupled receptor 109A-mediated pathway promote antilipolysis by reducing serine residue 563 phosphorylation of hormone-sensitive lipase in bovine adipose tissue explants. *J. Dairy Sci.* 97:3626-3634, 2014.
11. Pires J.A.A., Grummer R.R.: The use of nicotinic acid to induce sustained low plasma nonesterified fatty acids in feed-restricted Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 90:3725-3732, 2007.
12. Morey S.D., Mamedova L.K., Anderson D.E., Armendariz C.K., Titgemeyer E.C., Bradford B.J.: Effects of encapsulated niacin on metabolism and production of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:5090-5104, 2011.
13. Yuan K., Shaver R.D., Bertics S.J., Espineira M., Grummer R.R.: Effect of rumen-protected niacin on lipid metabolism, oxidative stress, and performance of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:2673-2679, 2012.
14. Overton T.R., Waldron M.R.: Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J. Dairy Sci.* 87:105-119, 2004.
15. Weiss W.P., Gonzalo F.: Are your cows getting the vitamin they need? *J. WCDS advances in Dairy Technology.* 18:249-259, 2006.
16. Dufva G.S., Bartley E.E., Dayton A.D., Riddell D.O.: Effect of niacin supplementation on milk production and ketosis of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 66:2329-2336, 1983.
17. Karkoodi K., Tamizrad K.: Effect of niacin supplementation on performance and blood parameters of Holstein cows. *South African Journal of Animal Science.* 39(4), 2009.
18. Erickson P.S., Murphy M., Clark J.H.: Supplementation of dairy cow diets with calcium salts of long-chain fatty acids and nicotinic acid in early lactation. *J. Dairy Sci.* 75:1078, 1992.
19. Al-Abbasy E.G.H.: Effect of Adding Two Levels of Niacin in Milk Production and Controlling Indicators of Ketosis in Friesian Cows Postpartum. *Br. J. Dairy Sci.* 3(1):1-4, 2013.
20. Thornton J.H., Schultz L.H.: Effects of administration of nicotinic acid on glucose, insulin, and glucose tolerance in ruminants. *J. Dairy Sci.* 63:262-268, 1980.
21. Di Costanzo A., Spain J.N., Spiers D.: Supplementation of nicotinic acid for lactating Holstein cows under heat stress conditions. *J. Dairy Sci.* 80:1200-1206, 1997.
22. Pescara J.B., Pires A.A., Grummer R.R.: Antilipolytic and lipolytic effects of administering free or ruminally protected nicotinic acid to feed-restricted Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93:5385-5396, 2010.
23. Wagner K., Mockel

P., Lebzien P., Flachowsky G.: Influence of duodenal infusion of nicotinic acid on the milkfat composition of dairy cows. Arch Anim Nutr.50; 239–244, 1997. **24.** Nilson K.M., Owen F.G., Georgi C.E.: Effect of abrupt change on rumen microorganisms and the niacin and vitamin B content of rumen fluid and milk. J Dairy Sci. 50:1172–1176, 1967. **25.** Martinez N., DePeters E.J., Bath D.L.: Supplemental niacin and fat effects on milk composition of lactating Holstein cows. J. Dairy Sci. 74:202, 1991. **26.** Cervantes A., Smith T.R., Young J.W.: Effects of nicotinamide on milk composition and production in dairy cows fed supplemental fat. J. Dairy Sci. 79:105–115, 1996. **27.** Drackley J.K., LaCount D.W., Elliott J.P., Klusmeyer T.H., Overton T.R., Clark J.H., Blum S.A.: Supplemental fat and nicotinic acid for Holstein cows during an entire lactation. J Dairy Sci. 81: 201–214, 1998.

ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ III

**РЕПРОДУКЦИЈА И
ЗДРАВСТВЕНА ЗАШТИТА
ФАРМСКИХ ЖИВОТИЊА**

**INDUKCIJA I SINHRONIZACIJA ESTRUSA KRAVA - PRAKTIČNA PRIMENA U
MENADŽMENTU REPRODUKCIJE NA MLEČNIM FARMAMA**

**INDUCTION AND SYNCHRONIZATION OF ESTRUS IN BOVINE - PRACTICAL APPLICATION
IN THE MANAGEMENT OF REPRODUCTION IN DAIRY FARMS**

*Toni Dovenski¹, Branko Atanasov¹, Igor Esmerov¹,
Boris Stojanov², Besir Jašari³, Milan Maletić⁴*

¹Fakultet veterinarske medicine Skopje, R. Makedonija; ²Veterina Centar Strumica, R. Makedonija;

³Ministarstvo za zemjodjelstvo, šumarstvo i vodostapanstvo, Skopje, R. Makedonija;

⁴Fakultet veterinarske medicine Beograd, R. Srbija

Kratak sadržaj

Reproduktivna efikasnost krava sa intenzivnom proizvodnjom mleka, može biti smanjena usled uticaja raznih bioloških ili menadžerskih faktora. Postoji veliki broj metoda koje mogu da se primene u terapiji i/ili prevenciji ovakvih stanja, koje su više ili manje uspešne. Od njih, svakako najčešće primenjivane su metode indukcije i sinhronizacije estrusa i ovulacije, sa ili bez fiksnog vremena V.O. Predstavljen je veliki broj hormonalnih metoda, koje se baziraju na primenu progestagena, gonadotropina, gonadotropnih-releasing hormona, prostaglandina, najčešće u međusobnoj kombinaciji. Najosnovniji protokol za sinhronizaciju je skraćenje lutealne faze estralnog ciklusa primenom prostaglandina (PgF₂α), jednokratnom ili dvokratnom aplikacijom u razmaku od 11-14 dana. Efikasnost indukcije sinhroniziranog estrusa je visoka kod ciklirajućih, ali razočaravajuća kod anovulatornih jedinki. Produženje lutealne faze u cilju sinhronizacije estrusa postiže se primenom sintetskih progestagena u kombinaciji sa estrogenima (CIDR, PRID, Crestar, Synchro-Mate B metode). Uspešnost ovih protokola je veoma dobra, ali nedostaci su visoka cena i moguće rezidue steroida u mleku i mesu. Konačno, najrasprostranjeniji od svih je primena protokola, koji se zasniva na kombinaciji dva osnovna hormona GnRH i PgF₂α. Ranije se nazivao GPG metod (Gonadotropin-releasing 0.dan; Prostaglandin 7. dan; Gonadotropin-releasing 9.dan). Danas postoje brojne modifikacije osnovnog protokola (PreSynch, COSynch, Select Synch, Hybrid Synch, Heat Synch) koji mogu poboljšati procenat uspešnosti koncepcije krava. Moguće prednosti i nedostaci, kao i preporuke u kojim situacijama je indikovana njihova primena, biće elaborirane u ovom revijalnom radu. Konačni cilj ovog predavanja je da doktorima veterinarske medicine koji primenjuju ili nameravaju primeniti protokole sinhronizacije, pomogne u izboru najodgovarajućeg u različitim situacijama na farmama, imajući u vidu da nijedan nije idealna ili univerzalna.

Ključne reči: Sinhronizacija estrusa, GnRH, PgF₂α, menadžment reprodukcije, krava

Abstract

Reproductive efficacy in cows undergoing intensive milk production can be suboptimal due to the influence of various biological or management factors. There are numerous of methods that can be used in the treatment and/or prevention of such conditions, which are more or less effective. The most commonly used methods of induction and synchronization of estrus and ovulation, with or without timed-AI (TAI). Plenty of hormonal methods based on the use of progestagens, gonadotropins, gonadotrophin-releasing hormone, prostaglandins, most commonly in their combination, has been referred. The most basic synchronization protocol is the shortening of the luteal phase of the Oestrus cycle using prostaglandin (PgF₂α), single or double application at 11 days interval. The efficacy of synchronized

estrus induction is high in cycling but disappointing in anovulatory animals. An extension of the luteal phase for the oestrus synchronization is achieved by the use of synthetic progestagen in combination with estrogens (CIDR, PRID, Crestar, Synchro-Mate B methods). The successfulness of these protocols is very high, but the disadvantages are the high price and possibility for residual steroids in milk and meat, which is why they are prohibited by the 88/146/EEC directive in the EU and some other countries. Finally, the most widespread of all is the application of the protocol, which is based on the combination of two reproductive hormones GnRH and PgF₂ α . Earlier it was called the GPG method (Gonadotropin-releasing day 0.; Prostaglandin 7th Day; Gonadotropin-releasing 9th day). Today, there are a number of modifications of the basic one (PreSynch, COSynch, Select Synch, Hybrid Synch, Heat Synch) that can improve the percentage of cow's pregnancy rate. Possible advantages and disadvantages, as well as recommendations in which situations their application is indicated, will be elaborated in this review article. The ultimate goal of the lectures is to help to veterinary medicine practitioners who are applying or intending to apply synchronization protocols, in selection of the best fit method for them for different farm situations, bearing in mind that none is ideal or universal.

Key words: estrus synchronization, GnRH, PgF₂ α , reproductive management, cow

Uvod

Reproduktivni kapaciteti mlečnih krava evidentno su smanjeni širom sveta u poslednjih nekoliko decenija (Lucy 2007, Opsomer 2013). U svojim kritičkim pregledima Rodriguez-Martinez i sar. (2008, 2012, 2013) ustanovili su da je ovako niski nivo plodnosti kod mlečnih krava uslovljen nizom faktora: nedovoljno posvećena pažnja selekciji za dugovečnost, zdravlje i plodnost u genetskim programima; međusobno povezani faktori kao što su negativni energetske bilans (NEB), intezitet proizvodnje mleka u laktaciji, teška telenja, zadržavanje posteljice, blizanački graviditet, mrtvorodena telad i endometritisi; kao i neadekvatna pažnja kontrole telesne kondicije, ishrane, reproduktivnog zdravlja, zaraznih bolesti koje utiču na plodnost, komfor u smeštaju životinja.

Trend istraživanja i usluga koje se pružaju farmerima zadnjih godina je da budu usmerene na programe upravljanja reprodukcijom koji prevazilaze reproduktivne procese, a umesto toga koordiniraju više disciplina kao što su fiziologija, ishrana, zdravlje, upravljanje proizvodnim resursima i genetikom. Danas farmeri u mlečnoj industriji imaju višestruki izbor u pristupu koordinacije potreba krava sa visokom proizvodnjom mleka, s ciljem poboljšanja reproduktivne efikasnosti. Svakako, holistički pristup reproduktivnom menadžmentu je sada veoma aktuelan i dalje će se poboljšavati putem stalnog napretka u tehnologiji.

Da bi postigli zadovoljavajuće rezultate, od ključnog značaja je da farmeri-proizvođači mleka, osoblje na farmi, nutricionisti i veterinari razumeju dobro fiziološke razloge zbog kojih određene komponente programa za menadžment reprodukcije mogu poboljšati reproduktivne performanse ili suprotno od toga, kako nerazumevanje principa programa može dovesti do veoma loših rezultata u koncepciji krava. Nijedan program razmnožavanja u reprodukciji nije univerzalno praktičan i ekonomski optimalan za sve farmere zbog razlika u menadžmentu stada, opreme i uslova smeštaja životinja, veličine izmuzišta, koliki značaj zauzimaju problemi u reprodukciji, kao i upotreba funkcionalno dinamičnog sistema evidencije na farmi. Ono što je od suštinskog značaja je implementacija optimalnih programa koji odgovaraju trenutnom sistemu menadžmenta dnevnih operativnih funkcija, a koji su sa druge strane zaista ekonomični za ispunjavanje ciljeva mlečne farme (Ribeiro i sar., 2012b). Ovi optimizovani programi postali su programi fertlnosti, pre svega protokoli sinhronizacije estrusa i ovulacije, koji postižu više nego samo veštačko osemenjavanje svih jedinki na farmama.

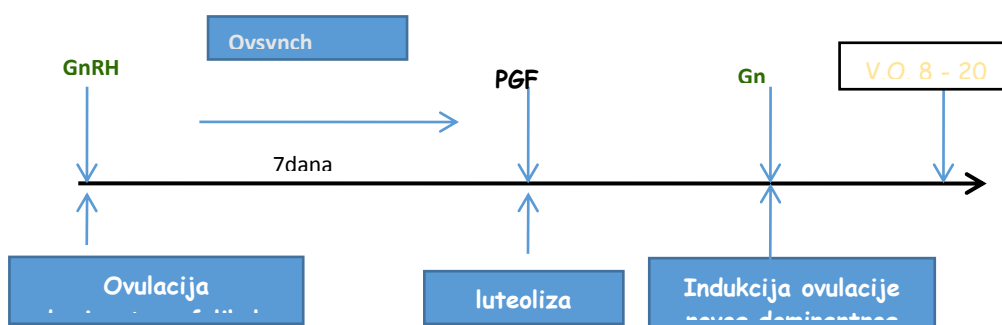
Protokoli sinhronizacije koji su u upotrebi na farmama mlečnih krava

Osnovne principi manipulacije estralnim ciklusom krava, objašnjeni su ranije u radovima Thatcher-a i sar. 2006, Gvozdića i sar. 2013, Dovenski i sar. 2013. Tradicionalne metode sinhronizacije estrusa (npr. jednokratno davanje prostaglandina i 12-dnevni progestagenski programi) su dizajnirani da sinhronizuju estrus, ali generalno da bi se optimizovalo vreme osemenjavanja i povećao procenat steonosti, još uvek je potrebno otkrivanje estrusa. Kao izuzetak od ovog pravila, kod junica se može

primeniti davanje dve injekcije prostaglandina u razmaku od 11 dana i osemeliti ih 72. i 96. časova kasnije, ili alternativno 72 h, a zatim intenzivno praćenje za pojavu estrusa za još 3 - 4 dana da bi otkrili one koji kasnije ulaze u estrus, kao odgovor na stojeći estrus (koristeći pravilo jutro-veče). Kod krava ovaj protokol zahteva otkrivanje estrusa nakon druge injekcije prostaglandina.

Programi sinhronizacije ovulacije su dizajnirani da olakšaju upotrebu fiksnog vremena za V.O. u stadu mlečnih krava, bez značajnog trošenja vremena i rada za detekciju estrusa. Oni su razvijeni devedesetih godina (Pursley i sar. 1995) i unapređuju se do današnjih dana. Prikladniji su za velika stada koja nemaju sezonu parenja, a gde je period između telenja manje relevantan za ekonomske performanse stada, pa se često dozvoljava da bude i 400-420 dana.

Glavna karakteristika osnovnog protokola za sinhronizaciju ovulacije OVSYNH (sl.1) je to da stepen koncepcije jednokratnog OVSYNH-a je skromnih oko 30% (Cordoba i Fricke 2002; Jobst i sar. 2000) a za evropski kontekst je relativno skup.



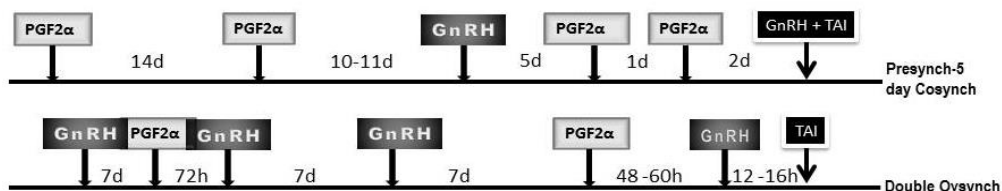
Slika 1. Osnovni OvSynch protokol za sinhronizaciju estrusa i ovulacije (Dovenski i sar. 2013)

Razvijene su strategije za poboljšanje procenta koncepcije (npr. Dvostruki Ovsynch i presinhronizacija - sinhronizacija ovulacije (PRESYNCH-) koje su prihvatljive za mnoge američke farme (46 i 41% stepen koncepcije, respektivno (Herlihi i sar., 2012), ali mogu prouzrokovati znatne troškove u smislu utroška vremena, troškova lekova i sl.

U stadima goveda koji se razmnožavaju sezonski, vreme tretmana koje je potrebno za PRESYNCH-OVSYNCH i Double OVSYNCH protokol je predugo u odnosu na procenat koncepcije koje se postiže. Programi zasnovani na progesteronu (npr. 7 ili 8-dnevni protokol), uz upotrebu GnRH na početku i PGF na kraju tretmana (7. dan) daju bolje rezultate u smislu sinhronizacije i % steonosti kod zdravih krava (McNally i sar. 2014).

Dva najnaprednija sistema koji su u širokoj praksi na velikim aglomeracijama visokoproduktivnih krava su Presynch-5. dan Cosynch i Double Ovsynch TAI (*Timed Artificial Insemination*) programi (Slika 2). I jedan i drugi program regulišu polni ciklus kako bi se povećala plodnost subfertilnih krava u laktaciji, smanjujući dominaciju folikula i održavajući progesteronsku ravnotežu između injekcija GnRH i PGF, poboljšanjem kompletne regresije CL pre 2. GnRH injekcije i optimizacijom vremenskog termina za V.O. u odnosu na injekciju GnRH. Programiranje faze estrogenog ciklusa na rani diestrus (npr. 5-9. dana estralnog ciklusa) kada su modifikovani protokoli implementiraju, integrirali su višestruke efekte; posebno povećana verovatnoća da će: 1) prva injekcija GnRH izazvati ovulaciju folikula iz prvog talasa i posledično početak novog talasa folikularnog rasta; 2) postojanje adekvatne lutealne koncentracija progesterona tokom perioda između prve injekcije GnRH i injekcije PGF, 3) CL je prisutan da odgovori na injekciju PGF koja dovodi do luteolize, 4) proces luteolize je završen u vreme aplikacije GnRH i/ili TAI, 5) kvalitetan oocit je programiran za odgovarajući vremenski period potreban za oplodnju i 6) postoji naknadni razvoj robusnog žutog tela za održavanje graviditeta. Svakako, ovulacija folikula iz prvog talasa izazvana GnRH-om, rezultira prisustvom i originalnog CL, kao i akcesornog CL u trenutku davanja PGF-a.

Ova dva sistema definitivno unapređuju koncepciju posle vremenski tempiranog V.O., dok sa druge strane pružaju i alternative proizvođačima koji od njih najbolje odgovaraju njihovim menadžerskim sistemima. Direktno upoređivanje programa Presynch-7 dana, Ovsynch i Double Ovsynch TAI programa daje slične rezultate uspešno uspostavljenog graviditeta u multiparnih mlečnih krava (Herlihi i sar., 2012). Zapravo, koncepcija posle V.O. bila je veća kod primiparnih krava podvrgnutih Double Ovsynch programu najverovatnije zbog indukovanja cikličnosti i graviditeta kod anovulatornih krava. Upoređivanje Presynch-5 dana Cosynch i Double Ovsynch protokola koji su uključivali 5-dnevni Cosynch dali su slične rezultate steonosti/TAI i nisu otkrivene nikakve razlike između primiparnih i višeparnih krava koje se bile čuvane na pašnom sistemu (Ribeiro i sar., 2012a).



Slika 2. Presynch-5. dan Cosynch i Double Ovsynch TAI program (Ribeiro i sar 2012)

Sinhronizacija estrusa i ovulacije

Sa gledišta veterinarske medicine, manipulacija estrusnim ciklusom i kontrola ovulacije se javlja kao dobra kratkoročna strategija. Detaljna ispitivanja su pravljena u vezi primene metoda za kontrolu razvoja folikularnog rasta, izazivanja ovulacije kod anestričnih krava, regresije žutog tela kod cikličnih krava i sinhronizacija estrusa i ovulacije na kraju tretmana, pre V.O. (na spontanom ili očekivanom estrusu) ili parenja. Međutim, većina ovih metoda podrazumeva upotrebu hormona (estradiol, P4, GnRH, PGF2a) koji se primenjuju različitim režimima tretmana i različitim intenzitetima. Zbog velike varijacije između zemalja u vezi sa dostupnošću i propisima ovih tretmana, teško je uzeti u obzir ovu alternativu kao generalnu i lako izvodljivu strategiju. Slična situacija se odnosi na upotrebu egzogenog rekombinantnog somatotropina bovine (rbST) oko V.O. ili egzogenog P4 nakon ovulacije, kako bi se povećali očekivani nizak nivo IGF-I ili P4, respektivno. Oba hormona su već zabranjena, ili javno mnenje sprečava njihovu primenu. S druge strane, njihovu upotrebu komplikuje i poskuplje potreba za višestrukim aplikacijama i prisustvo veterinara (ponekad regulirano i zakonom), kao i troškovima za lekove. Štaviše, još uvek ne možemo predvideti i eventualne dugoročne efekte hormonskih manipulacija na genetiku, čime maskiramo naše mogućnosti da bezbedno selektiramo najbolje krave.

Iako su dostupni brojni programi za sinhronizaciju ovulacije sa tempiranim vremenom za V.O. kod mlečnih krava, ograničenja u upotrebi lekova za farmske životinje umanjile su opcije za manipulaciju estralnog ciklusa krava u mnogim zemljama (Lane i sar., 2008). Od početnog objavljivanja Ovsynch protokola (dan 0 GnRH, dan 7. prostaglandin (PG) F2a, dan 9 GnRH, dan 10. vremenski tempirano V.O.; Purslei i sar., 1995), programi zasnovani na GnRH i PGF2a su korigovani radi poboljšanja kontrole razvoja folikula, trajanja funkcionalnosti lutealnog tkiva i ovulacije oko vremena za V.O. Ovulacija do prve injekcije GnRH poboljšava sinhronizaciju estralnog ciklusa i smanjuje period folikularne dominacije, što rezultira boljom koncepcijom (Vasconcelos i sar., 1999; Bleach i sar., 2004; Santos i sar., 2010a). Kompletna luteoliza nakon PGF2 aplikacije i vreme poslednje aplikacije GnRH su takođe kritični da bi krave imale odgovarajući period proestrusa, kada se odvija priprema materice za uspostavljanje graviditeta i završna faze sazrevanja folikula (Ribeiro i sar., 2012b).

Konačno, plodnost se menja intervalom između indukcije ovulacije sa drugim GnRH i V.O. (Purslei i sar., 1997), jer određuje „prozor“ tokom kojeg oocit i spermatozoidi su sposobni za fertilizaciju (Saacke, 2008). Nažalost, Ovsynch program ima ograničenja jer njegova sposobnost da sinhronizuje rast folikula sa ovulacijom nakon početnog GnRH, koji je apliciran u slučajnim fazama estralnog ciklusa, obično je 50% do 60%, ili do 70% kada mu predhodi presinhronizacija (Bisinotto i Santos, 2012; Ribeiro i sar., 2012a). Čak i kad su bile krave presinhronizovane sa dva uzastopna protokola (Double OvSynch),

ovulacija posle prvog GnRH kod završnog OvSynch-a je bio <72% (Souza i sar., 2008; Giordano i sar., 2013). Drugo ograničenje ovih programa je nemogućnost jedinačne doze PGF2a da indukuje potpunu regresiju žutog tela. Da bi se postigao visok procenat steonosti, koncentracija progesterona na dan tempiranog osemenjavanja mora biti jako niska, idealno ispod 0.3 ng/mL (Santos i sar., 2010a); međutim, PGF2a administriran kao jednokratna doza 7. dana ili kao dve doze 5. i 6. dana nakon GnRH obično rezultira da samo 70% do 84% krava ima progesteron <0,3 ng/mL na dan predviđenog V.O. (Santos i sar., 2010a, Giordano i sar., 2013).

Na kraju, iako je ovulacija sinhronizovana između 24 i 32 h posle konačne injekcije GnRH (Purslei i sar., 1995), nikada nisu sve krave u sinhronizovanoj ovulaciji, obično u proseku oko 85% (Santos i sar., 2010a), a ovaj procenat je čak i niži kada su krave izložene toplotnom stresu, zbog pretpostavljenih štetnih efekata hipertermije na ovulaciju (Lopez-Gatius i sar., 2005). Osim toga, stado sa povećanom prevalencijom peripartalnih bolesti imaju niži odgovor na sinhronizacijske programe, usled povećane prevalencije anovularnih krava, smanjene fertilizacije i poremećaja razvoja embriona, što na kraju vodi do niže koncepcije i povećane rane embrionalne smrtnosti (Santos i sar., 2010b; Ribeiro i sar., 2013).

Optimizacija programa za tempirano V.O.

Programi za presinhronizaciju prvog V.O. postpartum

Odgovor na protokol je bolji kod krava koje dobijaju prvu injekciju GnRH tokom ranog diestrusa (Vasconcelos i sar., 1999; Bello i sar., 2006). Krave tretirane između 5. i 9. dana estralnog ciklusa imaju bolji ovulacioni odgovor i najverovatnije će imati CL kada se aplicira PGF2a da bi se izazvala sinhrona ovulacija kao odgovor na završni tretman GnRH (Vasconcelos i sar., 1999). Ipak, ovulacija kao odgovor na inicijalni GnRH zavisi od prisustva folikula koji je sposoban da odgovori na LH stimulaciju.

Pošto ~70% mlečnih krava u laktaciji imaju estralni ciklus koji se sastoji od dva folikularna talasa (Townson i sar., 2002), tretman sa GnRH u slučajnim fazama ciklusa estrusa izazivaju ovulaciju kod 50% do 60% krava (Bisinotto i Santos, 2012; Ribeiro i sar., 2012a). Zbog toga, presinhronizacija estralnog ciklusa je razvijena kako bi što ranije došli do prvog *postpartum* osemenjavanja jedinki, tako da se i procenat koncepcije posle završetka protokola bude što bolji (Moreira i sar., 2001). Najčešće upotrebljavan metod za presinhronizaciju estrusa kod krava pre tempiranog V.O. je uzastopna aplikacija dva doze PGF2a u razmaku od 14 dana, a 12 dana kasnije se počinje sa protokolom (Moreira i sar., 2001; El-Zarkouni i sar., 2004). Ova metoda je postala vrlo popularna jer poboljšava procenat koncepcije, ali takođe nudi fleksibilnost da omogući osemenjavanje krava na farmama koje odluče da ne sprovedu tempirano osemenjavanje svih krava (Chebel i Santos, 2010). Uključivanje CIDR-a (intravaginalnog kontrolisano oslobađanje lekova) koji sadrži progesteron tokom presinhronizacije nije rezultirala značajnim poboljšanjem plodnosti (Chebel i sar., 2006; Rutigliano i sar., 2008). Kada analiziramo sve rezultate, možemo zaključiti da mlečne krave podvrgnute presinhronizacijskim programima zasnovanim na PGF2a, imale su 42% veće mogućnosti da postanu gravidne u poređenju sa kravama koje nisu podvrgnute presinhronizaciji pre protokola za tempirano V.O. (odnos kvota (OR) = 1,42, 95% CI = 1,23 do 1,64; Bisinotto i Santos, 2012). Program PreSynch je originalno dizajniran za 12-dnevni interval između presinhronizacije i prvog GnRH protokola (Moreira i sar., 2001). Međutim, na mnogim farmama se koristi 14 dnevni interval, da bi se injekcije PGF2a aplicirala isti dan u nedelji kao i ona kod ovsynch-a. Ipak trebalo bi imati na umu da je ovulacija kao odgovor na GnRH optimalna kada su krave u ranom diestrus-u, odnosno između 5. i 9. dana estralnog ciklusa (Bisinotto i Santos, 2012). Zbog toga, interval od 11 dana je predložen kao najbolji (Galvao i sar., 2007). Galvao i sar., 2007 su dokazali da Presinhronizacijski protokol u trajanju od 11 dana rezultira boljim ovulacionim odgovorom posle prvog GnRH tretmana u -u i bolje rezultate koncepcije nakon V.O. u poređenju sa Presynch od 14 dana.

Glavno ograničenje presinhronizacije bazirane na PGF2a programima su nemogućnost poboljšanja plodnosti kod anovularnih krava, koje predstavljaju oko 41% mlečnih krava na kraju servis perioda (Walsh i sar., 2007; Santos i sar., 2009). Potencijalno obećavajući sistem za poboljšanje plodnost u ovoj podgrupi krava je uključivanje GnRH tokom presinhronizacije. Shodno tome, upotreba GnRH zajedno sa PGF_{2α} pokazalo je zadovoljavajuće povećanje nivoa plodnosti, odn. koncepcije nakon V.O. (OR = 1,65, 95% CI = 1,42 do 1,93; Bisinotto i Santos, 2012). Zapravo, presinhronizacija estralnog

ciklusa sa kombinacijom PGF2a i GnRH - protokolom nazvan kao G6G (Bello i sar., 2006), povećava fertilitnost u poređenju sa kravama podvrgnutim protokolu sa vremenski tempiranim V.O., uključujući dodatni progesteronski tretman sa CIDR-om (Ribeiro i sar., 2012a).

Precizniji metod za predsinhronizaciju estrusa mlečnih krava, koji takođe podstiče cikličnost kod anovulatornih krava je upotreba dvostrukog Ovsynch programa (Aires i sar., 2013).

Da bi se uporedio dvostruki Ovsynch sa Presynch-Ovsynch protokolom, za upravljanje prvim osmenjavanjem mlečnih krava postpartum, napravljena su tri eksperimenta. Dva od njih su pokazala da je korišćenje dvostrukog Ovsynch-a na farmama krava s visokom proizvodnjom daje pozitivne rezultate, dok treći nije dokazao nikakvu razliku između ova dva programa kod krava držanih na pašnjacima. U prvoj studiji, sinhronizacija ovulacije sa dvostrukim Ovsynchom poboljšava procenat koncepcije kod primiparnih, ali ne i kod multiparnih krava u poređenju sa Presynch-Ovsynch (Souza i sar., 2008). Druga, veća studija obavljena na tri velike visoko-proizvodne farme pokazala je da dvostruki Ovsynch povećao procenat steonosti sa 38,2% na 46,3% u poređenju sa Presynch-Ovsynch (Herlihi i sar., 2012). Konačno, treća velika studija koja je uključila tri mlečna stada krava, držana sezonski na pašnjacima, rezultiralo je sličnim rezultatima plodnosti kada su krave podvrgnute dvostrukom Ovsynch upoređujući ih sa Presynch-Ovsynch protokolom (Ribeiro i sar., 2012b). Zbog toga, ako trebamo osemeniti sve krave u fiksirano vreme za V.O., ili ako stado ima visoku prevalenciju anovularnih krava, izbor programa bi trebao biti dvostruki Ovsynch protokol za prvo osmenjavanje postpartum. Međutim, u zapažanjima u kojima je prevalencija anovulacije niska i proizvođači žele fleksibilnost kako bi takođe osamenjavali krave u prirodnom estrusu, tada bi trebalo razmotriti upotrebu Presynch-Ovsynch protokola.

Dodavanje progesterona tokom protokola tempiranog V.O.

Izložnost lutealnim koncentracijama progesterona tokom rasta dominantnog folikula utiče na kasnije uspostavljanje graviditeta. Iako precizna koncentracija progesterona koja povećava plodnost ostaje još uvek nedefinisana, treba očekivati pozitivan učinak dodavanja progesterona tokom sinhronizacionih programa za većinu visoko-produktivnih krava na farmi (Bisinotto i Santos, 2012). Krave koje nemaju CL na prvoj aplikaciji GnRH tokom protokola tempiranog V.O., u koje spadaju anovularne i ciklične krave tretirane tokom proestrusa, estrusa ili metestrusa, imaju manju koncentraciju progesterona u poređenju sa onima koji imaju CL kada počinje sinhronizacioni protokol (0.5 nasuprot 3.4 ng/mL; Bisinotto i sar., 2013). Ova grupa krava predstavlja obično 30% svih jedinki podvrgnutim tempiranom V.O. na jednoj farmi. Odsustvo žutog tela na početku protokola tempiranog V.O. je zapravo veliki ograničavajući faktor za dobre rezultate koncepcije, bez obzira da li je krava anovularna ili ne (Bisinotto i sar., 2010a). Neka istraživanja su pokazala da je za adekvatna plodnost tokom Ovsynch protokola potrebno da koncentracija progesterona bude najmanje 2.5 do 3.0 ng/mL (Denicol i sar., 2012; Bisinotto i sar., 2013).

Čak i kada imamo nalaz žutog tela na jajnicima, koncentracija progesterona u plazmi je niži kod krava u laktaciji ~ 1,5 ng/mL, od onih kod junica (Sartori i sar., 2004). Pretpostavlja se da je smanjena koncentracija progesterona verovatno prouzrokovana povećanim katabolizmom steroida u intersticijalnim tkivima (Wiltbank i sar., 2006). S druge strane, niski nivo P4 može biti povezan i sa slabijim kvalitetom embriona (Sartori i sar., 2002), što se smatra jednim od glavnih razloga za smanjene procenta steonosti kod mlečnih krava (Wiltbank i sar., 2006). Postoji dovoljno dokaza da je upotreba CIDR-a koji sadrži progesteron, apliciranog od prvog GnRH do PGF2a kod protokola tempiranog V.O., povećava koncepciju za 17.9% u poređenju sa kontrolnom, netretiranom grupom krava (34,2% v. 29,6%), a efekat dodavanja progesterona je bio sličan kod krava sa žutim telom i kod onih bez njega (Bisinotto i sar., 2014). Pored toga, koncepcija kod krava bez žutog tela, tretirane CIDR-om je bila niža nego kod netretiranih krava koje su imale žuto telo na početku programa tempiranog V.O. (29,0% v. 32,0%). Činjenica je da aplikacija jednog progesteronskog implanta u ovim programima daju bolju koncepciju kod krave koje nemaju CL prilikom prve injekcije GnRH, ali ne na istom nivo plodnosti kao i kod disetrusnih krava, što je verovatno vezano za količinu oslobođenog progesterona. CIDR oslobađa ~90 mg progesterona/dan, što povećava koncentraciju u plazmi visoko-produktivnih krava u laktaciji za ~0,8 do 1 ng/mL (Cerri i sar., 2009, Lima i sar., 2009).

Bisinotto i sar. (2013) su uočili da uključivanje dva CIDR implanta tokom protokola tempiranog V.O. za krave bez CL, povećava koncentraciju P4 u plazmi na 2,65 ng/mL i dostiže plodnost

sličnu onoj kod krava u diestrusu na početku protokola. Do sličnih nalaza su došli Lima i sar. (2009) i Denicol i sar. (2012).

Stoga, kada se dodatni progesteron mora koristiti kod visoko produktivnih krava, preporučuje se da se postigne koncentracija progesterona u krvi slična onima kod krava u diestrusu, ali u nekim slučajevima su potrebna dva intravaginalna implanta da bi postigli takve koncentracije.

Koordinacija između sistema ishrane i reproduktivnog menadžmenta

Predloženo je više različitih strategija za prevazilaženje nedostatka hranljivih materija u *postpartum* periodu. Ishrana koja promovira sintezu glukoze i povećavaju koncentracije insulina u krvi pogođuju ranijem povratku cikličnosti i indukciji prve ovulacije *postpartum*, ali nisu povećali sveukupnu reproduktivnu efikasnost (Thatcher i sar., 2011). Slično tome, dopunjivanje obroka mlečnih krava sa nezasićenim masnim kiselinama (npr. konjugovane linoleinske kiseline) koje smanjuju sintezu mlečnih masti i smanjuje energetske potrebe za proizvodnju mleka, pa samim tim povećava produkciju mleka (Hutchinson i sar., 2012) i dovodi do ranije ovulacije (Casaneda-Gutierrez i sar., 2007), ali nema uticaja na uspostavljanje graviditeta (de Veth i sar., 2009; Hutchinson i sar., 2012).

Promena perioda dominacije folikula i optimizacije prečnika ovulatornog folikula

Jedan od načina ograničavanja perioda dominacije folikula jeste smanjivanje intervala između prvog GnRH i indukovane luteolize od 7 na 5 dana (Santos i sar., 2010). Kod mlečnih i tovnih krava, smanjujući interval između prvog GnRH-a i indukcije luteolize sa PGF_{2a}, sa 7 na 5 dana skraćuje se period razvoja antralnog folikula za 2 dana, što dovodi do povećanja procenta koncepcije (Bridges i sar., 2008; Santos i sar., 2010). Osim smanjenja perioda dominacije folikula, 5-dnevni protokol je rezultirao ovulacijom folikula koji su bili ~ 1,5 mm manji u prečniku (17,1 nasuprot 18,5 mm, Santos i sar., 2010). Zaključak je da je koncepcija primenom ovog protokola optimizovana kod visoko-produktivnih Holstein krava kada prečnik preovulatornog folikula nije ni previše mali niti prevelik (Wiltbank i sar., 2011). Manji prečnik folikula izgleda da ne utiče na plodnost krava osemenjenih u estrusu, ali kada su folikuli sa prekomerno velikim dijametrom koncepcija je obično smanjena zbog produžetka vremena njegove dominacije (Wiltbank i sar., 2011). Međutim, za krave osemenjene nakon fiksiranog vremena za V.O. izgleda da je idealan prečnik folikula između 15 i 19 mm (Souza i sar., 2007). Nažalost, manipulacija estrusnim ciklusom metodama koje su u širokoj praksi i dalje rezultira velikom varijabilnošću u prečniku predovulacijskog folikula, delom zbog niskog ovulatornog odgovora na inicijalni GnRH i varijabilne koncentracije progesterona tokom rasta pre-ovulatornog folikula.

Stoga, sve dok se protokoli ne razviju toliko dobro da se kod više od 70% krava pojavi novi folikularni talas u prvih 2 dana nakon iniciranja protokola za tempirano V.O., tako da se visoka koncentracija progesterona zadrži do indukcije luteolize, malo je verovatno očekivati konzistentnost u veličini preovulatornog folikula krava podvrgnutih Ovsynch protokolu (Bisinotto i sar. 2014).

Zaključci:

- Visoko efikasni programi sa planiranim vremenom za prvo V.O., kako i za ponovljena osmenjavanja primenjuju se i na kravama sa dobrom plodnošću, ali i za one subfertilne krave, poboljšavajući reproduktivne performanse stada.
- Najčešće primenjivani program je OVSYNCH, sa raznim modifikacijama koje imaju za cilj prilagoditi se konkretnom farmskom menadžmentu, tj. uobičajenom operativnom sistemu.
- Holistički pristupi povezuju reproduktivni menadžment sa ishranom, metaboličkim statusom i zdravljem što može stvoriti nove programe za reprodukciju u bliskoj budućnosti.
- supstitucija energijom u ishrani zasušениh krava (*prepartum*) smanjuje drastične promene u gubitku telesne kodicije, povećava efikasnost tranzicionog perioda i smanjuje intervale do prvog V.O. i ponovnog graviditeta.
- Specifični nutritivni pristupi kroz manipulaciju ishrane će povećati proizvodnju mleka i plodnost putem optimizacije energetskog unosa, imunološke funkcije, osetljivosti pojedinih tkiva (npr.

mlečne žlezde, materice/jajnika, konceptusa i koordinacije perifernih tkiva [jetre, masnog tkiva i mišića] tokom kritičnih fizioloških perioda).

Literatura:

1. Atanasov B., De Koster J., Bommelé L., Dovenski T., Opsomer G., Pathways of the dominant follicle after exposure to sub-luteal circulating progesterone concentrations are different in lactating dairy cows versus non-lactating heifers, *Anim Reprod Sci.* 2015;154:8-15. 2. Atanasov B. Dovenski T., Formation of accessory corpus luteum in the ronzation protocol increases blood glucose level during negative energy balance in dairy cows, 3. International congress VetIstanbul Group, p.49, Sarajevo BiH, 2016. 3. Atanasov B., Trbogazov Z., Ilievska K., Nikolovski M, Petkov V., Dovenska M., Adamov N., Dovenski T. Conception rate from first AI in cows submitted to three different synchronizations protocols: a single PGF2 α injection, and modified , *Proceed. 7th International Scientific Meeting - Days of Veterinary Medicine 2016*, p. 31-32, Struga, R. Macedonia. 4. Bello NM, Steibel JP and Pursley JR 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 3413–3424. 5. Bisinotto R. S., Ribeiro E. S. and Santos J. E. P. Synchronisation of ovulation for management of reproduction in dairy cows; *Animal* (2014), 8:s1, pp 151–159. 6. Castaneda-Gutierrez E, B.C. Benefield, M.J.de Veth, N.R. Santos, R.O. Gilbert, W.R. Butler, D.E. Bauman. 2007. Evaluation of the mechanism of action of conjugated linoleic acid isomers on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:4253–4264. 7. Cerri RLA, Rutigliano HM, Bruno RGS and Santos JEP 2009b. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Animal Reproduction Science* 110, 56–70. 8. Cordoba MC, Fricke PM. Initiation of the breeding season in a grazing-based dairy by synchronization of ovulation. *J Dairy Sci.* 2002;85:1752–63. 9. de Veth M J, D.E. Bauman, W. Koch, GE. Mann, A.M. Pfeiffer, W.R. Butler. 2009. Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: A multi-study analysis in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:2662–2669. 10. Denicol AC, Lopes G Jr, Mendonça LG, Rivera FA, Guagnini F, Perez RV, Lima JR, Bruno RG, Santos JEP and Chebel RC 2012. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95,1794–1806. 11. Dovenski T., Celeska I., Trbogazov Z., Jashari B., Ilievska K., Atanasov B., Monitoring of the ovulatory response to the first GnRH injection and luteolysis rate in cows submitted to modified protocol, *Proceed. ICAR 2016 Tours France*, p.495. 12. Giordano JO, Wiltbank MC, Fricke PM, Bas S, Pawlisch R, Guenther JN and Nascimento AB 2013. Effect of increasing GnRH and PGF2 α dose during double-Ovsynch on ovulatory response, luteal regression, and fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 80, 773–783. 13. Gvozdić D., Dovenski T., Stančić I., Stančić B., Božić A., Jovanović I., Atanasov B., Šuluburić A., 2013, Hormonal methods for estrous cycle manipulation in dairy cows, *Contemporary Agriculture*, 62 (3-4) 319-332. 14. Herlihy M.M., J.O. Giordano, A.H. Souza, H. Ayres, R.M. Ferreira, A. Keskin, A.B. Nascimento, J.n. Guenther, J.M. Gaska, S.J. Kacuba, M.A. Crowe, S.T. Butler, and M.C. Wiltbank. 2012. Presynchronization with Double- improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:7003-7014. 15. Hutchinson I. A. , A. A. Hennessy, R. J. Dewhurst, A. C. O. Evans , P. Lonergan, and S. T. Butler. 2012 The effect of strategic supplementation with trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on the milk production, estrous cycle characteristics, and reproductive performance of lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 95 :2442–2451. 16. Jobst SM, Nebel RL, McGilliard ML, Pelzert KD. Evaluation of reproductive performance in lactating dairy cows with prostaglandin F2 α , gonadotropinreleasing hormone, and timed artificial insemination. *J Dairy Sci.* 2000;83:2366–72. 17. Lane EA, Austin EJ and Crowe MA 2008. Oestrous synchronisation in cattle – current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food producing animals: a review. *Animal Reproduction Science* 109, 1–16. 18. Lima JR, Rivera FA, Narciso CD, Oliveira R, Chebel RC and Santos JEP 2009. Effect of increasing amounts of supplemental progesterone in a timed artificial insemination protocol on fertility of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92, 5436–5446. 19. Lucy M.C. Fertility in high-producing dairy cows: Reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement, 2007 *Society of Reproduction and Fertility suppl.* 64(1):237-54 20. McNally JC, Crowe MA, Roche JF, Beltman ME. Effects of physiological and/ or disease status on the response of postpartum dairy cows to synchronization of estrus using an intravaginal progesterone device.

Theriogenology. 2014;82:1263–72. **21.**Opsomer G. High yielding dairy cows: to produce or to reproduce and what practitioners should know about this to help their clients, *Mac Vet Rev* 2013; 36 (2): 53–62. **22.**Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology*. 2015;44:915–23. **23.**Ribeiro E.S., A.P. Monteiro, F.S. Lima, H. Ayres, R.S. Bisinotto, M. Favoreto, L.F. Greco, R.S. Marsola, W.W. Thatcher, and J.E. Santos. 2012a. Effects of presynchronization and length of proestrus on fertility of grazing dairy cows subjected to a 5-day timed artificial insemination protocol. *J. Dairy Sci.* 95:2513-2522. **24.**Ribeiro E.S., K.N. Galvão, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos. 2012b. Economic aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. *Anim Reprod*, 9:370-387. **25.**Rodriguez-Martinez H (i sar., 2008, 2012, 2013. Series of articles published online ; Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice? In: *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*, I.V.I.S. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY. **26.**Santos JEP, Rutigliano HM and Sá Filho MF 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 110, 207–221. **27.**Santos JEP, Narciso CD, Rivera F, Thatcher WW and Chebel RC 2010. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed AI protocol on reproduction of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93, 2976–2988. **28.**Thatcher, W.W., Bilby, R.T., Bartolome, A.J., Silvestre, F., Staples, R.C., Santos, P.E.J. (2006): Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*, 65:30-44. **29.**Thatcher W, J.E. Santos, C.R. Staples. 2011. Dietary manipulations to improve embryonic survival in cattle. *Theriogenology* 76: 1619-1631. **30.**Townson DH, Tsang PC, Butler WR, Frajblat M, Griel LC Jr, Johnson CJ, Milvae RA, Niksic GM and Pate JL 2002. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *Journal of Animal Sciences* 80, 1053–1058. **31.**Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR and Wiltbank MC 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52, 1067–1078. **32.**Walsh RB, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS and LeBlanc SJ 2007. Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 315–324. **33.**Wiltbank MC, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S and Gümen A 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65, 17–29. **34.**Wiltbank MC, Sartori R, Herlihy MM, Vasconcelos JL, Nascimento AB, Souza AH, Ayres H, Cunha AP, Keskin A, Guenther JN and Gümen A 2011. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 76, 1568–1582.

COMPUTER ASSISTED SYSTEM ANALYSIS FOR OBJECTIVE
ASSESSMENT OF SPERMATOOZOA QUALITY

Nataša Šterbenc, Maja Zakošek Pipan, Janko Mrkun

Clinic for Reproduction and Large Animals, University of Ljubljana, Vet Faculty, Ljubljana, Slovenia

Abstract

Computer assisted semen analysis (CASA) provides precise and accurate information on different spermatozoa motility characteristics, associated with the fertilizing ability. Many methods are used to estimate the viability of a semen sample and thus evaluate potential fertility of the male. Motility of spermatozoa is important features, connected with the viability, membrane and acrosome integrity and remains the parameter of choice to determine the degree of spermatozoa damage, caused by the freezing and thawing procedure. Spermatozoa motility is widely evaluated by visual assessment on a phase contrast microscope. The subjectivity of visual motility assessment it has been a poor predictor of fertilizing ability and depends on the experience of the operator. Different evaluation techniques have been developed and among them CASA proved to be the most successful system. Computer assisted semen analyser enables different spermatozoa motility characteristic such as total motility, progressive motility, progressive velocity, path velocity, track speed, amplitude of lateral head displacement, beat cross frequency, straightness and linearity. Adopting CASA system in artificial insemination stations can increase objectivity in determination of spermatozoa quality and can be considered as an efficient and reliable tool to evaluate fertility.

Keywords: computer assisted semen analysis (CASA), male fertility, manual assessment, semen counting chamber, spermatozoa

Introduction

The standard semen analysis involves examination of spermatozoa concentration, motility and normal morphology as a predictor of fertilizing ability (1). One of the most important characteristics in bovine reproduction associated with fertilizing ability of spermatozoa is motility. Assessment of frozen-thawed (F/T) spermatozoa fertility is primarily based on post-thaw semen evaluation using parameters such as spermatozoa motility, morphology, viability, biochemical characteristics of enzyme release, membrane and acrosome integrity. Motility remains the parameter of choice to determine the degree of spermatozoa damage which occurred in between cryopreservation process (2). Spermatozoa motility is widely evaluated by visual assessment. The technique is subjective and variable because of the subjective opinion and skills of the evaluator (3) and may subsequently lead to variation in results from the same ejaculate by different laboratories or evaluators. Visual assessment of semen quality has been a poor predictor of fertilizing ability (1, 4). In response to difficulties in manual assessment there was therefore a need for objective and standardized methods for the spermatozoa quality evaluation. Many different evaluation techniques were made for objective evaluation of spermatozoa motility before first computer assisted semen analysis was proposed by Dott and Foster in 1971 (5). First computer assisted semen analysis included parameters like concentration, motility and morphology. Among all evaluation techniques CASA proved to be the most successful system on different spermatozoa motility characteristics (6). Responsible artificial insemination (AI) stations strive to ensure that semen being sold to the customers has the potential to achieve acceptable levels of fertility when used in herds of fertile, adequately-managed cows and heifers. AI stations can consider adopting CASA system as an efficient and reliable tool to evaluate male fertility. CASA allows objective, simultaneous, reliable, rapid and accurate analysis of several semen parameters. Repeatability of the measurements and their objectivity might constitute a potential advantage of the automatic system (CASA), which is the most popular and

intensively improved tool over the years. CASA is a system that combines specific hardware and software forms, a high-resolution camera and microscope. The system is able to recognize the intensity and density of the pixels in the images taken on the appropriate background. After computer assisted processing of the slides, it estimates spermatozoa concentration and total motility, the percentage of spermatozoa with progressive motility, velocity parameters, linearity of movements and morphology (7). The sample preparation methods and settings recommended by the producer have to be strictly followed in order to obtain accurate results (8). For objective assessment of semen CASA system needs standardization and validation before use, so it is able to provide important information for semen quality assurance planned for AI of cattle, horses and pigs (9).

Comparison of computer assisted analysis with manual assessment of F/T bull semen

Semen motility and density were performed subjectively and by CASA on 169 different samples of frozen-thawed semen from bulls of different ages and breeds by Klobučar due to his doctoral thesis (10). The analysis of semen density included a comparison of the results of computer assisted analysis of motile and non-motile stained spermatozoa, cell counting in Makler[®] counting chamber and photometric measurements of the ejaculate which served as the basis for the calculation of spermatozoa concentration per ml. The results have shown that subjective assessment of motility and progressive motility can be sufficiently reliable if appropriate equipment and enough time are available to the evaluator to ensure accuracy, while insufficient equipment, time and experience may lead to errors. More accurate values of semen motility can be obtained by computer assisted analysis. The researcher found greater difference between subjective and computer assisted assessment of semen motility regarding the percentage of progressively motile spermatozoa. Same results were confirmed by other researchers (11). The values obtained by subjective assessment were greater than those obtained by computer assisted analysis. During subjective evaluation of a same semen sample with different technicians a high alteration (30–60 %) in results of spermatozoa motility were obtained (7). This difference results from the evaluator's inability to distinguish spermatozoa with impaired motility from progressive motile spermatozoa merely by using its vision, while CASA system eliminates these errors. The study of F/T spermatozoa density of immobile stained cells with the use of Makler[®] counting chamber, photometer and computer assisted analysis showed quite comparable results. When computer assisted analysis of motile spermatozoa was used considerable differences were obtained in the determination of spermatozoa density. The computer assisted analysis showed better spermatozoa motility and greater difference in density from values obtained by other methods. Same results in estimation of spermatozoa density have been obtained by other researchers, indicating that computer assisted analysis overestimates semen concentration (12, 13, 8).

Brief description of CASA system

The CASA system provides a host of kinematic data regarding spermatozoa motion and velocity parameters and offers the ability to obtain more repeatable estimates of spermatozoa motility comparing to subjective estimates. CASA system is electronic imaging system to visualize spermatozoa and an advanced software program evaluates many of individual semen parameters. The system commonly consist of a microscope attached to a high resolution video camera, a video frame grabber card and a computer. The image of the microscope field is sent from the camera and is converted into a digital image. Spermatozoa are normally observed on a dark field, a negative phase contrast or with fluorescent microscope. White spermatozoa heads are visualized on a dark background with negative phase contrast microscope, and the brightness of spermatozoa head is applied to establish centroid position in successive fields. Fluorescent microscope perceive spermatozoa head coloured with fluorescent dyes that binds to the spermatozoa DNA. The video camera feeds data into the computer where it is analysed by software. The video camera captures the microscopic images of the spermatozoa which is then digitized by the computer based on number of picture elements (pixels) covered by the spermatozoa head. The pixels range covered by spermatozoa heads can be defined for different species. The number of microscopic images gained per second in a CASA system depends of the video camera used. Video image acquisition rates used in most CASA systems is typically 50 Hz or 60 Hz (2). CASA system uses algorithms to calculate spermatozoa concentration and various velocity parameters. After digitization of spermatozoa

heads in successive frames, a path-finding algorithm is used to identify and track the progress of spermatozoa across the field of view (14). The algorithm used differs among various CASA systems. The track of spermatozoa movement is reconstructed and a series of kinematic parameters are evaluated. A crucial moment for the accuracy of the CASA system is the process of reconstructing the spermatozoa track from successive images and it depends on spatial resolution of magnification, the temporal resolution of the systems, size of the spermatozoa head and mistaken path of a spermatozoa because of collisions (2). The standardization of semen concentration of the sample it is necessary, dilution of semen sample is essential to adjust the concentration for successful analysis of individual spermatozoa tracks because there is a high risk of having errors in the results (15).

Counting chambers used for CASA analysis

Different reusable and disposable capillary-loaded counting chambers are being used in CASA analysis. The Makler[®] Counting Chamber is 10 microns deep and represents lower depth of ordinary haemocytometers. Chamber is composed from two pieces of optically flat glass. The upper layer serves as a cover-glass, with a 1 mm × 1 mm fine grid in the centre and is divided into 100 smaller squares, 0.1 mm × 0.1 mm each. The lower part has a metal base and two handles. In the centre of the base there is a flat disc made of optical flat glass on which the sample is placed. Spacing is firmly secured by four quartz pins. A 5 µL volume of a well-mixed semen sample is placed in the centre of the chamber and immediately covered. When the cover glass is placed on the four tips, the space bounded in a row of 10 squares is exactly one millionth of mL. Therefore, the number of spermatozoa in 10 squares indicates their concentration in million/mL. The Chamber is quickly and easily available for reuse. Semen concentration obtained with Makler[®] counting chamber was not statistically different from those determined by improved Neubauer haemocytometer in semen samples with concentrations over 40 × 10⁶ per mL, but measurement of semen concentration by Makler[®] counting chamber is an inaccurate method, especially in semen samples with concentration less than 40 × 10⁶ (16).

The CELL-VU[®] chamber consists of a dual-chamber glass slide and 2 pieces of 0.5 mm thick coverslip containing a laser-etched grid on the reverse side. The grid area is 1 mm × 1 mm and is divided into 100 smaller squares, 0.1 mm × 0.1 mm each. The chamber has a depth of 20 µm. This depth is optimal for spermatozoa to form a monolayer, movement is unencumbered, motility can be assessed and counts are easily made. A 4 µL volume of a well-mixed semen sample is loaded into the left and right chambers.

Leja[®] chamber is high quality chamber developed for semen analysis by CASA systems or microscopes. Is a high optical quality microscope slide (75 × 25 × 1 mm). The two glass plates of the chamber are at a fixed and controlled distance to form uni-form chambers with 10, 12, 20 or 100 microns of depth. Leja[®] may contain 2, 4 or 8 independent chambers. All slides are covered with a special coating to prevent air bubble formation and to prevent semen from sticking to the chamber surface. The resin and ink used are both non-toxic. The Leja[®] have an excellent low limit of quantification and can handle high semen concentrations. Leja[®] chamber is a single-use device and cannot be washed and re-used. The chamber is loading with semen sample by capillary forces (17). Semen analysis with lamellar capillary filling semen analysis chamber is a rapid, precise and accurate method.

Goldcyto counting chambers are disposable slides designed for the assessment of concentration and motility with automated CASA systems, especially for animal semen analysis. They contain four 20 microns deep chambers (18). Small volume of semen is deposited on the open edge of the chamber and the seminal fluid is distributed homogeneously by capillary action.

In comparison of different counting chambers using a CASA system, Peng et. al. discovered that the motility of spermatozoa from a drop loaded coverslip fresh sample with Makler was significantly higher than that of capillary-loaded GoldCyto and Leja[®]. Douglas-Hamilton et al. reported that capillary-filled counting chambers have inconsistent filling of semen in low volume, which effects on the estimation of semen concentration (19). In spite of everything they confirmed that in the pre-calibrated standard latex bead solution tests, the disposable chambers GoldCyto and Leja showed satisfactory performance compared with the Makler counting chamber. Consistently, similar results were obtained in the measurement of semen concentration (17). The accuracy of the results depends on the counting

chamber used, so it is important that high-quality certified chambers are used and that chamber depth is set in the software.

Semen sample preparation and spermatozoa motility analysis

Computer assisted semen analysis facilitates objective evaluation of semen estimation. CASA system analyse motility properties of spermatozoa based on their digital images. The evaluators can select the number of frames per second (frame acquisition rate) to be analysed among 15, 30, or 60 Hz and the total number of analysed frames so that spermatozoa can be successfully tracked for their motility analysis. Researchers suggested 60 frames per second for CASA applications in human and animal semen analysis (20). Contri recommended a routine frame rate of 60 Hz and 30 frames per field when F/T bovine semen is evaluated (21). Evaluators can also define intensity, size values, which are essential to distinguish between spermatozoa heads and other cells eventually present in the evaluated sample. The method of processing semen for CASA and instrument settings (gates in analysing the specimen, number of fields and samples examined, temperature at which measures are performed) and also some other factors can dramatically affect the results (22, 23). Temperature performed can influence the evaluation results therefore the recommended temperature for animal semen evaluation is 37°C. The equipment has to be standardized for a considered species before determining the accuracy of the system. The reliability, accuracy and precision of CASA analysis largely depend on evaluators training and knowledge about calibration, validation, standardization and optimization of the semen processing before analysis (7). Semen samples processing for analysis in CASA is critical from three aspects; semen concentration, extender used to dilute semen and loading volume used for analysis. For successful analysis of individual spermatozoa tracks, dilution of semen samples to adjust the concentration is extremely important. An appropriate dilution of different semen species used for analysis is essential to obtain accurate measurements. In higher semen concentration, multiple individual collisions of spermatozoa can cause inaccurate motility results (24). The extender used for semen dilution must not contain particles of size similar to spermatozoa heads (25). Researchers who were using isotonic NaCl 0.9 % solution and a buffer saline solution (PBS) for semen dilution found no differences in kinetic results (21). The concentration of bull semen samples suitable for evaluation in CASA is approximately 25–30 x 10⁶ spermatozoa/ml reported (26, 27). The loading volume of semen sample for analysis in Makler's chamber range between 5–7 µl of diluted semen, while it was slightly higher (7–10 µl) when loaded in other chambers (28, 29, 30). The most frequently reported CASA parameters include total motility, ratio of motile spermatozoa to the total spermatozoa concentration (%); progressive motility, motile spermatozoa with path velocity greater than medium VAP cut-off and having STR greater than the standardized threshold (%); average path velocity (VAP), the average velocity of the smoothed cell path (µm/s); straight line (or progressive) velocity (VSL), the average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of the track (µm/s); curvilinear velocity (VCL), the average velocity measured over the actual point to point track followed by the cell (µm/s); beat-cross frequency (BCF), frequency of spermatozoa head crossing the average path in either direction (Hz); amplitude of lateral head displacement (ALH), the mean width of the head oscillation as the spermatozoa swim (µm); straightness of the average path (STR), average value of the ratio VSL/VAP (%); and linearity of the curvilinear path (LIN), average value of the ratio VSL/VCL (%). The mentioned above CASA parameters have been modelled and refined mathematically to determinate the motion parameters of each spermatozoa as it travels through a microscopic field. Values for each individual spermatozoon, compiled across all fields examined, are summarized for > 500 semen and ideally > 1000 semen per sample (2, 9).

Quality control and quality assurance using CASA system

Standardization, validation, and optimization of protocols must be carried out before using CASA in the andrology laboratory (31). Artificial insemination centre must assure that CASA system works properly and that factors which can influence accuracy and precision of output values were eliminated. The most important factors that affect the accuracy of the results are as follows: type and depth of used chamber, number of fields analysed, temperature of analysis and protocol of semen sample preparation (11). Validation is therefore essential and user must validate the system in their laboratory before purchase. Validation must be performed at multiple levels including evaluators, all hardware and

software system settings, including sample chambers, with periodic revalidation. After any update of software or change of optics, sample chamber, hardware, extender, extent of semen dilution or animal species a new validation need to be implemented. Each CASA system should include software to perform internal validations and also to facilitate external validation using stored digitized images or data. Reliability and validation of a CASA system starts with marketing semen doses for the purpose of insemination. The data obtained with CASA analysis must be precisely documented due to traceability. Suppliers should provide sufficient documentation to convince the sceptical customer that the system works properly as promised and the semen results obtained from analysis are reliable and that the marketed product meets standards (9, 32).

Conclusion

CASA system has been used over 40 years in veterinary and human medicine for semen quality evaluation in reproduction field and for research purposes. In the meantime, the system has greatly improved capability of hardware and software became more sophisticated. System offers considerable advantages over the manual assessment with improving the repeatability and objectivity of spermatozoa parameters. In order to obtain reliable results with CASA system evaluators are required to strictly follow setting recommended by the manufacturer and the sample preparation. CASA system is rapid, efficient, objective and enables versatility of analysis and therefore should be used as a useful and reliable tool for routine semen quality evaluation to predict fertilizing potential of sires used in assisted reproductive technology.

References

1. Liu DY, Du Plessi YP, Nayudu PL, Johnston WIH, Baker HWG, 1988, The use of in vitro fertilization to evaluate putative tests of human sperm function, *Fertil. Steril.* 49, 272-77.
2. Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G, 2011, Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system--a review, *Reprod. Domest. Anim.* 46(1), 165-72.
3. Yeung CH, Cooper TG, Nieschlag E, 1997, A technique for standardization and quality control of subjective sperm motility assessments in semen analysis, *Fertil. Steril.* 67, 1156-8.
4. Fitzpatrick LA, Fordyce G, Mc Gowan MR, Bertram JD, Dagen VJ, De Faveri J, Miller RG, Holroyd RG, 2002, Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. *Anim. Reprod. Sci.* 71, 39-49.
5. Dott HM, Foster GC, 1979, The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer, *J. Reprod. Fertil.* 55, 161-6.
6. Gravance CG, Davis RO, 1995, Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbits, *J. Androl.* 16, 88-93.
7. Versteegen J, Iguer-ouada M, Onclin K, 2002, Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice, *Theriogenology* 57, 149-79.
8. Talarczyk-Desole J, Berger A, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Jędrzejczak P, 2017, Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice? *Ginekol. Pol.* 88(2), 56-60.
9. Amann RP, Waberski D, 2014, Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments, *Theriogenology* 81(1), 5-17.
10. Klobočar I, 1996, Primerjava rezultatov računalniške s klasično analizo zamrznjenega bikovega semena, Ljubljana, University of Ljubljana, PhD Thesis.
11. Klimowicz MD, Nizanski W, Batkowski F, Savic MA, 2008, The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS), *Theriogenology* 70(1), 77-82.
12. Macleod IC, Irvine DS, Masterton A, Taylor A and Templeton AA, 1994, Assessment of the conventional criteria of semen quality by computer-assisted image analysis: evaluation of the Hamilton-Thorn motility analyser in the context of a service andrology laboratory, *Hum. Reprod.* 9, 310-19.
13. Wijchman JG, de Wolf BTHM, Jager S, 1995, Evaluation of a computer-aided semen analysis system with sperm tail detection, *Hum. Reprod.* 10, 2090-95.
14. Katz DF, Davis RO, 1987, Automatic analysis of human sperm motion, *J. Androl.* 8, 170-81.
15. Mortimer ST, 2000, CASA--practical aspects, *J. Androl.* 21(4), 515-24.
16. Sukcharoen N, Ngeamjirawat J, Chanprasit Y, Aribarg A, 1994, A comparison of Makler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement, *J. Med. Assoc. Thai.* 77(9), 471-6.
17. Peng N, Zou X, and Li L, 2015, Comparison of different counting chambers using a computer-assisted semen analyser, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 61(5), 307-13.
18. Lu JC, Yue RQ, Feng RX, Kong LZ, Xu YC, 2016, Accuracy

Evaluation of The Depth of Six Kinds of Sperm Counting Chambers for both Manual and Computer-Aided Semen Analyses, *Int. J. Fertil. Steril.* 9(4), 527-33. **19.** Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC, 2005, Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration, *J. Androl.* 26(1), 115-22. **20.** Owen DH, Katz DF, 1993, Sampling factors influencing accuracy of sperm kinematic analysis, *J. Andro.* 14, 210-21. **21.** Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A, 2010, Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa, *Theriogenology* 74(3), 424-35. **22.** Davis RO, Katz DF, 1993, Operational standards for CASA instruments, *J. Androl.* 14, 385-94. **23.** Mortimer ST, 1997, A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals, *Hum. Reprod. Update* 3, 403-39. **24.** Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Kruif de A, 2002, Use of the sperm quality analyzer (SQA II-C) for the assessment of dog sperm quality, *Reprod. Domest. Anim.* 37, 158-63. **25.** Anzar M, Hassan MM, Graham EF, Deyo RCM, Singh G, 1991, Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyser (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen, *Theriogenology* 36, 307-17. **26.** Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH, 1998, Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analysis (CASA) and their relationship to fertility, *Theriogenology* 49, 871-79. **27.** Kathiravan P, Kalatharan J, John Edwin M, Veerapandian C, 2005, Post-thaw sperm motion characteristics of different crossbred bull spermatozoa assessed by computer assisted semen analyser, *J. Remount. Vet. Corps.* 44, 33-38. **28.** Hirai M, Cerbito WA, Wijayagunawardane MPB, Braun J, Leidl W, Ohosaki K, Matsuzawa T, Miyazawa K, Sato K, 1997, The effect of viscosity of semen diluent on motility of bull spermatozoa, *Theriogenology* 47, 1463-78. **29.** Hoflack G, Opsomer G, Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Kruif de A, Duchateau L, 2007, Comparison of computer assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian bulls, *Reprod. Domest. Anim.* 42, 153-61. **30.** Tardif AL, Farrell PB, Trouvern – Trend V, Foote RH, 1997, Computer – Assisted sperm Analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C, *J. Dairy. Sci.* 80, 1606-12. **31.** ESHRE Andrology Special Interest Group, 1998, Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa, *Hum. Reprod.* 13,142-45. **32.** Harstine BR, Utt MD1, DeJarnette JM, 2018, Review: Integrating a semen quality control program and sire fertility at a large artificial insemination organization, *Animal.* 22, 1-12.

PROCENA KVALITETA SPERMATOZOIDA KOMPJUTERSKOM ANALIZOM SEMENA

Nataša Šterbenc, Maja Zakošek Pipan, Janko Mrkun

Klinika za reprodukciju i velike životinje, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija

Kratak sadržaj

Kompjuterizovana analiza semena (CASA) obezbeđuje precizne i tačne podatke o pokretljivosti spermatozoida bitnoj za njihovu sposobnost oplodnje. Postoji niz metoda koje se primenjuju u cilju određivanja vitalnosti i održivosti uzorka semena i koje su od pomoći prilikom procenivanja potencijalne plodnosti mužjaka. Pokretljivost spermatozoida predstavlja bitnu karakteristiku zajedno sa njegovom vitalnošću i integritetom membrane akrozoma i kao takva predstavlja metod izbora u cilju određivanja stepena oštećenja nastalih usled postupka zamrzavanja i odmrzavanja. Pokretljivost spermatozoida se najčešće procenjuje pomoću kontrastnog mikroskopa. Ovakav vid procene nije objektivna i zavisi u velikoj meri od iskustva osoblja. Tokom vremena, razvijen je niz metoda za procenu semena, među kojima se CASA sistem pokazao izuzetno uspešnim. CASA analizator omogućava procenu niza karakteristika pokretljivosti kao što su ukupna pokretljivost, progresivna pokretljivost, brzina puta, amplituda lateralnog pomeranja glave spermatozoida, učestalost pokreta repa i linearnost. Prihvatanje CASA sistema u stanicama za veštačko osemenjavanje može da poveća objektivnost prilikom procene kvaliteta semena i može se smatrati efikasnom i pouzdanom alatkom prilikom procene plodnosti.

Ključne reči: kompjuterska analiza semena (CASA), plodnost mužjaka, manualna procena, komorica za brojanje semena, spermatozoidi

Uvod

U cilju predviđanja sposobnosti oplodnje standardna analiza semena uključuje određivanje koncentracije spermatozoida, njihovu pokretljivost i morfologiju (1). Jedna od najznačajnijih karakteristika reprodukcije goveda koja se vezuje za sposobnost oplodnje spermatozoida jeste njihova pokretljivost. Procena fertiliteta zamrznutih/odmrznutih (Z/O) spermatozoida je prvenstveno zasnovana na proceni semena nakon odmrzavanja prilikom koje se određuju parametri kao što su pokretljivost, morfologija, održivost, biohemijske karakteristike oslobođenih enzima i integritet membrane i akrozoma. Pokretljivost predstavlja i dalje parametar izbora koji se primenjuje (1) u cilju određivanja stepena oštećenja kojeg su spermatozoidi pretrpeli tokom procesa krioprezervacije (zamrzavanja) (2). Pokretljivost spermatozoida se najčešće određuje vizuelnom procenom. Tehnika je subjektivna i promenljiva i prvenstveno zavisi od procene i iskustva onoga ko vrši procenu (3) što može imati za posledicu različito ocenjivanje sperme iz istog ejakulata ukoliko se procena vrši u različitim laboratorijama ili je vrši različito osoblje. Vizuelni pregled ejakulata je loš predskazatelj sposobnosti zamrzavanja semena (1, 4). Kao odgovor na sve teškoće koje nastaju kao posledica manualne procene semena nastala je potreba za razvojem objektivnih i standardizovanih metoda procene kvaliteta spermatozoida. Razvijen je niz metoda za objektivnu evaluaciju pokretljivosti spermatozoida znatno pre nego što su Dott i Foster (1971) predstavili prvi kompjuterizovani postupak (5). Prva kompjuterizovana analiza semena je uključivala parametre kao što su koncentracija, pokretljivost i morfologija. U nizu različitih postupaka procene CASA sistem se pokazao najuspešniji prilikom procene karakteristika pokretljivosti spermatozoida (6). Stanice za veštačko osemenjavanje (VO) koje odgovorno posluju teže ka tome da seme koje iznose na tržište ima potencijal da obezbedi zadovoljavajući nivo plodnosti prilikom korišćenja kod plodnih i adekvatno uzgajanih junica i krva. Stanice za VO smatraju da je primena CASA sistema efikasan i pouzdan način pristupa procene fertiliteta mužjaka. CASA omogućava objektivnu, pouzdanu, preciznu i istovremenu analizu više parametara kvaliteta semena. Ponovljivost merenja i

njihova objektivnost predstavljaju potencijalnu prednost CASA sistema koji trenutno predstavlja najpopularniju alatku koja se svakodnevno unapređuje. CASA sistem kombinuje specifičan hardver i softver, kameru visoke rezolucije i mikroskop. Sistem poseduje sposobnost prepoznavanja intenziteta i gustine piksela slika koje su snimljene na odgovarajućoj podlozi. Nakon kompjuterizovane obrade podataka slike CASA sistem procenjuje koncentraciju progresivno pokretljivih spermatozoida, ukupnu pokretljivost, procenat progresivno pokretljivih, parametre brzine, linearnost pokreta i morfologiju (7). Kako bi se postigli precizni i pouzdani rezultati neophodno je pratiti uputstva proizvođača (8). Istovremeno, pre primene CASA sistema neophodno je izvršiti njegovu standardizaciju i validaciju (9).

Poređenje kompjuterizovane analize i manuelne procene Z/O semena bika

Klobučar (10) je u svojoj doktorskoj tezi izneo rezultate ispitivanja CASA postupkom pokretljivosti i gustine 169 uzoraka zamrznutog/odmrznutog semena bikova različitih rasa. Analiza gustine semena je uključivala poređenje rezultata CASA ispitivanja pokretnih i nepokretnih obojenih spermatozoida, brojanja ćelija u Makler[®] komorici i fotometrijskog merenja ejakulata što je služilo kao osnova proračuna koncentracije/ml. Rezultati su pokazali da subjektivna procena pokretljivosti i progresivne pokretljivosti može biti pouzdana ukoliko se osoblju koje vrši procenu pruži dovoljno vremena kao i adekvatna oprema. Manjak vremena, nedovoljno iskustvo kao i neodgovarajuća oprema mogu da rezultiraju greškama. CASA metod obezbeđuje precizniju procenu pokretljivosti semena. Autori su ustanovili najveće razlike u proceni procenta progresivno pokretljivih spermatozoida u zavisnosti od primene subjektivne ili CASA metode. Navedeni nalaz je saglasan sa ranije objavljenim rezultatima drugih autora (11). Vrednosti koje su ustanovljene subjektivnom procenom semena su bile više u odnosu na one definisane CASA sistemom. Istovremeno, subjektivna procena pokretljivosti semena istog uzorka se znatno razlikovala (30-60%) u zavisnosti od toga koji je laborant vršio procenu (7). Ovakve upečatljive razlike su posledica nesposobnosti laboranata da vizuelno razlikuju spermatozoide koji se otežano kreću od progresivno pokretljivih. CASA sistem je u mogućnosti da razgraniči navedenu situaciju i eliminiše eventualne greške. Praćenje gustine nepokretnih obojenih ćelija Z/O semena primenom Makler[®] komorice, fotometrom ili CASA sistemom dalo je približno slične rezultate. Međutim, prilikom određivanja pokretnih spermatozoida CASA sistemom utvrđene su signifikantne razlike gustine spermatozoida. Slične rezultate su postigli i drugi autori (12, 13, 8) koji su takođe ustanovili da CASA sistem daje precenjene vrednosti koncentracije semena.

Kratak opis CASA sistema

CASA sistem obezbeđuje niz kinematičkih podataka o pokretljivosti spermatozoida i parametara njihove brzine uz istovremenu mogućnost pružanja ponovljive procene pokretljivosti. CASA sistem predstavlja elektronski imidžing sistem vizuelizacije spermatozoida uz istovremeni napredni softver koji procenjuje niz pojedinačnih parametara bitnih za evaluaciju semena. Sistem se sastoji najčešće od mikroskopa koji je priključen na video kameru visoke rezolucije, posebne grafičke kartice i kompjutera. Slika vidnog polja mikroskopa se iz kamere konvertuje u digitalni zapis. Uobičajeno je da se spermatozoidi posmatraju naspram tamne pozadine, pomoću kontrasta ili na fluorescentnom mikroskopu. Bele glave spermatozoida se vizuelizuju na tamnoj pozadini fazno kontrastnog mikroskopa a blještavost glava je iskorišćena kako bi se odredila pozicija centroida u sledećem polju. Fluorescentni mikroskop uočava glave spermatozoida koje su markirane fluorescentnom bojom koja se vezala za DNK spermatozoida. Video kamera šalje signal kompjuteru koji ga analizira uz pomoć posebnog programa. Digitalizacija slike se vrši na osnovu broja piksela koje pokriva glava spermatozoida. Interval piksela koje pokriva glava spermatozoida zavisi od životinjske vrste čije seme ispitujemo. Broj slika koje CASA sistem preuzima zavisi od karakteristika upotrebljene video kamere i najčešće iznosi 50-60 Hz (2). CASA sistem koristi seriju algoritama u cilju izračunavanja koncentracije spermatozoida i niza parametara njihove brzine kretanja. Nakon digitalizacije slike glave spermatozoida u nekoliko serijskih kadrova pomoću algoritma koji određuje putanju kretanja spermatozoida (14). Algoritmi se razlikuju od CASA sistema do CASA sistema, pri čemu se procenjuju putanja kretanja spermatozoida i serija kinematičkih parametara. Ključni momenat za preciznost CASA sistema predstavlja proces rekonstrukcije puta spermatozoida na osnovu zabeležene serije snimaka. Uspešnost rekonstrukcije putanje spermatozoida zavisi od prostorne rezolucije i uveličanja, vremenske rezolucije sistema, veličine glave spermatozoida, i

promene putanje spermatozoida usled sudaranja sa drugim spermatozoidima (2). Standardizacija koncentracije semena uzorka je neophodna kako bi se smanjila mogućnost pogrešne procena (15).

Komorice za brojanje koje se koriste prilikom CASA analize

Za CASA analizu koriste se različite komorice za jednokratnu ili višekratnu upotrebu. Makler[®] komorica za brojanje ima dubinu od 10 mikrona, sastoji se od dve staklene pločice. Gornja staklena pločica ima ulogu pokrovnog stakla na čijoj površini u centralnom delu se nalazi urezana mrežica 1 mm x 1 mm, koja je podeljena u 100 manjih kvadratića dimenzija 0,1 mm x 0,1 mm. Donji deo komorice ima metalnu osnovu i dve ručke. Na središnjem delu nalazi se optički ravan stakleni disk na koji se postavlja uzorak. Pravilan razmak između dve pločice obezbeđuju četiri kvarcne čiode. Uzorak od 5 µL predhodno dobro izmešanog uzorka semena se postavlja u središnji deo komorice i trenutno prekriva. Kada je pokrovno staklo pravilno postavljeno prostor koji obuhvata red od 10 kvadratića predstavlja jedan milioniti deo mililitra. Dakle, Broj spermatozoida izbrojanih u 10 kvadratića predstavlja njihovu koncentraciju u milion/mL. Komorica može lako i brzo da se ponovo iskoristi za sledeći uzorak. Koncentracija semena izmerena u Maklerovoj komorici se nije znatno razlikovala od one koja je bila određena pomoću prilagođenog Naubauer hemocitometra, posebno kada su bili u pitanju uzorci semena sa koncentracijom spermatozoida koja je prevazilazila 40×10^6 /m . Međutim treba imati u vidu da ukoliko je koncentracija semena manja od 40×10^6 /mL vrednosti koje smo odredili pomoću Maklerove komorice nisu pouzdane (16).

CELL-VU[®] komorica se sastoji od staklene pločice sa dve komorice i dva pokrovna stakla debljine 0,5 mm na kojima je laserski ugravirana mrežica. Mrežica je površine 1 mm x 1 mm i podeljena je u 100 manjih kvadratića dimenzija 0,1 mm x 0,1 mm. Komorica je dubine 20 µm. Navedena dubina omogućava spermatozoidima da formiraju jedan sloj u okviru kojeg mogu da se nesmetano kreću tako da je operatoru omogućeno da pored broja proceni i pokretljivost spermatozoida. U levu i desnu komoricu se postavlja uzorak od 4 µL dobro izmešanog semena.

Leja[®] komorica je predstavnik visokokvalitetnih komora koje su dizajnirane za potrebe analize semena pomoću CASA sistema ili mikroskopa. To je visokokvalitetna mikroskopska pločica (75mm x 25 mm x 1 mm). Dve staklene pločice koje sačinjavaju komoricu su na fiksnom i kontrolisanom odstojanju i formiraju ujednačane komorice dubine od 10, 12, 20 ili 100 mikrona. Leja[®] može da sadrži 2,4, ili 8 nezavisnih komorica. Sve pločice su prekrivene posebnim premazom koji sprečava formiranje vazдушnih mehurića i lepljenje semena za površinu komorice. Smole i boje koje se koriste su netoksične. Na Leja[®] komoricama moguće je raditi sa uzorcima semena visoke koncentracije. Leja komorice su za jednokratnu upotrebu i ne preporučuje se da se peru i ponovo koriste. Punjenje komorice se vrši zahvaljujući kapilarnim silama (17) što omogućava brz, precizan i pouzdan nalaz.

Goldcyto komrice su namenjene za jednokratnu upotrebu za procenu broja i pokretljivosti spermatozoida automatizovanim CASA sistemom, posebno su pogodne za ispitivanje kvaliteta semena životinja. Sadrže četiri 20 mikrona duboke komore (18), uzorak se postavlja uz otvoreni rub komorice i semena tečnost se raspodeljuje unutar komorice zahvaljujući kapilarnim silama.

Poređenjem različitih komorica koje se koriste u okviru CASA sistema, Peng i sar. Su ustanovili da je pokretljivost spermatozoida kada se ispituje uzorak pomoću Makler-ove komorice znatno veća u odnosu na kada se koriste GoldCyto ili Leja[®] komorice. GoldCyto i Leja[®] komorice se ispunjavaju uzorkom dejstvom kapilarnih sila. Douglas – Hamilton i sar su objavili da ovakav tip kapilarnih komorica imaju nedosledno ispunjavanje uzorkom koji je male zapremine, što direktno utiče na procenu koncentracije semena (19).

Uprkos svemu, autori su potvrdili da prilikom testiranja uz pomoć predhodno kalibriranog rastvora sa latex perlicama komorice za jednokratnu upotrebu (GoldCyto i Leja) imaju u poređenju sa Makler komoricama zadovoljavajuće performanse. Slični rezultati su dobijeni prilikom merenja koncentracije semena (17). Tačnost rezultata zavisi od toga koja je komorica korišćena, tako da je od velike važnosti da se koriste visokokvalitetne i sertifikovane komorice, kao i da se u softver precizno unese dubina korišćene komorice.

Priprema uzorka semena i analiza pokretljivosti spermatozoida

Komputerizovana analiza semena omogućava objektivnu procenu semena, karakteristika pokretljivosti spermatozoida na osnovu digitalnih slika. Osoblje koje vrši procenu može da odabere broj slika po sekundi (stopa sticanja slika) kako bi se procenila među 15, 30 ili 60 Hz i ukupnog broja analiziranih slika što omogućava praćenje spermatozoida i izučavanje njihove pokretljivosti. Istraživači preporučuju učestalost slika od 60 Hz za primenu u CASA sistemu prilikom ispitivanja semena ljudi ili životinja (20). Contri preporučuje za rutinsko ispitivanje Z/O semena bika primenu 60 Hz i 30 slika po polju (21). Procenitelji mogu takođe da definišu intenzitet i veličinu, što su bitni parametri za diferencijaciju glave spermatozoida od drugih ćelija koje su eventualno prisutne u ispitivanom uzorku. Način obrade semena za CASA analizu, kao i podešavanje opreme (izlaz za uzorak, broj polja i ispitivanih uzoraka, temperatura na kojoj se vrše merenja) mogu da utiču na krajnji rezultat (22, 23). Kako odabir temperature može znatno da utiče na rezultat, tako se preporučuje da se seme ispituje na temperaturi od 37°C. Oprema mora da se standardizuje za svaku određenu životinjsku vrstu pre nego odredimo preciznost sistema. Pouzdanost, tačnost i preciznost CASA analize mahom zavise od obuke, poznavanja kalibracije, validacije, standardizacije i optimizacije obrade semena pre analize (7). Obrada uzoraka semena za CASA analizu je kritična sa tri aspekta: koncentracije semena, razređivača koji se koristi i upotrebljene zapremine semena za analizu. Da bi bila uspešna analiza uzorci semena moraju biti razređeni do odgovarajuće koncentracije. Pri visokim koncentracijama semena dolazi do učestalih međusobnih sudara spermatozoida što može da dovede do pogrešnog tumačenja njihove pokretljivosti (24). Razređivač koji se koristi ne sme da sadrži čestice koje su slične veličine kao i glave spermatozoida (25). Istraživači koji su koristili izotonični rastvor 0,9% NaCl ili puferizovani fiziološki rastvor (PBS) za rastvaranje semena nisu ustanovili razlike u kinetici (21). Koncentracija semena bika koja je pogodna za CASA iznosi 25-30 x 10⁶ spermatozoida/ml (26, 27). Količina uzorka koji se nanosi u Maklerovu komorici iznosi 5-7 µl razređenog semena, dok je zapremina nešto viša (7-10 µl) ukoliko se nanosi u ostale komorice (28, 29, 30).

Najčešće određivani parametri CASA postupkom uključuju ukupnu pokretljivost, odnos pokretnih spermatozoida prema ukupnoj koncentraciji spermatozoida (%); progresivna pokretljivost, pokretni spermatozoidi koji se kreću po putanji brzinom većom od granične VAP i koji imaju STR višu od standardizovanog praga (%); prosečna brzina na putanji (VAP), prosečna brzina na izravnanom putu; pravolinijska (progresivna) brzina (VSL), prosečna brzina izmerena u pravoj liniji od početka do kraja putanje (µm/s); krivolinijska brzina (VCL), prosečna izmerena brzina od tačke do tačke na putanji (µm/s); krivolinijska brzina (VCL), prosečna brzina prolaska od tačke do tačke na putanji praćena frekvencijom udara ćelije (BCF), frekvencija pokreta glave spermatozoida tokom prelaska puta (Hz); amplituda lateralnog pomeranja glave spermatozoida (ALH), prosečna širina oscilacije glave tokom pokreta plivanja (µm); pravac putanje (STR), prosečna vrednost odnosa VSL/VAP (%); linearnost krivolinijske putanje (LIN), prosečna vrednost odnosa VSL/VCL (%). Gorepomenuti CASA parametri su modelirani i definisani matematički kako bi opisali parametre kretanja svakog spermatozoida tokom njegovog puta kroz vidno polje na mikroskopu. Vrednosti za svaki pojedinačni spermatozoid u svim ispitanim poljima su date za > 500 semenih ćelija, ili idealno za >1000 semenih ćelija po uzorku (2,9).

Kontrola kvaliteta i obezbeđivanje kvaliteta primenom CASA sistema

Pre uvođenja CASA sistema u andragološku laboratoriju moraju se sprovesti postupci standardizacije, validacije i optimizacije protokola (31). Centri za veštačko osemenjavanje moraju da obezbede da CASA sistem funkcioniše na odgovarajući način, da su eliminisani svi faktori koji mogu da utiču na tačnost i preciznost iznetih nalaza. Najznačajniji faktori koji utiču na tačnost rezultata su sledeći: tip i dubina upotrebljene komorice za brojanje, broj ispitanih vidnih polja, temperatura tokom ispitivanja i protokol pripreme semena (11). Validacija je neophodan postupak i ona se mora sprovesti pre nego što se obavi kupovina opreme. Validacija mora da se sprovede na više nivoa uključujući validaciju procenitelja, hardvera i softvera, komorica. Neophodno je da se periodično sprovodi i ponovljena reevaluacija posebno nakon ažuriranja softvera, promene optičkih delova, komorice, razređivača, stepena razređenja semena ili promene životinjske vrste koja se ispituje.

Svaki CASA sistem bi trebao da sadrži softver radi sprovođenja interne validacije, koji bi istovremeno olakšao i postupak eksterne validacije zahvaljujući memorisanim i sačuvanim podacima i

slikama. Pouzdanost i validacija CASA sistema počinje prodajom doza semena za osemenjavanja. Dobijeni podaci CASA analizom moraju se pažljivo dokumentovati kako bi bio obezbeđen proces sledljivosti. Dobavljači moraju da obezbede preciznu dokumentaciju kako bi ubedili i skeptične klijente da sistem funkcionise na način na kojim im je obećano i da su rezultati analize semena pouzdani te da je seme na nivou standarda (9,32).

Zaključak

CASA sistem se primenjuje u veterinarskoj i humanoj medicini radi procene kvaliteta semena za reprodukciju ili naučna istraživanja preko 40 godina. U međuvremenu sistem se razvio posebno zahvaljujući sve savršenijem hardveru i softveru. Sistem pruža značajne prednosti u odnosu na manuelnu procenu semena i pruža objektivnu procenu parametara. Kako bi rezultati bili pouzdani, procenitelji moraju da se striktno pridržavaju uputstava proizvođača opreme kao i protokola za pripremu uzorka semena. CASA sistem je brz, efikasan i objektivan i može se koristiti kao pouzdan alat za rutinsku procenu kvaliteta semna, reproduktivnog potencijala mužijaka, kao i za potrebe tehnologije asistiranе reprodukcije.

Literatura

1.Liu DY, Du Plessi YP, Nayudu PL, Johnston WIH, Baker HWG, 1988, The use of in vitro fertilization to evaluate putative tests of human sperm function, *Fertil. Steril.* 49, 272-77. 2.Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G, 2011, Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system--a review, *Reprod. Domest. Anim.* 46(1), 165-72. 3.Yeung CH, Cooper TG, Nieschlag E, 1997, A technique for standardization and quality control of subjective sperm motility assessments in semen analysis, *Fertil. Steril.* 67, 1156-8. 4.Fitzpatrick LA, Fordyce G, Mc Gowan MR, Bertram JD, Dagen VJ, De Faveri J, Miller RG, Holroyd RG, 2002, Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. *Anim. Reprod. Sci.* 71, 39-49. 5.Dott HM, Foster GC, 1979, The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer, *J. Reprod. Fertil.* 55, 161-6. 6.Gravance CG, Davis RO, 1995, Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbits, *J. Androl.* 16, 88-93. 7.Verstegen J, Iguer-ouada M, Onclin K, 2002, Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice, *Theriogenology* 57, 149-79. 8.Talarczyk-Desole J, Berger A, Taszarek-Hauke G, Hauke J, Pawelczyk L, Jedrzejczak P, 2017, Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice? *Ginekol. Pol.* 88(2), 56-60. 9.Amann RP, Waberski D, 2014, Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments, *Theriogenology* 81(1), 5-17. 10.Klobučar I, 1996, Primerjava rezultatov računalniške s klasično analizo zamrznjenega bikovega semena, Ljubljana, University of Ljubljana, PhD Thesis. 11.Klimowicz MD, Nizanski W, Batkowski F, Savic MA, 2008, The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS), *Theriogenology* 70(1), 77-82. 12.Macleod IC, Irvine DS, Masterton A, Taylor A and Templeton AA, 1994, Assessment of the conventional criteria of semen quality by computer-assisted image analysis: evaluation of the Hamilton-Thorn motility analyser in the context of a service andrology laboratory, *Hum. Reprod.* 9, 310-19. 13.Wijchman JG, de Wolf BTHM, Jager S, 1995, Evaluation of a computer-aided semen analysis system with sperm tail detection, *Hum. Reprod.* 10, 2090-95. 14.Katz DF, Davis RO, 1987, Automatic analysis of human sperm motion, *J. Androl.* 8, 170-81. 15.Mortimer ST, 2000, CASA--practical aspects, *J. Androl.* 21(4), 515-24. 16.Sukcharoen N, Ngeamjirawat J, Chanprasit Y, Aribarg A, 1994, A comparison of Makler counting chamber and improved Neubauer hemocytometer in sperm concentration measurement, *J. Med. Assoc. Thai.* 77(9), 471-6. 17.Peng N, Zou X, and Li L, 2015, Comparison of different counting chambers using a computer-assisted semen analyser, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 61(5), 307-13. 18.Lu JC, Yue RQ, Feng RX, Kong LZ, Xu YC, 2016, Accuracy Evaluation of The Depth of Six Kinds of Sperm Counting Chambers for both Manual and Computer-Aided Semen Analyses, *Int. J. Fertil. Steril.* 9(4), 527-33. 19.Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC, 2005, Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration, *J. Androl.* 26(1), 115-22. 20.Owen DH, Katz DF, 1993, Sampling factors influencing accuracy of sperm kinematic analysis, *J. Andro.* 14, 210-21. 21.Contri A, Valorz C, Faustini

M, Wegher L, Carluccio A, 2010, Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa, *Theriogenology* 74(3), 424-35. **22.** Davis RO, Katz DF, 1993, Operational standards for CASA instruments, *J. Androl.* 14, 385-94. **23.** Mortimer ST, 1997, A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals, *Hum. Reprod. Update* 3, 403-39. **24.** Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Kruif de A, 2002, Use of the sperm quality analyzer (SQA II-C) for the assessment of dog sperm quality, *Reprod. Domest. Anim.* 37, 158-63. **25.** Anzar M, Hassan MM, Graham EF, Deyo RCM, Singh G, 1991, Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyser (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen, *Theriogenology* 36, 307-17. **26.** Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH, 1998, Quantification of bull sperm characteristics measured by computer assisted sperm analysis (CASA) and their relationship to fertility, *Theriogenology* 49, 871-79. **27.** Kathiravan P, Kalatharan J, John Edwin M, Veerapandian C, 2005, Post-thaw sperm motion characteristics of different crossbred bull spermatozoa assessed by computer assisted semen analyser, *J. Remount. Vet. Corps.* 44, 33-38. **28.** Hirai M, Cerbito WA, Wijayagunawardane MPB, Braun J, Leidl W, Ohosaki K, Matsuzawa T, Miyazawa K, Sato K, 1997, The effect of viscosity of semen diluent on motility of bull spermatozoa, *Theriogenology* 47, 1463-78. **29.** Hoflack G, Opsomer G, Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Kruif de A, Duchateau L, 2007, Comparison of computer assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein-Friesian bulls, *Reprod. Domest. Anim.* 42, 153-61. **30.** Tardif AL, Farrell PB, Trouvern – Trend V, Foote RH, 1997, Computer – Assisted sperm Analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C, *J. Dairy. Sci.* 80, 1606-12. **31.** ESHRE Andrology Special Interest Group, 1998, Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa, *Hum. Reprod.* 13,142-45. **32.** Harstine BR, Utt MD1, DeJarnette JM, 2018, Review: Integrating a semen quality control program and sire fertility at a large artificial insemination organization, *Animal.* 22, 1-12.

NEW ASSAYS, BIOMARKERS AND BIOTECHNOLOGICAL PROCESS FOR IMPROVED PRESERVATION AND PREDICTION OF LIQUID STORED BOAR SEMEN QUALITY

Maja Zakošek Pipan¹, Janko Mrkun¹, Petra Zrimšek²

¹ Clinic for Reproduction and Large Animals, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia

² Institute for Preclinical Sciences, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenia

ABSTRACT

The traditional semen-processing technology used in swine industry is based on insemination of sows with chilled semen stored at 15-20°C. However, after short-term storage the quality of boar spermatozoa is diminished, therefore improved preservation is of high interest. Since the relations of routine analyses, which are based on concentration and evaluation of motility and morphology, and sperm quality after liquid storage are still debatable, there is a need for new tests of semen parameters and new biomarkers in seminal plasma that will help us predict sperm quality after storage.

Reproductive performance depends on metabolic processes; therefore, assessment of metabolic status of spermatozoa could provide valuable information for predicting sperm fertilizing capacity. We developed and diagnostically evaluated the resazurin reduction assay, which was shown to be a reliable and easy to perform test that requires no sophisticated equipment. Therefore, the assay is a valuable method for assessing the quality of boar spermatozoa, which could be of benefit to livestock producers and veterinary practitioners (Zrimšek et al., 2004; Zrimšek et al., 2006).

The aim of our work in the field of biomarkers for assessing the quality of boar semen was to address the question whether changes in boar semen quality after short-term storage could be predicted on the basis of quality semen parameters obtained on the day of semen collection under commercial conditions. All proposed biomarkers were evaluated from diagnostic and prognostic point of view using ROC (receiver operating characteristics) analysis. Our results have demonstrated that TNF- α , together with progressive motility and morphology, could contribute to the prediction of quality of short-term stored semen (Mrkun et al., 2013). Among biomarkers of oxidative stress, superoxide dismutase in boar seminal plasma was found to be a reliable marker to distinguish between satisfactory and unsatisfactory semen after liquid storage (Zakošek Pipan et al., 2014). Macro- and microelements in seminal plasma are shown to be implicated in boar sperm quality and may be important biomarkers of boar sperm quality after liquid storage. Our results sustain that the evaluation of Se in fresh boar seminal plasma can serve as an additional tool in predicting sperm quality after storage; Se levels correlated significantly with motility, progressive motility and morphology after storage, all of which are routinely used for semen evaluation and also with tail membrane integrity, viability and intact DNA. Mitochondrial function is preserved better by higher levels of Zn, while higher levels of Cu decreased mitochondrial function, but led to better preservation of DNA. It is also evident that higher levels of Fe were associated with higher proportions of live spermatozoa and of spermatozoa with normal morphology after three days of storage, while higher levels of Ca and Mg in fresh seminal plasma were associated with lower percentages of progressive motile spermatozoa and with a decreased proportion of spermatozoa with intact DNA. (Zakošek Pipan et al., 2017).

Seminal plasma contains low-molecular weight components that can exert a harmful effect on sperm function; however, some of them have antioxidant properties. We have evaluated the effect of removing the low-molecular weight components from seminal plasma together with the addition of a α -tocopherol on boar semen quality after 72 hours of liquid storage. This improved procedure kept the lipid peroxidation, mitochondrial activity and DNA fragmentation at the same level as in native semen samples. Dialysing semen and adding α -tocopherol also led to higher progressive motility, a higher

proportion of morphologically normal spermatozoa and a significantly lower level of acrosomal reacted spermatozoa compared to non-dialyzed semen samples after 72 hours of storage. Besides better preservation of dialysed semen with α -tocopherol, the reduction of oxidative stress was noticed in semen after conservation with the improved procedure (Zakošek Pipan et al., 2017).

NEW ASSAY FOR DETECTING SEMEN CHARACTERISTICS

The resazurin reduction assay depends on the ability of metabolically active cells to reduce the resazurin redox dye to resorufin. Resazurin is a non-toxic blue redox dye, itself non-fluorescent until it is reduced to the pink coloured and highly red fluorescent resorufin by dehydrogenase activity (Dart et al., 1994). Resazurin is effectively reduced in mitochondria, making it useful to assess mitochondrial metabolic activity. In the present study we applied and made a diagnostic evaluation of a spectrophotometric application of the resazurin reduction assay to assess the colour change of resazurin reduction in butanol extracted colour to evaluate boar semen quality. The absorption peaks for resazurin and resorufin were found to be 610 and 575 nm, respectively. Absorbance at 610 nm, where the minimum overlap of the two peaks was observed, was used in further analysis. Spearman rank correlation analysis was used to determine the correlation between the resazurin reduction assay and various semen parameters. The highest correlations were observed with the concentration of motile spermatozoa ($r=-0.841$; $P<0.001$), sperm concentration ($r=-0.833$; $P<0.001$), sperm index ($r=-0.826$; $P<0.001$) and concentration of viable spermatozoa ($r=-0.763$; $P<0.001$). Sensitivity and specificity, at 94.1 % and 91.7 %, respectively, indicate that the present test is highly accurate in discriminating between the samples according to the sperm index. When motile sperm concentration was used to distinguish between good and poor samples, high sensitivity (93.6 %) was also found, whereas the test was only moderately, 80.0 %, specific. The stability of butanol extracts in terms of A_{610} at different times of measurement confirmed that the resazurin reduction could be spectrophotometrically measured within 7 days from the time of assay performance, making the assay much more useful. Based on these results, the assay could be used as an additional tool for evaluating the quality of boar semen (Zrimšek et al., 2004).

The accuracy of the spectrophotometric application of the resazurin reduction assay was assessed using receiver operating characteristic analysis. Areas under receiver operating characteristics (ROC) curves for motile sperm concentration and sperm index (SI: sperm concentration multiplied by the square root of percentage motility multiplied by the percentage normal morphology) were 0.922. The best discrimination between poor and good semen samples according to sperm index was achieved at a cut-off point of $A_{610}=0.209$, where high of sensitivity (94.1%) and specificity (91.7%) were calculated. The assay was less accurate when motile sperm concentration was used as the criterion value, yielding sensitivity and specificity of 88.2 and 87.5%, respectively. Likelihood ratios (LR's) indicate that absorbances lower than 0.209 were at least 11.3 times as likely to be found in good semen samples as in poor according to SI, whereas in the case of motile sperm concentration LR was calculated to be 7.06. These results show that the resazurin reduction assay combined with spectrophotometry is an accurate method of assessing the quality of boar semen (Zrimšek et al., 2006).

NEW BIOMARKERS IN SEMINAL PLASMA

Tumour necrosis factor (TNF- α)

Tumour necrosis factor (TNF- α) was identified in boar seminal plasma, showing positive correlations with several sperm quality factors (Turba et al., 2007). Under physiological conditions, spermatozoa and seminal plasma enter the uterus, bringing a certain set of cytokines. The induction of cytokines is considered one of the very first steps in the cascade of the events ultimately leading up to implantation (Robertson, 2005). However, the cytokine content of the porcine ejaculate has not yet been tested (Taylor et al., 2009). Cytokines meet uterine epithelial cells and resident leukocytes within the uterus. Porcine seminal plasma proteins stimulate macrophages and mast cells to release the proinflammatory cytokine TNF- α and the anti-inflammatory IL-4, respectively (Assreuy et al., 2003).

The aim of our study was to address the question of whether changes in boar semen quality after short-term storage could be predicted based on standard semen parameters and TNF- α level obtained on the day of semen collection under commercial conditions. Progressive motility showed the highest positive correlation with morphology on day 0 of collection, and progressive motility on day 3

($P < 0.05$) a negative correlation with acrosome abnormalities ($P < 0.05$). According to the AUCs (area under ROC (receiver operating characteristics) curve) progressive motility could also be used in predicting semen quality after 3 days of storage ($AUC > 0.5$; $P < 0.05$). TNF- α in seminal plasma is the only parameter measured on day 0 to show a significant correlation with percentage of viable spermatozoa after 3 days of semen storage ($r = -0.495$, $P < 0.05$). ROC analysis shows that TNF- α level is helpful in discriminating viability outcome after semen storage ($AUC = 0.94$, $P < 0.001$). We can predict with 92.35% certainty that fresh semen samples with more than 150 pg/ml of TNF- α in seminal plasma will retain more than 85% of viable spermatozoa after 3 days of storage. Thus, TNF- α can contribute to the prediction of quality of short-term stored semen (Mrkun et al., 2013).

Superoxide dismutase (SOD)

Seminal plasma is endowed with low molecular non-enzymatic and enzymatic defence mechanisms that can protect against reactive oxygen species (ROS) (Kowalowka, 2008). The protective antioxidant compounds are located in organelles, subcellular compartments or the extracellular space enabling maximum cellular protection to occur. Species vary widely in the effectiveness of their antioxidant defence against ROS. Antioxidant system of the living cell includes three major levels of defence (Surai, 2006). The first level of defence is responsible for prevention of free radical formation by removing precursors of free radicals or by inactivating catalysts and consists of three antioxidant enzymes namely SOD, glutathione peroxidase (GP), and catalase (CAT) plus metal-binding proteins. Since the superoxide radical is the main free radical produced in physiological conditions in the cell (Halliwell, 1994) SOD is considered to be the main element of the first level of antioxidant defence in the cell. In boars, the seminal plasma is endowed with high quantities of SOD, but somewhat lower amounts of GP (Kowalowka et al., 2008). Due to the lack of catalase-like activity in boar spermatozoa and seminal plasma, the protection of spermatozoa against ROS is provided mainly by the antioxidant properties of the seminal plasma. SOD protects spermatozoa by catalysing the dismutation of superoxide anions to hydrogen peroxide and oxygen. The presence of high SOD activity in the seminal plasma protects mature spermatozoa against excessive superoxide anion dismutation (Kowalowka, 2008).

In our study boar semen quality was measured to determine whether changes in superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (TAC) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) after 3 days of liquid storage could be predicted. SOD in seminal plasma on day 0 correlated significantly with progressive motility ($r = -0.686$; $P < 0.05$) and viability ($r = -0.513$; $P < 0.05$) after storage. TBARS correlated only with motility ($r = -0.480$, $P < 0.05$) after storage. Semen samples that, after 3 days of storage, fulfilled all criteria for semen characteristics (viability $> 85\%$, motility $> 70\%$, progressive motility $> 25\%$, normal morphology $> 50\%$) had significantly lower SOD levels on the day of semen collection than those with at least one criteria not fulfilled ($P < 0.05$) following storage. Therefore, receiver operating characteristics (ROC) analysis was used to evaluate SOD in fresh seminal plasma to distinguish between satisfactory and unsatisfactory semen samples after storage. SOD levels of less than 1.05 U/ml predicted with 87.5% accuracy that fresh semen will suit the requirements for satisfactory semen characteristics after storage, while semen with SOD levels higher than 1.05 U/ml will, after storage, not fulfil with 100% accuracy at least one semen characteristic. These results support the proposal that SOD in fresh boar semen can be used as a predictor of semen quality after 3 days of storage (Zakošek Pipan, 2014).

Macro- and micro elements in seminal plasma

Seminal plasma has important regulatory functions in various processes before penetration of spermatozoa to oocytes. It is well known that ionic environment has a high influence on sperm function in humans. Therefore, the World Health Organization (WHO) advise assessment of seminal plasma including the analysis of some macro- and micro- elements, like zinc and selenium (WHO 2010, Chia et al., 2000), that are associated with semen quality in humans due to their antioxidant properties (Chia et al., 2000). Essential trace elements, like zinc and copper, are involved in carbohydrate and lipid metabolism and in immune function (Massnyi et al., 2003). In men with Se deficiency there is a loss of spermatozoa motility, breakage at spermatozoa midpiece level and increase incidence of sperm head abnormalities (Agarwal et al., 2003). In boars, however, adding Se to their diet resulted in controversial

results. In a recent studies Se supplementation did not affect semen quantity or sperm quality, but it increased predominant selenoprotein PHGPx, which is responsible for integrity of mature spermatozoa (Martins et al., 2015). Low levels of Zn have been found in seminal plasma of infertile men (Chia et al., 2000). Its deficiency results in disorders of testicular development and spermatogenic failure (Cigankova et al., 1998). Zn is crucial to the quality of sperm and acts as a cofactor for many enzymes (Eskenazi et al., 2005). In boars, there is a higher zinc level when compared to other animals (Massnyi et al., 2003). However, it is not known how selenium, zinc or other elements affect boar spermatozoa.

Growing evidence indicates that macro- and microelements in the seminal plasma of different domestic animals and humans are of great importance due to their roles in sperm metabolism, function, survival and oxidative stress. There are some studies about macro and micro elements in boars (Massnyi et al., 2003; Rodriguez et al., 2013), but the influence of elements on semen characteristics needs further investigation because only correlations between concentration of elements and basic semen characteristics were studied (Rodriguez et al., 2013).

In our study, therefore, the concentrations of macro- and microelements in fresh boar seminal plasma were evaluated, and their relations to sperm quality parameters were investigated after three days of liquid storage. Semen volume, concentration, sperm motility, morphology, tail membrane integrity, plasma membrane permeability, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation were estimated on the day of collection (day 0) and day 3 (72 h) of storage at 15-17°C. Seminal plasma was separated, and the concentrations of macroelements (Na, K, Ca, and Mg) and microelements (Cu, Fe, Zn and Se) were determined. After three days of storage, many correlations were observed between the macro- and microelements in fresh boar seminal plasma and semen characteristics. However, only Se levels correlated significantly on day 3 with motility, progressive motility and morphology, all of which are routinely used for semen evaluation. Se levels also correlated on day 3 with tail membrane integrity, viability and intact DNA ($P<0.05$). The correlation coefficients showed that mitochondrial function was better preserved at higher levels of Zn, while higher levels of Cu decreased mitochondrial function, but led to the better preservation of DNA.

It was also evident that higher levels of Fe were associated with higher proportions of live spermatozoa and of spermatozoa with normal morphology after three days of storage ($P<0.05$), while higher levels of Ca and Mg in fresh seminal plasma were associated with lower percentages of progressive motile spermatozoa and with a decreased proportion of spermatozoa with intact DNA ($P<0.05$). Macro- and microelements were shown to be associated with boar sperm quality and may be important biomarkers of boar sperm quality after liquid storage. Our results demonstrated that the evaluation of Se in fresh boar seminal plasma can serve as an additional tool in predicting sperm quality after storage (Zakošek Pipan et al., 2017).

Although higher concentrations of zinc and selenium in fresh seminal plasma are correlated with better semen quality after three days of storage in our study, current evidence suggests that optimal levels of selenium and zinc are needed for good semen quality (Ferguson et al., 2012). To predict semen quality after three days of storage with selenium and zinc, reference values should be established on higher numbers of semen samples. Selenium and zinc in fresh seminal plasma have to be than evaluated as potential predictors of semen quality after storage. In case of high predictive value of selenium and zinc according to semen quality after storage, they could be used in future as an additional tool in semen evaluation.

IMPROVED PRESERVATION OF BOAR SEMEN

Low molecular weight proteins (LMWC)

Seminal plasma contains LMWC that can exert a harmful effect on sperm function. Therefore, their elimination can minimize the detrimental effect associated with dilution and storage of boar semen (Fraser et al., 2007). The aim of our study was to determine if the removal of LMWC using dialysis prior to cooling could improve the quality of liquid-stored boar semen. There was no significant difference between dialysed and control semen after storage ($P>0.05$), even though viability of liquid stored semen decreased in comparison to fresh semen ($P<0.001$). Dialysed semen had better preservation of sperm motility ($P=0.046$) and even greater preservation of progressive motility ($P=0.029$) as well as higher percentage of morphologically normal spermatozoa ($P<0.001$) when compared to non-dialysed control

samples. Higher level of uncapacitated spermatozoa and lower level of acrosomal reacted spermatozoa in dialysed semen samples in comparison to non-dialysed ones indicate that dialysis reduced capacitation which is induced by cooling process ($P=0.006$ and $P=0.005$, respectively) (Mrkun et al., 2009).

Semen and oxidative stress

Based on results of our previous study (Mrkun et al., 2009) it can be concluded that removal of LMWC from the seminal plasma significantly improves semen characteristics of liquid-stored semen. However, removal of low molecular weight antioxidants in seminal plasma could influence the total antioxidant status and antiperoxidant activity of the seminal plasma. Therefore, we investigated the effect of semen dialysis prior to cooling and storing on the total antioxidant capacity (TAC), SOD activity and lipid peroxidation status in seminal plasma.

Removal of LMWC from seminal plasma by dialysis resulted in a significantly higher levels of SOD in control samples than dialyzed ones ($P<0.05$). Dialyses yielded significant decrease in TAC ($P<0.05$) and increase in the level of lipid peroxidation ($P<0.05$). This was in agreement with our hypothesis that removal of low molecular weight antioxidants in seminal plasma with dialysis improved semen quality after three days of storage at 15-17°C; but it also decreased TAC of liquid stored boar semen and increased lipid peroxidation (Zakošek Pipan et al., 2014).

Function of the antioxidants system in boar semen

Boar spermatozoa are characterized by high susceptibility to lipid peroxidation (Cerolini et al., 2000). Indeed, boar spermatozoa are unique in structure and chemical composition and contain high proportions of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the phospholipid fraction of their membranes (Cerolini et al., 2000; Surai, 2006). This feature of these highly specialized cells is a reflection of the specific needs of their membranes for high levels of fluidity and flexibility, which are necessary for sperm motility and fusion with the egg. This functional advantage is, however, associated with disadvantages in terms of the susceptibility of sperm to lipid peroxidation. Oxidative stress occurs when there is an imbalance between ROS and the antioxidants that scavenge surplus free radicals. ROS are natural products of cellular metabolism which, in physiological amounts, are essential requirements of spermatozoa for sperm processes leading to successful fertilization, such as capacitation, hyperactivated motility and acrosomal reaction (Agarwal et al., 2004). However, excess ROS concentrations can cause detrimental effects on spermatozoa through two principals: they can damage sperm membrane or damage sperm DNA resulting in lower sperm motility (Bennetts et al., 2005) as well as their lower ability to fertilize oocytes. Excessive amount of ROS have been associated with negative changes in sperm concentration, motility and morphology. Furthermore, DNA fragmentation may harm the paternal genetic contribution to the developing embryo. However, in ejaculate there are different protective mechanisms designed to protect spermatozoa against oxidative stress (Strzezek et al., 2000). Spermatozoa itself contain predominately antioxidant enzymes like superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GP) (Strzezek, 2002). Boar ejaculate is endowed with high quantities of SOD protecting spermatozoa against lipid peroxidation (Kowalowka et al., 2008) by catalyzing the dismutation of superoxide anions to hydrogen peroxide (H_2O_2) and oxygen (Strzezek et al., 2002). On the other hand, boar semen has extremely low level of catalase, which converts H_2O_2 to water and oxygen (Kowalowka et al., 2008). Therefore, boar semen often has increased H_2O_2 (Kowalowka et al. 2008), and it is likely that H_2O_2 together with high membrane permeability (Halliwell and Gutteridge, 1999) is responsible for much of the damage to cell structure and function of boar spermatozoa (Kim et al., 2011). Seminal plasma contains also, additionally to antioxidant enzymes, low molecular weight non-enzymatic antioxidants like L-glutathione (GSH), L-ergothioneine (ERT), alpha tocopherol and others (Ishii et al., 2005), that helps to protect against ROS and can counterbalance the lower amount of antioxidant catalase. Specifically, vitamin E (alpha-tocopherol) can break the covalent links that ROS have formed between fatty acid side chains in membrane lipids, and is one of the major membrane protectants against ROS and lipid peroxidation. Using food supplemented with vitamin E has been shown to enhance the boar ejaculate volume and sperm concentration. The addition of vitamin E to the storage diluent increased the sperm resistance to lipid peroxidation (Cerolini et al., 2000) and improved quality of cryopreserved spermatozoa (Pena et al., 2004). Alpha-tocopherol supplementation at 200 μ M concentration protected

the sperm against excessive ROS generation by reducing lipid peroxidation and lowering the expression of apoptosis genes (Jeong et al., 2009).

In previous study (Zakošek Pipan et al., 2014) we found out that removal of low molecular weight antioxidants from seminal plasma could contribute to oxidative stress, because some of the removed components can have an antioxidant property. Therefore, we have evaluated the effect of removing the low-molecular weight components from seminal plasma together with the addition of an α -tocopherol on boar semen quality after 72 hours of liquid storage.

We found out that this improved procedure kept the lipid peroxidation, mitochondrial activity and DNA fragmentation at the same level as in native semen samples ($P>0.05$). Dialysing semen and adding α -tocopherol also led to higher progressive motility, a higher proportion of morphologically normal spermatozoa and a significantly lower level of acrosomal reacted spermatozoa compared to non-dialysed semen samples after 72 hours of storage ($P<0.05$). Besides better preservation of dialysed semen with α -tocopherol, the reduction of oxidative stress was noticed in semen after conservation with the improved procedure (Zakošek Pipan et al., 2017).

References:

1. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003;79:829–843.
2. Agarwal A, Allamaneni SS, Said TM, Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species. *Reprod Biomed* 2004, Online 9: 466–468.
3. Alm K, Taponen J, Dahlbom M, Tuunainen E, Koskinen E, Andersson M. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. *Theriogenology* 2001, 56: 677–684.
4. Assreuy AM, Alencar NM, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Feitosa RF, Cunha FQ, Calvete JJ, Ribeiro RA. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. *Biol Reprod* 2003, 68: 1836–1841.
5. Bennetts LE, Aitken RJ. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2005, 71: 77–87.
6. Cerolini S, Maldjian A, Surai PF, Noble RC. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci* 2000, 58: 99–111.
7. Cigankova V, Mesaros P, Bires J, Ledecy v, Ciganek J, Tomajkova E. Morphological structure of the testes in stallion at zinc deficiency. *Slo Vet J* 1998; 23:97–100.
8. Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay SK. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl* 2000; 21:53–7.
9. Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Slotter E, Block G, Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 2005;20:1006–12.
10. Ferguson LR, Karunasinghe N, Zhu S, Wang AH. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 2012; 733: 100–10.
11. Gadea J and Matas C. Sperm factors related to *in vitro* penetration of porcine oocytes. *Theriogenology* 2000, 54: 1343–1357.
12. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev* 1994, 52:253–265.
13. Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. Oxford University Press 1999, Oxford, UK.
14. Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, et al. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1 knockout mice under heat stress. *Free Radic Res* 2005; 39: 697–705.
15. Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Kumar BM, Balasubramanian S, Rho GJ. Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiol* 2009; 58(2):181–9. doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.12.004. Epub 2008 Dec 25.
16. Kim S, Lee YJ, Kim YJ. Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 °C. *Anim Reprod Sci* 2011; 124: 118–24.
17. Kowalowka M, Wysocki P, Fraser L, Strzezek J. Extracellular superoxid dismutase of boar seminal plasma. *Reprod Dom Anim* 2008, 43: 490–6.
18. Massnyi P, Trandzik J, Nad P, Toman R, Skalick M, Kornekov B. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asian j Androl* 2003, 5: 101–4.
19. Mrkun J, Potočnik K, Kosec M, Zrimšek P. Improvement of biotechnological process for conservation of liquid-stored boar semen using dialysis prior to cooling. *Acta. Vet. Bulgaria* 2009, 62: 849–54.
20. Mrkun J, Kosec M, Zrimšek P. Value of semen parameters, with special reference to TNF - alfa in predicting the quality of boar semen after short - term storage. *Acta veterinaria Hungarica* 2013, 61(2): 209–219.
21. Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA, Pang MG. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. *Anim Reprod Sci* 2007, 121: 131–138.

22.Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 2007, 134: 3–17. 23.Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 2005, 322: 43–52. 24.Rodríguez-Martínez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim* 2003, 38: 312–318. 25.Rodríguez A, Rijsselaere T, Beek J, Vyt P, Van Soom A, Maes D. Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2013, 59: 5–12. 26.Srtzezek J, Fraser L, Demianowicz W, Kordan W, Wysocki P, Holody D. Effect of depletion tests (DT) on the composition of boar semen. *Theriogenology* 2000, 54: 949-63. 27.Strzezek J, Saiz-Cidoncha F, Wysocki P, Tyszkiewicz A, Jastrzebski M. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. *Anim Sci Pap Rep* 2002, 20:255-66. 28.Surai PF. *Selenium in Nutrition and Health*. Nottingham University Press 2006, Nottingham, UK. 29.Taylor U, Zerbe H, Seyfert HM, Rath D, Baulain U, Langner KF, Schubert HJ. Porcine spermatozoa inhibit post-breeding cytokine induction in uterine epithelial cells *in vivo*. *Anim Reprod Sci* 2009, 115: 279–289. 30.Turba ME, Fantinati P, Bernardini C, Gentilini F, Bacci ML, Forni M. Relationship between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. *Anim Reprod Sci* 2007, 99: 72–81. 31.Zakošek Pipan M, Mrkun J, Kosec M, Nemeč Svete A, Zrimšek P. Superoxide dismutase: a predicting factor for boar semen characteristics for short-term preservation. *BioMed research international*, ISSN 2314-6141, 2014, 2014: 1-7. 32.Zakošek Pipan M, Mrkun J, Nemeč Svete A, Zrimšek P. Improvement of liquid stored boar semen quality by removing low molecular weight proteins and supplementation with [alpha]-tocopherol. *Animal reproduction science*, ISSN 0378-4320. [Print ed.], 2017, 18: 52-61. 33.Zakošek Pipan M, Mrkun J, Jakovac Strajn B, Pavšič Vrtač K, Kos J, Pišlar A, Zrimšek P. The influence of macro- and microelements in seminal plasma on diluted boar sperm quality. *Acta Vet Scandinavica* 2017, 11 (59): 1-9. 34.Zrimšek P, Kunc J, Kosec M, Mrkun J. Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality. *Inter J Androl* 2004, 27 (1): 57-62. 35.Zrimšek P, Kosec M, Kunc J, Mrkun J. Determination of the diagnostic value of the resazurin reduction assay for evaluating boar semen by receiver operating characteristic analysis. *Asian J Androl* 2006, 8 (3): 343-348.

**NOVE METODE, BIOMARKERI I BIOTEHNOLOŠKI PROCES KOJIM SE POBOLJŠAVA
PREZERVACIJA I PREDVIĐANJE KVALITETA SEMENA NERASTOVA ČUVANOG U
TEČNOM MEDIJUMU**

Maja Zakošek Pipan¹, Janko Mrkun¹, Petra Zrimšek²

¹Klinika za reprodukciju i velike životinje, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija;

²Institut prekliničkih nauka, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija

Kratak sadržaj

Tradicionalne metode i tehnologije obrade semena nerastova koje se koriste u svinjarstvu, zasnivaju se na osemenjavanju krmača semenom koje je ohlađeno na 15-20 °C. Međutim, posle kratkog perioda vremena čuvanja, kvalitet semena nerastova opada, pa je iz tog razloga poboljšanje metoda očuvanja karakteristika semena od velikog značaja. U odnosu na rutinske metode analize, koje se zasnivaju na koncentraciji spermatozoida kao i evaluaciji motiliteta i morfologiji, kvalitet semena posle čuvanja u tečnom medijumu je pod znakom pitanja i predmet debata u stručnim krugovima. Otuda postoji potreba da se uspostave novi parametri testova za seme nerastova kao i novi biomarkeri semenske plazme, a koji bi bili od pomoći prilikom predviđanja i procene kvaliteta sperme posle čuvanja.

Reproduktivne karakteristike zavise od metaboličkih procesa, otuda procena metaboličkog statusa spermatozoida može da obezbedi značajne informacije koje mogu da doprinesu predviđanju fertilnog kapaciteta spermatozoida. U okviru ove studije, razvijena je i dijagnostički evaluirana redukciona resazurin metoda, koja se pokazala kao pouzdana je jednostavna metoda testiranja koja ne zahteva komplikovanu opremu. Iz tog razloga, ova je metoda vredna u proceni kvaliteta spermatozoida nerastova i može da bude od koristi proizvođačima u svinjarskoj industriji kao i veterinarima terenske prakse (Zrimšek i sar., 2004; Zrimšek i sar., 2006).

Cilj rada je bio da se na osnovu biomarkera koji se koriste za procenu kvaliteta sperme nerastova, odgovori na pitanje da li promene u kvalitetu sperme, posle kraćeg stajanja, mogu da se predvide na osnovu parametara kvaliteta sperme dobijene na dan sakupljanja ejakulata, u uslovima komercijalne primene. Svi biomarkeri koji su predloženi, bili su evaluirani u odnosu na dijagnostičke i prognostičke aspekte, uz upotrebu ROC (receiver operating characteristics) analize. Dobijeni rezultati su pokazali da TNF- α , zajedno sa parametrima progresivnog motiliteta i morfologije, mogu da doprinesu mogućnostima predviđanja kvaliteta semena koje je čuvano u kratkom vremenskom periodu (Mrkun i sar., 2013). Od svih parametara oksidativnog stresa, ustanovljeno je da superoksid dismutaza u semenoj plazmi nerastova predstavlja pouzdani marker kojime bi se razlikovala zadovoljavajuća od nezadovoljavajuće sperme posle čuvanja u tečnom medijumu (Zakošek Pipan i sar., 2014). Ustanovljeno je da su makro i mikroelementi semene plazme pokazatelji kvaliteta sperme nerastova i da mogu da budu značajni biomarkeri kvaliteta sperme nerastova posle čuvanja u tečnom medijumu. Rezultati studije podržavaju stav da evaluacija selena u svežoj semenoj plazmi nerastova, može da se koristi kao dodatna metoda predviđanja kvaliteta sperme posle čuvanja; koncentracije selena (Se) su u značajnoj korelaciji sa motilitetom, progresivnim motilitetom i morfologijom spermatozoida, posle čuvanja. Navedene se metode, zajedno sa procenom integriteta repa spermatozoida, vijabilnosti i intaktnosti DNK, rutinski koriste za evaluaciju semena nerastova. Funkcije mitohondrija su bile bolje očuvane pri visokom koncentracijama cinka (Zn), a visoke koncentracije bakra su smanjivale funkcije mitohondrija, ali su uslovljavale bolje očuvanje DNK. Isto tako, očigledno je da su visoke koncentracije gvožđa bile povezane sa većim procentom živih spermatozoida i sa normalnom morfologijom spermatozoida tri dana posle čuvanja. Veće koncentracije kalcijuma i magnezijuma u svežoj semenoj plazmi su bile povezane sa nižim procentom progresivne pokretljivosti spermatozoida kao i sa smanjenom proporcijom spermatozoida sa intaktnom DNK (Zakošek Pipan i sar., 2017).

Semena plazma sadrži komponente male molekulske mase koji mogu da dovedu do oštećenja funkcije spermatozoida; međutim, neke od ovih komponenti poseduju antioksidativna svojstva. Obavljena je evaluacija efekata uklanjanja komponenti male molekulske mase iz semene plazme zajedno sa dodavanjem α -tokoferola, a na kvalitet semena nerastova, posle 72 sata čuvanja u tečnom medijumu. Ova poboljšana procedura, održavala je peroksidaciju masti, aktivnost mitohondrija i fragmentaciju DNK spermatozoida na istom nivou kao kod uzoraka nativne sperme (bez čuvanja u tečnom medijumu). Dijaliza sperme kao i dodavanje α -tokoferola, takođe je uslovljavalo veću progresivnu pokretljivost, veću proporciju morfološki normalnih spermatozoida kao i značajno niži nivo spermatozoida sa reaktivnim akrozomom u poređenju sa uzorcima nedijalizovane sperme, posle čuvanja u trajanju od 72 sata. Kod sperme koja je bila konzervisana sa navedenom poboljšanom procedurom, ustanovljeno je bolje očuvanje dijalizovane sperme sa α -tokoferolom kao i redukcija oksidativnog stresa (Zakošek Pipan i sar., 2017).

NOVE METODE ZA DETEKCIJU KARAKTERISTIKA SPERME

Test redukcije resazirina zavisi od sposobnosti metabolički aktivnih ćelija da redukuju redoks resazurin boju u resorufin. Resazurin je netoksična redoks boja, koja sama po sebi ne fluorescira ali koja pod dejstvom dehidrogenaza, biva redukovana u resorufin boju koja je ljubičaste boje i koja snažno fluorescira crvenom bojom (Dart i sar., 1994). Efikasna redukcija resazurina se obavlja u mitohondrijama, što je od značaja za uspešnu procenu metaboličke aktivnosti mitohondrija.

U ovoj studiji, u cilju evaluacije kvaliteta sperme nerastova, razvijena je i primenjena dijagnostička evaluacija primene spektrofotometrijske metode redukcije resazurina, radi procene promene boje redukcije resazurina u butanol ekstrahovanoj boji. Maksimalne vrednosti absorpcije resazurina i resarufina u bile su u vrednostima 610 odnosno, 575 nm za resarufin. Kada je uočeno minimalno preklapanje dve maksimalne vrednosti, pri talasnoj dužini od 610 nm, ispitivanja su bila nastavljena. Upotrebljena je Spearman korelacija rangova u cilju određivanja korelacije između resazurin redukcione metode i različitih parametara sperme. Najveći stepen korelacije je bio uočen između koncentracije spermatozoida ($r=-0,841$; $P<0,001$), koncentracije spermatozoida ($r=-0,833$; $P<0,001$), indeksa spermatozoida ($-0,826$; $P<0,001$) and koncentracije vijabilnih spermatozoida ($r=-0,763$; $P<0,001$). Osetljivost na nivou od 94,1% kao i specifičnost na nivou 91,5% je ukazivala da je dati test visoko validan u smislu diskriminacije između uzoraka, a u odnosu na indeks semena. U slučaju kada su koncentracije spermatozoida korišćene radi razlikovanja između dobrih i loših uzoraka, ustanovljena je visoka osetljivost (93,6%) pri čemu je je specifičnost bila samo na srednjem nivou (80,0%). Stabilnost butanol ekstrakta pri absorpcionoj vrednosti od A_{610} , u različitim periodima vremena merenja, potvrdili su stav da redukcija resazurina može da bude spektrofotometrijski merena u roku od 7 dana od trenutka obavljanja testa, što ovaj test čini značajno upotrebljivim. Na osnovu ovih rezultata, može da se zaključi da se ovaj test može da upotebljava kao dodatna metoda koja bi se koristila radi evaluacije kvaliteta semena nerastova (Zrimšek, i sar., 2004).

Tačnost primene testa spektrofotometrije u cilju procene redukcije resazirina bio je procenjan ROC (receiver operating characteristic) analizom. Površina ispod ROC krive za koncentraciju mobilnih spermatozoida i za indeks spermatozoida (SI: koncentracija spermatozoida pomnožena sa sumom kvadratnog korenoma procenta motiliteta i procenta spermatozoida sa normalnom morfologijom) bio je 0,922. Ustanovljeno je da je najbolji način razdvajanja loših i dobrih semena bio primenom indeksa semena pri čemu je granična vrednost pri A_{610} iznosila 0,209, pri čemu je osetljivost iznosila 94,1%, a specifičnost 91,7%. Metoda je bila manje validna u slučaju kada je koncentracija mobilnih spermatozoida bila upotrbebljavana kao kriterijum, pri čemu je specifičnost bila 88,5%, a osetljivost 87,5%. Odnos verovatnoće je ukazivao da je absorpcija manja od 0,209 bila moguća da se ustanovi 11,3 puta češće u slučaju da se radilo o dobrom semenu u poređenju sa uzorcima semena slabog kvaliteta, a prema SI. U slučaju koncentracije mobilnih spermatozoida, odnos verovatnoće je izračunat i iznosio je 7,06. Na osnovu ovih nalaza, može da se zaključi da test redukcije resazirina, zajedno sa spektrofotometrijskom analizom, može da se koristi kao validan i tačan metod kojim bi se procenila sperma nerastova (Zrimšek, i sar., 2006).

NOVI BIOMARKERI U SEMENOJ PLAZMI

Alfa-faktor nekroze tumora (TNF- α)

Alfa faktor nekroze tumora (TNF- α) je identifikovan u semenoj plazmi nerastova, pokazujući pozitivnu korelaciju sa nekoliko faktora koji ukazuju na kvalitet sperme (Turba, i sar., 2007). U fiziološkim okolnostima, spermatozoidi kao i semena plazma ulaze u uterus, noseći sa sobom nekoliko citokina. Smatra se da je indukcija citokina jedan od prvih koraka u kaskadnoj reakciji događaja koji vode ka implantaciji (Robertson, 2005). Međutim, sve do sada sadržaj citokina u ejakulatu nerastova nije bio testiran (Taylor, i sara., 2009). Citokini dolaze u kontakt sa epitelnim ćelijama i rezidentnim leukocitima koji su u uterusu. Proteini semene plazme nerastova stimulišu makrofage i mastocite u smislu oslobađanja proinflatornih citokina: (TNF- α) i anti-inflatornog IL4 citokona, koji sintetišu mastociti (Assreuy, i sar., 2003).

Cilj ove studije je bio da se odgovori na pitanje da li promene u kvalitetu semena nerastova posle čuvanja u kratkom vremenskom periodu, mogu da se predvide na osnovu standardnih parametara ejakulata i koncentracije TNF- α , dobijenih na dan sakupljanja sperme, u komercijalnim uslovima primene. Progresivni motilitet je pokazao kao najviši stepen pozitivne korelacije sa morfoloijom nultog dana (dan sakupljanja ejakulata). Progresivni motilitet trećeg dana ($P < 0,05$) je pokazao negativnu korelaciju u odnosu na nenormalnosti akrozoma ($P < 0,05$). Shodno AUC vrednostima (veličina koja pokazuje površinu ispod ROC krive), progresivni motilitet može isto tako da se koristi u predviđanju kvaliteta semena tri dana posle čuvanja ($AUC > 0,5$; $P < 0,05$). Alfa faktor nekroze tumora je jedini parametar koji je meren nultog dana, pokazivao značajnu korelaciju sa procentom vijabilnih spermatozoida trećeg dana čuvanja sperme ($r = 0,495$, $P < 0,05$). ROC analiza je pokazala da je koncentracija TNF- α , korisna u diskriminaciji i proceni ishoda vijabilnosti posle čuvanja semena ($AUC = 0,94$, $P < 0,001$). Zaključeno je da se sa 92,35% sigurnosti može da predvidi da će svež uzorak semena sa više od 150 pg/ml TNF- α , zadržati više od 85% vijabilnih spermatozoida, posle čuvanja u periodu vremena od tri dana. To znači da TNF- α , može da doprinese predviđanju kvaliteta semena nerastova u toku čuvanja u relativno kraćem vremenskom periodu (Mrkun, i sar., 2013).

Superoksid dismutaza (SOD)

U semenoj plazmi se nalaze ne-enzimski i enzimski faktori odbrane male molekulske mase koji mogu da je štite od reaktivnim oksidativnih molekula (ROS) (Kowalowka, 2008). Zaštitne antioksidativne komponente se nalaze locirane u organelama, subćelijskim regionima ili u ekstraćelijskom prostoru što obezbeđuje maksimalnu zaštitu ćelije. Efikanost antioksidativnih mehanizama protiv oksidativnih molekula značajno varira u odnosu na različite vrste životinja. Antioksidativni sistemi žive ćelije uključuju tri osnovne linije odbrane (Surai, 2006). Prvi nivo odbrane je odgovoran za prevenciju formiranja slobodnih radikala, uklanjanjem prekurzora slobodnih radikala ili inaktivacijom katalizatora i sastoje se od tri antioksidativna enzima: SOD, glutation peroksidaze (GP) i katalaze (CAT) kao i proteina koji vezuju metal.

S obzirom da su radikali superoksida osnovni slobodni radikali koji se proizvode u fiziološkim uslovima u ćelijama (Halliwell, 1994), smatra se da je superoksid dismutaza bitan element prve linije antioksidativne odbrane ćelije. Kod nerastova, semena plazma sadrži veću količinu superoksida dismutaze ali je koncentracija glutation peroksidaze do neke manja (Kowalowka, i sar., 2008). Kao posledica nedostatka aktivnosti nalik na katalazu u spermatozoidima i semenoj plazmi nerastova, zaštita spermatozoida od reaktivnih oksidativnih molekula se većim delom obezbeđuje antioksidativnim mehanizmima semene plazme. Superoksid dismutaza štiti spermatozoide putem katalize dismutacije superoksidnih anjona u vodonik peroksid i kiseonik. Prisustvo visokog nivoa aktivnosti superoksida dismutaze u semenoj plazmi štiti zrele spermatozoide od previsoke dismutacije skuperoksidnih anjona (Kowalowka, 2008).

U okviru ove studije, kvalitet semena nerastova je merena u cilju određivanja da li promene superoksida dismutaze (SOD), ukupnog antioksidacionog kapaciteta (TAC) i reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline (TBARS), posle tri dana čuvanja u tečnom medijumu, mogu da se uzmu kao elementi predviđanja očuvanja spermatozoida. Superoksid dismutaza u semenoj plazmi, nultog dana, značajno je bila u korelaciji sa progresivnim motilitetom ($r = -0,686$; $P < 0,05$) i vijabilnošću ($r = -0,513$;

$P < 0,05$), после чувања у наведеном периоду времена. У наведеном периоду времена, параметар TBARS је био у кorelaciji само са motilitetom ($r = -0,480$, $P < 0,05$). Узорци сперме који су три дана после чувања у тежном медијуму, задовољавали све критеријуме (vijabilnost $> 85\%$, motilitet $> 70\%$, progresivni motilitet $> 25\%$, normalne morfologije $> 50\%$), imali су значајно ниже концентрације SOD на дан узимања узорка семена у poređenju са оним који нису задовољавали бaрeм један од наведених критеријума ($P < 0,05$), а после чувања у наведеним периоду времена. На основу наведенога, ROC анализа је употребљена за евалуацију супероксид дисмутазе у свежим узорцима семене плазме у циљу разликовања између задовољавajuћих и незадовољавajuћих узорaka сперме, после чувања. SOD нивои мањи од 1,05 U/ml, су омогућавали предвиђање са 87,5% поузданости да ће свеж узрак сперме да задовољава карактеристике семена после чувања у наведеном периоду. Sперма са SOD концентрацијама од 1,05%, после наведеног периода времена, неће са 100% сигурности да задовољава бaрeм једну од наведених карактеристика семена. Ови резултати свакако подржавају став да SOD у свежим узорцима сперме може да се користи као елемент предвиђања квалитета семена, а после чувања у периоду времена од три дана (Zakošek Pipan, 2014).

Макро и микроелементи у семеној плазми

Семена плазма има значајну регулаторну улогу у различитим процесима који претходе пенетрацији сперматозоида у ооците. Добро је познато да код људи, јонске концентрације у условима у којима се налазе сперматозоиди, значајно утичу на њихову функцију. Из тог разлога, Светска здравствена организација (WHO), саветује да се обављају процене састава семене плазме, укључујући и анализе концентрације неких макро и микроелемената, као што су то на пример цинк или селен (WHO 2010). Добро је познато да су ови елементи, који поседују антиоксидационе карактеристике, повезани са квалитетом семена код људи (Chia и сар., 2000). Есенцијални елементи у траговима, као што су то на пример цинк или бакар, укључени су у метаболизме угљених хидрата и масти као и у имунске механизме (Massnyi и сар., 2003). Код мушкарaca код којих постоји дефицит селена, постоји губитак motiliteta сперматозоида, кртост и ломљивост средњег дела сперматозоида и повећање инциденције абнорманости сперматозоида (Agarwal и сар., 2003). Међутим, код нерастова, додавање селена у храни, као последицу има резултате који су контроверзни. Резултати недавних испитивања су показали да суплементација хранива селеном, није имала никакав ефекат на квантитет семена нити на квалитет сперме. Међутим, установљено је да је на тај начин повећан predominantan селенопротеин PHGPx, који је одговоран за интегритет зрелих сперматозоида (Martins и сар., 2015). Код инфertilних мушкарaca, установљене су мање концентрације цинка у семеној плазми (Chia и сар., 2000). Дефицит цинка има као последицу неправилности у развоју testisa и poreмећаје у сперматогенези (Cigankova и сар., 1998). Цинк је битан за квалитет сперме, а делује као кофактор у оквиру многих ензима (Eskenazi и сар., 2003). Код нерастова, а у poređenju са другим врстaма животиња, постоји значајно већа концентрација цинка (Massnyi и сар., 2003). Међутим, за сада се не зна како селен, цинк или други елементи утичу на сперматозоиде нерастова.

Све је већи број података који указују да макро и микроелементи у семеној плазми различитих врста домаћих животиња као и код људи има велики значај, а као последица њихове улоге у метаболizmu сперматозоида, функционисању, преживљавању и оксидативном стресу. Постоје неке студије које су се bavиле макро и микроелементима у сперма нерастова (Massnyi и сар., 2003; Rodriguez и сар., 2013). Међутим, неопходно је да се обаве додатна испитивања која би појаснила утицај ових елемената на карактеристике сперме зато што су до сада испитивања обављана само у односу на кorelaciju између концентрације елемената и основних карактеристика сперме (Rodriguez и сар., 2013).

Из тог разлога, у нашој студији обављена је евалуација концентрација макро и микроелемената у свежој семеној плазми нерастова, као и испитивања односа елемената на параметре квалитета, а после три дана чувања у тежном медијуму. На дан узимања узорка сперме (multi дан) као и три дана касније (73 сата), при чувању у тежном медијуму на температури од 15-17 °C, обављена су испитивања волумена сперме, концентрације, motiliteta сперматозоида, morfologije, интегритета membrane репа сперматозоида, permeabilности plasma membrane, потенцијала membrane mitochondrija као и fragmentација DNK. Концентрације макроелемената (Na, K, Ca и Mg) као и микроелемената (Cu, Fe, ZN и Se) су одређиване после separacije семене плазме. Током испитивања, уочене су бројне кorelacije између вредности концентрација макро и микроелемената у свежем узорку семене плазме са једне стране и карактеристика сперме, са друге, три дана после чувања у тежном медијуму.

Međutim, posle tri dana čuvanja sperme u tečnom medijumu, samo je u slučaju selena uočena značajna korelacija između koncentracije ovog mikroelementa i motiliteta, progresivnog motiliteta i morfologije (radi se o osnovnim karakteristikama spermatozoida koje se koriste prilikom evaluacije kvaliteta sperme). Posle tri dana čuvanja sperme u tečnom medijumu, koncentracije selena u svežem uzorku su takođe bile u korelaciji sa integritetom membrane repa spermatozoida, vijabilnošću i intaktnošću DNK ($P < 0,05$). Koeficijent korelacije je pokazao da je funkcionisanje mitohondrija bila očuvanija u slučaju većih koncentracija cinka. Veće koncentracije baktra su uslovljavale smanjenje funkcionisanja mitohondrija, međutim u tom je slučaju uočena bolja očuvanost DNK.

U okviru studije je uočeno da su povećane koncentracije gvožđa bile povezane sa većom proporcijom živih spermatozoida kao i sa spermatozoidima sa normalnom morfologijom, posle tri dana čuvanja u tečnom medijumu ($P < 0,05$). Sa druge strane, veće koncentracije kalcijuma i magnezijuma, u svežem uzorku semene plazme, bile su povezane sa manjim procentom progresivnog motiliteta spermatozoida kao i sa smanjenjem proporcije spermatozoida sa intaktnim DNK molekulom ($P < 0,05$). Rezultati su pokazali da su makro i mikroelementi povezani sa kvalitetom sperme nerastova. Isto tako, prikazano je da se makro i mikroelementi mogu da koriste kao biomarkeri kvaliteta sperme nerastova, a posle čuvanja u tečnom medijumu. Naši su rezultati pokazali da se evaluacija koncentracije selena u svežem uzorku semene plazme, može da koristi kao dodatni element i pokazatelj kojim bi se mogao da predvidi kvalitet sperme, tokom čuvanja (Zakošek Pipan i sar., 2017).

Iako je u našoj studiji prikazano da su veće koncentracije cinka i selena u svežem uzorku semene plazme u korelaciji sa boljim kvalitetom sperme posle tri dana čuvanja u tečnom medijumu, ipak se smatra da su za dobar kvalitet semena nerastova potrebne optimalne koncentracije ovih mikroelemenata (Ferguson i sar., 2012). Iz tog razloga, da bi mogao da se proceni i predvidi kvalitet semena, tri dana posle čuvanja u tečnom medijumu, neophodno je da se ustanove referentne koncentracije selena i cinka i to na većem uzorku semena. Samo u tom slučaju, koncentracije selena i cinka u svežem uzorku semene plazme, mogle bi da se procene kao pouzdani parametri kvaliteta semena posle čuvanja. U slučaju da se pokaže da postoji visok stepen procene i predviđanja kvaliteta posle čuvanja sperme u tečnom mediju, u odnosu na koncentraciju selena i cinka u semenu, sadržaj ovih mikroelemenata bi mogao da bude dodatni metod evaluacije sperme nerastova.

POBOLJŠANI METOD PREZERVACIJE SPERME NERASTOVA

Proteini male molekulske mase (LMWC)

Semena plazma sadrži proteine male molekulske mase koji mogu da imaju štetan uticaj na funkcionisanje spermatozoida. Otuda eliminacija ovih molekula može da smanji na minimum štetne efekte koji su povezani sa rastvaranjem i čuvanjem sperme nerastova (Fraser i sar., 2007). U okviru naše studije, obavljeno je ispitivanje uticaja uklanjanja proteina male molekulske mase upotrebom dijalize, a pre hlađenja. Cilj je bio da se ustanovi da li ovaj metod može da poboljša kvalitet sperme nerastova, posle čuvanja u tečnom medijumu. Rezultati su pokazali da nema razlike između semena koje je podvrgnuto dijalizi i kontrolnog uzorka semena (bez dijalize), a posle čuvanja u tečnom medijumu ($P > 0,05$). Istovremeno, ustanovljeno je da je vijabilnost semena čuvanog u tečnom medijumu, bila smanjena u poređenju sa svežim semenom ($P > 0,001$). Sperma koja je podvrgnuta dijalizi, imala je bolji efekat na održavanje motiliteta spermatozoida ($P = 0,046$) kao i još značajniji i veći uticaj na održavanje progresivnog motiliteta ($P = 0,029$) kao i na veći procenat morfološki normalnih spermatozoida ($P < 0,001$), a u poređenju sa kontrolnom spermom, koja nije podvrgnuta dijalizi. Veći nivo spermatozoida koji nisu prošli kapacitaciju kao i niži nivo akrozomalno reaktivnih spermatozoida u dijalizovanoj spermi u poređenju sa ne-dijalizovanim uzorcima sperme, ukazuje na to da dijaliza smanjuje kapacitaciju koja je uslovljena procedurom hlađenja sperme ($P = 0,006$ odnosno $P = 0,005$) (Mrkun i sar., 2009).

Sperma i oksidativni stres

Na osnovu rezultata prethodne studije (Mrkun i sar., 2009), moglo je da se zaključi da uklanjanje proteina male molekulske mase iz semene plazme značajno poboljšava karakteristike semena čuvanog u tečnom medijumu. Međutim, uklanjanje antioksidansa male molekulske mase iz semene plazme može da utiče na ukupni antioksidativni status i anti-peroksidaznu aktivnost semene plazme. Iz

tog smo razloga obavili ispitivanja efekta dijalize na spermu odnosno na ukupni antioksidacioni kapacitet (TAC), SOD aktivnost i status lipidne peroksidacije u semenoj plazmi, a pre hlađenja i čuvanja u tečnom medijumu.

Uklanjanje proteina male molekulske mase iz semene plazme putem dijalize kao rezultat je imalo značajno manje koncentracije superoksid dismutaze u ovako tretiranom uzorku u poređenju sa kontrolnim uzorkom (ne-dijalizovanim uzorkom) ($P < 0,05$). Dijaliza je uslovlila značajno smanjenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) ($P < 0,05$) kao i povećanje koncentracije lipidne peroksidacije ($P < 0,05$). Ovi su rezultati u skladu sa hipotezom koju smo postavili da uklanjanje antioksidanasa male molekulske mase iz semene plazme, putem dijalize poboljšava kvalitet semena, a posle čuvanja tri dana u tečnom medijumu, na temperaturi od 15 do 17 °C. Međutim, ovaj metod je istovremeno smanjivao ukupni anti-oksidacioni kapacitet čuvanog semena nerastova u tečnom medijumu uz povećanje peroksidacije lipida (Zakošek Pipan i sar., 2014).

Funkcije antioksidacionih sistema u semenu nerastova

Spermatozoidi nerastova se karakterišu visokim nivoom osetljivosti na peroksidaciju lipida (Cerolini i sar., 2000). Dobro je poznato da je struktura i hemijski sastav spermatozoida nerastova jedinstvena kao i da sadrže veliku proporciju polizasićenih masnih kiselina (PUFAs) u fosfolipidnoj frakciji membrana (Cerolini i sar., 2000; Surai, 2006). Ove osobine ovih visoko specijalizovanih ćelija su posledica specifičnih potreba njihovih membrana u smislu visokih nivoa fluidnosti i fleksibilnosti, a koje su neophodne za motilitet i fuziju spermatozoida sa jajnom ćelijom. Međutim, ova je funkcionalna prednost povezana sa nedostacima u smislu prijemčivosti spermatozoida na peroksidaciju masti. Poznato je da se oksidativni stres pojavljuje kada postoji disbalans između reaktivnih oksidativnih molekula (ROS) i anti-oksidanasa koji uklanjaju suvišak slobodnih radikala. ROS su prirodni proizvodi ćelijskog metabolizma koji su, u fiziološkim granicama, neophodni da bi spermatozoidi obavili procese (kapacitacija, hiperaktivirana mobilnost i reakcija akrozoma) koji su vezani za spermu, a da bi se uspešno oplodjenje (Agarwal i sar., 2004). Međutim, prevelika koncentracija ROS, može da ima negativan efekat na spermatozoide, a kao posledica dva principa: ROS mogu da oštete membranu spermatozoida ili da dovedu do oštećenja DNK molekula što vodi manjem motilitetu spermatozoida (Bennetts i sar., 2005), kao i njihovoj slabijoj sposobnosti da oplode oocite. Prevelika koncentracija ROS je povezana sa negativnim efektima i promenama u koncentraciji spermatozoida, motilitetom i morfoloijom. Isto tako, fragmentacija molekula DNK može da ima negativne efekte na potencijalnu genetiku osnovu embriona. Međutim, ejakulat ipak poseduje različite zaštitne mehanizme koji su zaduženi za zaštitu spermatozoida od oksidativnog stresa (Strzezek i sar., 2000). Sami spermatozoidi poseduju pre svega anti-oksidacione enzime kao što su to superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GP) (Strzezek, 2002).

Ejakulat nerastova sadrži velike količine superoksid dismutaze koja štiti spermatozoide od peroksidacije lipida (Kowalowka i sar., 2008) tako što katalizuje dismutaciju superoksidnih anjona u vodonik peroksid (H_2O_2) i kiseonik (Strzezek i sar., 2002). Sa druge strane, sperma nerastova poseduje izuzetno male količine katalaze, koja pretvara H_2O_2 u vodu i kiseonik (Kowalowka i sar., 2008). Iz tog razloga, sperma nerastova poseduje povećane količine H_2O_2 (Kowalowka i sar., 2008), pa je verovatno da su zajedno vodonik peroksid i velika permeabilnost membrane (Halliwell i Gutteridge, 1999), odgovorni za većinu oštećenja ćelijske strukture i funkcionisanja spermatozoida nerastova (Kim i sar., 2011). Pored anti-oksidativnih enzima, semena plazma nerastova takođe sadrži antioksidanse male molekulske mase kao što su to L-glutation (GSH), L-ergotionein (ERT), alfa-tokoferol i ostale (Ishii i sar., 2005). Ovi molekuli štite od reaktivnih oksidativnih molekula i mogu da uspostave balans u situacijama kada postoje male količine anti-oksidacione katalaze. Specifičnije, vitamin E (alfa-tokoferol) može da pocepa kovalentne veze koje je ROS formirao između bočnih lanaca masnih kiselina membrane spermatozoida i jedan je od bitnih mehanizama zaštite membrane od ROS-a i peroksidacije lipida. Korišćenje E vitaminskih dodataka hranivu za svinje, pokazalo je da se u tom slučaju povećava zapremina ejakulata nerastova kao i koncentracija spermatozoida. Dodavanje vitamina E u rastvor u kome se čuva sperma nerastova, povećava otpornost spermatozoida na peroksidaciju lipida (Cerolini i sar., 2000) uz poboljšavanje kvaliteta spermatozoida koji su bili zamrznuti (Pena i sar., 2004). Dodavanja alfa-

tokoferola hranivu za svinje u koncentraciji od 200 μ M, štiti spermatozoide od preteranog stvaranja ROS, smanjivanjem peroksidacije lipida i snižavanjem ekspresije gena apoptoze (Jeong i sar. 2009).

U prethodnoj studiji (Zakošek Pipan i sar., 2014), ustanovljeno je da uklanjanje antioksidanasa male molekulske mase iz semene plazme može da doprinese oksidativnim stresu, a kao posledica činjenice da neki od uklonjenih molekula poseduje antioksidativne osobine. Otuda, obavili smo evaluaciju efekta uklanjanja komponenti malih molekulske mase iz semene plazme uz istovremeno dodavanje alfa-tokoferola, a u odnosu na kvalitet semena nerastova posle čuvanja u periodu vremena od 72 časa, u tečnom medijumu.

Kao rezultat, ustanovljeno je da ova, poboljšana procedura može da održi peroksidaciju lipida, aktivnost mitohondrija i fragmentaciju molekula DNK na istom nivou kao i kod nativnih uzoraka sperme ($P>0.05$). Dijaliza sperme i dodavanje alfa-tokoferola, uslovalo je veći progresivni motilitet, veću proporciju morfološki normalnih spermatozoida i značajno manji stepen akrozom-reagujućih spermatozoida u poređenju sa ne-dijalizovanim uzorcima sperme, posle čuvanja 72 sata, u tečnom medijumu ($P>0.05$). Pored bolje očuvanosti dijalizovane sperme kojoj je dodat alfa-tokoferol, smanjenje oksidativnog stresa je uočena kod semena koje je konzervisano sa ovom, poboljšanom procedurom (Zakošek Pipan i sar., 2017).

Literatura

1. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79:829–843.
2. Agarwal A, Allamaneni SS, Said TM. Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species. *Reprod Biomed* 2004, Online 9: 466–468.
3. Alm K, Taponen J, Dahlbom M, Tuunainen E, Koskinen E, Andersson M. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. *Theriogenology* 2001, 56: 677–684.
4. Assreuy AM, Alencar NM, Cavada BS, Rocha-Filho DR, Feitosa RF, Cunha FQ, Calvete JJ, Ribeiro RA. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. *Biol Reprod* 2003, 68: 1836–1841.
5. Bennetts LE, Aitken RJ. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2005, 71: 77–87.
6. Cerolini S, Maldjian A, Surai PF, Noble RC. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci* 2000, 58: 99–111.
7. Cigankova V, Mesáros P, Bires J, Ledecy v, Ciganek J, Tomajkova E. Morphological structure of the testes in stallion at zinc deficiency. *Slo Vet J* 1998; 23:97–100.
8. Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay SK. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl* 2000; 21:53–7.
9. Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Slotter E, Block G, Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 2005;20:1006–12.
10. Ferguson LR, Karunasinghe N, Zhu S, Wang AH. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 2012; 733: 100–10.
11. Gadea J and Matas C. Sperm factors related to *in vitro* penetration of porcine oocytes. *Theriogenology* 2000, 54: 1343–1357.
12. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev* 1994, 52:253–265.
13. Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. Oxford University Press 1999, Oxford, UK.
14. Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, et al. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1 knockout mice under heat stress. *Free Radic Res* 2005; 39: 697–705.
15. Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Kumar BM, Balasubramanian S, Rho GJ. Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiol* 2009; 58(2):181–9. doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.12.004. Epub 2008 Dec 25.
16. Kim S, Lee YJ, Kim YJ. Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 °C. *Anim Reprod Sci* 2011; 124: 118–24.
17. Kowalowka M, Wysocki P, Fraser L, Strzezek J. Extracellular superoxid dismutase of boar seminal plasma. *Reprod Dom Anim* 2008, 43: 490–6.
18. Massnyi P, Trandzik J, Nad P, Toman R, Skalick M, Kornekov B. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asian J Androl* 2003, 5: 101–4.
19. Mrkun J, Potočnik K, Kosec M, Zrimšek P. Improvement of biotechnological process for conservation of liquid-stored boar semen using dialysis prior to cooling. *Acta. Vet. Bulgaria* 2009, 62: 849–54.
20. Mrkun J, Kosec M, Zrimšek P. Value of semen parameters, with special reference to TNF - alfa in predicting the quality of boar semen after short - term storage. *Acta veterinaria Hungarica*

2013, 61(2): 209-219. **21.**Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA, Pang MG. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related to litter size of sows. *Anim Reprod Sci* 2007, 121: 131-138. **22.**Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 2007, 134: 3-17. **23.**Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 2005, 322: 43-52. **24.**Rodríguez-Martínez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest Anim* 2003, 38: 312-318. **25.**Rodríguez A, Rijsselaere T, Beek J, Vyt P, Van Soom A, Maes D. Boar seminal plasma components and their relation with semen quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2013, 59: 5-12. **26.**Srtzezek J, Fraser L, Demianowicz W, Kordan W, Wysocki P, Holody D. Effect of depletion tests (DT) on the composition of boar semen. *Theriogenology* 2000, 54: 949-63. **27.**Strzezek J, Saiz-Cidoncha F, Wysocki P, Tyszkiewicz A, Jastrzebski M. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. *Anim Sci Pap Rep* 2002, 20:255-66. **28.**Surai PF. *Selenium in Nutrition and Health*. Nottingham University Press 2006, Nottingham, UK. **29.**Taylor U, Zerbe H, Seyfert HM, Rath D, Baulain U, Langner KF, Schubert HJ. Porcine spermatozoa inhibit post-breeding cytokine induction in uterine epithelial cells *in vivo*. *Anim Reprod Sci* 2009, 115: 279-289. **30.**Turba ME, Fantinati P, Bernardini C, Gentilini F, Bacci ML, Forni M. Relationship between innovative and traditional parameters to investigate semen quality in pigs. *Anim Reprod Sci* 2007, 99: 72-81. **31.**Zakošek Pipan M, Mrkun J, Kosec M, Nemeč Svete A, Zrimšek P. Superoxide dismutase: a predicting factor for boar semen characteristics for short-term preservation. *BioMed research international*, ISSN 2314-6141, 2014, 2014: 1-7. **32.**Zakošek Pipan M, Mrkun J, Nemeč Svete A, Zrimšek P. Improvement of liquid stored boar semen quality by removing low molecular weight proteins and supplementation with [alpha]-tocopherol. *Animal reproduction science*, ISSN 0378-4320. [Print ed.], 2017, 18: 52-61. **33.**Zakošek Pipan M, Mrkun J, Jakovac Strajn B, Pavšič Vrtač K, Kos J, Pišlar A, Zrimšek P. The influence of macro- and microelements in seminal plasma on diluted boar sperm quality. *Acta Vet Scandinavica* 2017, 11 (59): 1-9. **34.**Zrimšek P, Kunc J, Kosec M, Mrkun J. Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality. *Inter J Androl* 2004, 27 (1): 57-62. **35.**Zrimšek P, Kosec M, Kunc J, Mrkun J. Determination of the diagnostic value of the resazurin reduction assay for evaluating boar semen by receiver operating characteristic analysis. *Asian J Androl* 2006, 8 (3): 343-348.

БИОЛОШКИ ЕФЕКТИ ТАНИНА У ОРГАНИЗМУ ПРЕЖИВАРА

BIOLOGICAL EFFECTS OF TANNINS IN RUMINANTS

Радиша Продановић, Иван Вујанац, Сретен Недић, Љубомир Јовановић, Данијела Кировски

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Кратак садржај

Ограничењем употребе антибиотика у Европској унији у храни за преживаре 2006. године добијају на значају алтернативни суплементи у исхрани ових врста животиња. Директивом Европске уније из 2003. године отворена је могућност коришћења екстракта биљака и њихових секундарних метаболита (танини, есенцијална уља, сапонини, флавоноиди и други) као природних додатака у исхрани који би требало да побољшају продуктивност и истовремено смање неповољан утицај сточарске производње на загађање природног окружења. Посебну пажњу стручњака из области исхране преживара завредила је употреба танина као биолошки активних састојака многих биљака које се најчешће не користе у интензивним условима исхране ових животиња. Опште је прихваћено да танини могу да имају како позитиван тако и негативан ефекат пре свега на процесе варења хране у организму преживара. Танини смањују унос и сварљивост хранљивих материја, а негативно утичу и на биланс микроелемената. Позитивни ефекти танина огледају се у ефикаснијем коришћењу протеинског азота, смањењу емисије метана и антиоксидативном ефекту. Утицај препарата на бази танина на производне резултате и параметре плодности није конзистентан и у извесном смислу су противуречни. Наведени ефекти танина су у сваком случају условљени типом и количином конзумираних танина, њиховом хемијском структуром и молекуларном тежином, адаптираношћу и физиолошким стањем животиње. С обзиром да нам већина наведених својстава комерцијалних танина најчешће нису доступна, у овом раду приликом изношења литературних података ограничићемо се само на опште биолошке ефекте танина у организму преживара.

Кључне речи: танин, преживари, биолошки ефекти

Увод

Ограничењем употребе антибиотика у Европској унији као додатака у храни за преживаре из 2006. године подстакло је стручну јавност на размишљање о алтернативним суплементима у исхрани ових врста животиња који имају способност контролisaња микробне популације у бурагу, а све у циљу оптимизације процеса варења хранљивих састојака у преджелуцима. Пред нутриционисте постављен је задатак проналажења нових нутритивних компоненти које могу позитивно утицати на искористивост хранљивих материја и последично побољшати продуктивност животиња, као и проналажења активних механизма за превенирање њихових потенцијално штетних ефеката. Директивом Европске уније из 2003. године отворена је могућност коришћења екстракта биљака и њихових секундарних метаболита (танини, есенцијална уља, сапонини, флавоноиди и други) као природних додатака у исхрани који би требало да побољшају продуктивност и истовремено смање неповољан утицај сточарске производње на загађање природног окружења. У том погледу, посебну пажњу стручњака из области исхране преживара завредила је употреба танина као биолошки активних састојака многих биљака које се не користе у интензивним условима исхране ових животиња. Опште је прихваћено да танини могу да имају како позитиван тако и негативан ефекат пре свега на процесе варења хране у организму преживара. То је у сваком случају условљено типом и количином конзумираних танина, њиховом хемијском структуром и молекуларном тежином, структуром

оброка, али и врстом и физиолошким стањем животиње. С обзиром да нам већина наведених својстава комерцијалних танина, као ни евентуално присуство других биолошки активних састојака у њима, најчешће нису доступна, у овом раду, приликом изношења литературних података, ограничићемо се само на опште биолошке ефекте, две главне групе танина, хидролизабилних и кондензованих, у организму преживара.

Танини као биолошки активна једињења

Појам танин потиче од старонемачке речи *tanne* за хрст и означавао је коришћење танина из дрвета хрста за штављење животињског крзна и коже. Танини су природна полифенолна једињења великих молекулских маса чија је главна карактеристика везивање и преципитација протеина из воденог раствора. С обзиром да и нека друга фенолна једињења (пирогалол и резорцинол) могу поседовати наведена својства, под појмом танин најчешће се подразумевају полифенолна једињења која поседују одређени број хидроксилних и карбоксилних група способних да под одређеним условима дају јаке комплексе са различитим макромолекулима (протеини, скроб, целулоза и минерали). Данас се сматра да молекули танина морају да имају 12-16 фенолних група и 5-7 ароматичних прстенова на 1000 јединица молекулске масе да би задовољили главне критеријуме дефиниције танина, а то су: олигомерна једињења различитих хемијских структура која поседују слободне фенолне групе, молекулске тежине од 500 до > 20000 Да, растворљива у води и способна да вежу протеине у растворљиве и нерастворљиве комплексе.

Танини представљају природне производе секундарног метаболизма биљака који се могу наћи у скоро свим њеним деловима – лишћу, семенима, корењу, изданцима и стабљикама, где углавном имају улогу у заштити биљака од микробних патогена, инсеката, пестицида и хербивора. Просечан садржај танина у деловима биљака као што су плодови и листови креће се од 2 до 5 постосирове масе биљке, с тим да у неповољним (патолошким) условима рапидно се повећава садржај танина у биљкама. Танини су широко распрострањени у биљном свету, и то не само међу биљним врстама тропских и суптропских подручја, него и многим другим климатским подручјима. Биљне врсте са највећим садржајем танина припадају породицама *Betulaceae* (*Betula*), *Cesalpiniaceae* (*Ceratonia*), *Cistaceae* (*Cistus*), *Cupressaceae* (*Juniperus*), *Ericaceae* (*Calluna*, *Erica*, *Vaccinium*), *Fagaceae* (*Castanea*, *Quercus*), *Leguminosae* (*Cytisus*, *Genista*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*), *Poaceae* (*Holcus*, *Hordeum*, *Lolium*, *Sorghum*, *Triticum*), *Rosaceae* (*Crataegus*, *Rosa*, *Rubus*) и *Salicaceae* (*Salix*) (Shewangzaw, 2016; Шефер и сар., 2017). Код породице хрстова, *Fagaceae*, 73% свих врста које су тестиране садржале су танине.

Хидролизабилни и кондензовани танини

Према физичкој и хемијској структури танини се деле на две групе. Опште је прихваћена подела танина на хидролизабилне и кондензоване танине. Хидролизабилни танини се налазе искључиво у дикотиледоним биљкама, док су кондензовани присутни и у скривеносеменицама и у голосеменицама. Како наводи Waghorn (2008), биљке могу да садрже обе врсте танина истовремено.

Хидролизоване танине (ХТ) садрже молекул Д-глукозе као централно језгро чије хидроксилне групе су делимично или потпуно естерификоване разним фенолним групама као што су галинска киселина (галотанини) и елагинска киселина (елагитанини). Сматра се да је потребно да молекул има најмање 3 естерификоване групе Д-глукозе да би испољио особине које би га сврстале у групу танина. Неки аутори су склонили даљој подели ХТ на тарагалотанине (галинска и хининска киселина као језгра) и кофеинтанине (хининска и кофеинска киселина као језгра). За разлику од кондензованих танина, хидролизабилни танини су растворљивији у води (благим киселинама и базама), имају мању молекулску масу (2000 до 5000 Да) и знатно су подложнији ензимским и неензимским процесима разградње. Хидролизоване танине обично су присутне у малим количинама у биљкама. Нарочито их има у хрсту, кестену, багрему, еукалиптусу и листовима разног дрвећа где могу бити заступљени у количини од 200 г/кг, а у појединим врстама чак и до 500 г/кг суве материје.

Кондензоване танине су распрострањенија група танина. Они су олигомери или полимери флавоноидних јединица повезаних угљениковим везама у 4/6 или 4/8 позицијама. Због

своје кондензоване хемијске структуре, као и угљеникових веза, знатно су мање подложни разградњи, поготово хидролизи. Аутори су сагласни да је коректнији назив за кондензоване танине проантоцијаниди (ПА) јер су им синтетички прекурсори леукоцијаниди, а такође ПА у киселој средини подлежу оксидативној разградњи дајућу антоцијанидне пигменте (цијанидин и делфидин). Ови пигменти су одговорни за различите боје делова биљака и вина који у себи садрже танине као и за опор укус воћа и вина. Захваљујући сложеној и/или варијабилној хемијској структури као и различитим степенима полимеризације мономерних јединица, ПА могу или не морају да буду растворљиви у води и органским растварачима. Молекулска тежина ПА се креће у распону од 1000 до 20000 Да.

Хидролизабилни и кондензовани танини се разликују према биолошким ефектима до којих доводе у организму преживара. Поред неких других разлика, хидролизабилни танини имају јачу способност везивања и преципитације молекула, док кондензовани танини испољавају јачи ефекат на смањење сварљивости хранљивих материја. Генерално се токсичност препарата на бази танина везује за хидролизабилне танине, иако и кондензовани танини под одговарајућим условима могу да испоље токсичне ефекте. Имајући у виду напред наведено, разноликост у физичкој и хемијској структури појединих врста танини је вероватно главни разлог велике разноврсности биолошких ефеката који могу да се испоље као последица њиховог деловања.

Антинутритивни и токсични ефекти танина

Танини су дуго времена сматрани искључиво за антинутритивна и/или токсична једињења јер су првобитно запажени њихови негативни ефекти у исхрани преживара у виду смањења уноса, сварљивости и апсорпције протеина, полисахарида и минерала. Такође запажено је да унос већих количина танина може довести до иритације, десквamacије и улцерације црвене слузокоже, лезија на јетри и бубрезима, а у екстремним условима и до угинућа животиња.

Нарочито значајно поље када су у питању нутритивна својства додатака у исхрани преживара огледа се у њиховом утицају на количину конзумиране хране. Мора се истаћи да резултати у погледу утицаја препарата на бази танина на апетит преживара нису конзистентни и у извесном смислу су противуречни. Генерално се сматра да танини смањују унос хранљивих материја из оброка путем смањења палатабилности, успоравања процеса варења и неповољних постпрандијалних ефеката. Доказано је да се конзумација хране значајно смањује када је укупна количина кондензованих танина већа од 50 г/кг суве материје оброка. У једној другој студији спроведеној на кравима у фази касне лактације уочен је позитиван ефекат танина на апетит крава које су конзумирале оброк са више кабастих хранива. У сваком случају, може се сматрати да утицај танина на апетит преживара зависи од врсте и/или брзине адаптације животиња, њиховог физиолошког стања, као и од типа и дозе примењеног танина. Ништа мањи значај нема ни структура оброка, што може дати објашњења на запажања Donelli and Anthoni (1969) који наводе да су животиње на паши чији је садржај танина износио око 20 мг/кг суве материје испољиле значајно смањење уноса хране.

Осим формирања мање сварљивих комплекса са протеинима пореклом из унете хране, танини могу везати и инхибирати ендogene протеине попут дигестивних ензима. Поред описаног дејства, они такође остварују ефекте на угљене хидрате, нарочито хемицелулозу, целулозу, скроб и пектине. Негативан ефекат танина на деградацију влакана описује се као секундарни антинутритиви ефекат.

Токсичност танина је повезана са њиховом молекулском тежином и/или растворљивости у воденој средини. Стога је и разумљиво што постоји више литературних података о токсичним ефектима хидролизабилних у односу на кондензоване танине јер је већи и ризик за њихов настајање. У бугагу хидролизабилни танини подлежу процесу ензимске деполимеризације када настаје галинска киселина која се даље метаболише до пирогалола и резорцинола, који се потом апсорбују у крвоток и доводе до многобројних целуларних оштећења. Количина хидролизабилних танина изнад 20% суве материје оброка се сматра изузетно токсичном за овце и говеда. Најчешће лезије које се у литератури приписују токсичном деловању хидролизабилних танина су катарално-хеморагичнозапаљење црева, некрозе јетре и проксималних тубула бубрега. Опште прихваћена стратегија исхране да се минимизирају токсични ефекти хидролизабилних танина јесте да се исти

примењују у ниским до средњим дозама. Већи број студија је документовано да коришћењем хидролизабилних танина у исхрани преживара у количинама мањим од 20 г/кг СМ оброка не доводи до испољавања нити једног штетног ефекта по организам преживара. Кондензовани, танини са већом молекулском тежином, се у нормалним околностима не могу апсорбовати у крвоток и испољити штетне ефекте. Да би кондензовани танини испољили токсичан утицај на органима неопходно је да слузокожа дигестивног тракта буде оштећена како би исти могли да продру у крвоток. Стога се сматра да се негативан утицај кондензованих танина пре свега огледа у смањењу уноса и сварљивости протеина и угљених хидрата хране, и/или инхибицијом ензима дигестивног тракта.

Ефекти танина на сварљивост хранљивих материја

Танини утичу на сварљивост различитих хранљивих материја укључујући протеине, полисахариде и минералне материје. Ипак, фенолне и хидроксилне групе танина примарно стварају комплексе са протеинима, мада овај ефекат такође могу у различитом степену испољити и према нуклеинским киселинама, полисахаридима и металним јонима (Kumar и Singh, 1984). Наведени комплекси могу бити реверзибилне и иререверзибилне природе у зависности од типа веза које се формирају. Повезивањем нековалентним везама (водоничне, хидрофобне и ван дер Валсове) настају реверзибилни комплекси, док су комплекси повезани ковалентним везама углавном иререверзибилни. При томе, тип интеракције између танина и протеина зависи од њиховог релативног односа, структуре танина (молекулске тежине, конформације, флексибилности и растворљивости у воденим растворима), структуре протеина (величине, конформације и аминокиселинског састава), као и приоде средине у којој се интеракција одвија (температура, рН и др.).

Један од најранијех примећених и најбоље изучених ефеката танина у исхрани преживара јесте њихова способност да побољшавају сварљивост и коришћење протеина хране. Доказано је да танини када су у храни присутни у оптималним количинама, повећавају степен искоришћавања протеина код преживара тако што у условима више рН средине бурага (рН 5,5 до 7,0) везују протеине хране и на тај начин смањују њихову разградњу од стране микрофлоре бурага. Танин-протеин комплекс се потом раздваја у киселој рН средини сиршта (рН 2,5 до 3,5), а у алкалној средини танких црева (рН < 7,5) протеини се разграђују и ресорбују. У прилог томе су и истраживања која су показала да хидролизоване танине смањују не само иницијалну растворљивост разградивих протеина у бурагу већ и брзину њихове разградње, повећавајући на тај начин укупни прилив неразградивих протеина у танка црева без штетних последица на процесе варења хране. Смањење деградације разградивих протеина има за последицу нижи ниво накупљања амонијака (N-NH₃) у садржају бурага. То има за резултат смањен прилив амонијака у јетру, и нижу концентрацију уреје у крви животиња. Другим речима, смањује се степен елиминације вишка азота путем урина (уреа), а повећава његова елиминација преко фецеса. Са становишта животне средине овај помак елиминације вишка азота из организма урином ка елиминацији путем фецеса је веома значајан, јер се уреа из урина разлаже до амонијака и азот оксида који се сматрају еколошким загађивачима земљишта, док се азот у фецесу животиња сматра корисним органским ђубривом.

Главни ефекат танина на сварљивост протеина базира се на њиховој способности да формирају водоничне везе које су стабилне при рН између 3,5 и 8. Ови стабилни комплекси раскидају се при рН вредности испод 3,5 (као на пример у абомазусу, рН 2,5-3) или изнад 8 (на пример у дуоденуму, рН 8), чиме се остварује јасан, користан "bypass ефекат". Међутим, наведени комплекс не мора обавезно и бити сварен у нижим партијама, док са друге стране, уколико је садржај танина у храни сувише висок укупна доступност протеина (укључујући и варење у нижим партијама) биће смањена са свим негативним последицама на производне показатеље животиње. Очигледно је да је модификација сварљивости повезана са променама процеса ферментације унутар бурага, заједно са променама варења у цревима где танини могу интерреаговати са епителом и/или цревним ензимима. Иако је један од најјаснијих доказа смањене сварљивости хране при уносу танина повећање фекалног излучивања азота, важно је узети у обзир да након уноса танина долази и до повећане секреције ендогених протеина као што су саливаторни

гликопротеини, слуз, дигестивни ензими и повећана десквамација ћелија црева (Waghorn, 1996). С тога повећање фекалног азота може бити и последица повећања метаболичког фекалног азота, тј. азота ендогеног порекла који не рефлектује смањење количине протеина који се апсорбују из хране. Општи закључак аутора је да само унос кондензованих испод 50 г/кг СМ оброка (10 - 40 г/кг) код преживара побољшава искористивост хране, превасходно због смањене деградација протеина и последично веће доступности (углавном есенцијалних) аминокиселина за апсорпцију у танком цреву (Shewangzaw, 2016).

Запажено је да се упоредо са повећањем концентрације танина у исхрани преживара, у бурагу смањује производња испарљивих масних киселина (ВФА), садржај микробне ДНК и РНА. Негативан утицај танина на сварљивост сирових кабастих влакана заснива се на директној интеракцији танина са целулозом, смањењу ензимске и микробне разградње и/или директним инхибиторним утицајем на активност целулаза и бројност целулолитичких бактерија. Поред наведеног, поједини аутори сматрају да се смањење доступности азота у бурагу неповољно одражава и на сварљивост целулозних влакана. Јауанегага и сарадници (2015) су у *in vivo* студији документовали способност хидролизабилних и кондензованих танина да регулишу бројност и активност целулолитичке популације бактерија бурага (*F. Succinogenes* и *Ruminococcus* spp). Такође, доказано је да кондензовани танини лакше инхибирају активност хемичелулазе у односу на целулазу (Waghorn, 1996), вероватно због чињенице да је целулаза повезана са бактеријским ћелијским зидом, док је хемичелулаза екстрацелуларно и због тога је и осетљивија.

Танини су такође хелатни агенси, и могу смањити доступност одређених металних јона неопходних за метаболизам микроорганизама бурага. Sadanandan и Агоа (1975) показали су да високе количине танина негативно утичу на искоришћавање фосфора од стране присутне микрофлоре. Танини могу смањити сварљивост ћелијског зида (биљне ћелије) везивањем за бактеријске ензиме и/или формирањем неразградивих комплекса са угљеним хидратима ћелијског зида. У погледу инхибиције ензима, танини могу реаговати са микробним (и бактеријским и гљивичним) ензимима, инхибирајући њихову активност. Поједини аутори указују на то да танини мењају активност бактеријских протеолитичких, целулолитичких и других ензима, али њихово везивање за ензиме - било да су бактеријски или ендогени - не подразумева обавезно и њихову инхибицију (Макар и сар., 1988). Коначно, танини могу остварити директан утицај на микрофлору бурага, променом пропустљивости мембране бактеријске ћелије. Поједине бактерије бурага могу толерисати присуство танина (*S. gallolyticus*) или реаговати променом морфологије и синтезом гликокаликса са циљем неутрализације штетних ефеката (Frutos и сар., 2004).

Корисни биолошки ефекти танина

Данас је опште прихваћено да у исхрани преживара, природни и комерцијални танини, могу поред штетних, остварити и корисне биолошке ефекте. То је у сваком случају условљено типом и количином конзумираних танина, њиховом хемијском структуром и молекуларном тежином, структуром оброка, али и врстом и физиолошким стањем животиње. Најважнију функционалну карактеристику танина представља способност везивања и преципитације протеина, што чини основ њихове биолошке функције (Hagerman и Butler, 1991). Наведени комплекси, чије стварање фаворизује рН садржаја бурага, формирају се путем водоничних, јонских и ковалентних веза, као и хидрофобним интеракцијама између ароматичног прстена фенолне компоненте и хидрофобног дела протеина. Како наводе Јауанегага и сар. (2015), афинитет хидролизабилних танина за молекуле протеина је знатно виши у односу на кондензоване танине (посебно према пролину). Генерално, смањена разградња протеина резултира нижом производњом амонијачног азота и већим приливом неамонијачног азота у дуоденум (Shewangzaw, 2016). Резултати испитивања многобројних студија на кравама показали су да су код животиња које су кроз храну добијале препарате на бази танина установљене значајно ниже концентрација урее у крви у односу на краве контролне групе (Frutos и сар., 2004; Liu и сар., 2013; Guerre и сар., 2016). На основу виших уремија аутори су закључили да краве које нису добијале препарате на бази танина имају релативни суфицит протеина у односу на садржај енергије у оброку. Имајући у виду да је група крава која је храњена уз додаток препарата на бази танина имала значајно више концентрација глукозе, а ниже урее, може се извести закључак да код ове групе крава постоје

ефикасније коришћење како разградивог, тако и неразградивог протеина у бурагу при истом нивоу снабдевености енергијом, као и боље снабдевање организма крава гликогеностатичним прекурсорима. Управо ови резултати потврђују гледиште многих аутора да је смањена разградња протеина у бурагу најзначајнији корисни ефекат танина код преживара.

Поред наведеног, данас се све више истиче улога танини у смањењу емисије метана из организма преживара. Поред метана (CH₄), угљен диоксид (CO₂) и азот субоксид (N₂O) су веома битни гасови који доводе до ефекта стаклене баште (ГХГ) у атмосфери, а чија концентрација је значајно порасла нарочито током прошлог века (Monteny и сар., 2006). Акумулација ових гасова подиже температуру земље и доприноси глобалном загревању (Rosenzweig и сар., 2008). Пољопривредни сектор је један од главних извора гасова стаклене баште са учешћем од око 0.2 - 0.35% у глобалној емисији. Приближно 0,7% емисије метана потиче из антропогених извора за чије две трећине је одговорна пољопривредна активност. Процењује се да процеси варења хране у дигестивном тракту преживара утичу између једне четвртине и једне петине антропогене емисије метана (Beauchemin и сар., 2008). Важно је нагласити да производња метана у бурагу представља не само еколошки, већ и веома битан економски проблем. Као што је познато, метан настао у процесима ферментације у бурагу је једињење богато енергијом и представља губитак од 5 до 8 посто од бруто енергетског уноса (Lopez и Newbol, 2007). Смањење производње CH₄ као последица примене препарата на бази танини се приписује њиховим директним утицајем на раст и/или активност метаногених бактерија и/или бактерија које производе водоник. Овај ефекат је више својствен хидролизабилним танинима док се за кондензоване танине верује да је овај ефекат доминантно последица смањене дигестије сирових влакана у бурагу (Tavendale и сар., 2005; Goel и Makkar, 2012; Jayanegara и сар., 2012). Као најбоља потврда свега овога могу да послуже резултати метаанализа *in vivo* експеримента Jayanegara и сар. (2015) који су показали блиску везу између концентрације танина у храни (ПА и ХТ) и производње CH₄ по јединици сварљиве органске материје.

Скорија истраживања у области исхране преживаре имала су за циљ да се утврди утицај додавања танина на метаболизам липида и евентуални бенефити њиховог додавања на липидни профил производа који се користе у исхрани људи. Научна основа за ова истраживања били су резултати Liu и сарадника (2013) који су доказали антиоксидативна својства пре свега хидролизабилних танина и њихов позитиван утицај на антиоксидативни статус високомлечних крава. Као резултат одређеног броја истраживања добијено је да примена препарата на бази танина може да побољша присуство пожељних масних киселина у месу и млеку и антиоксидативну стабилност меса током складиштења.

Захвалница

Рад је подржан средствима пројекта ИИИ 46002 из програма интегрисаних и интердисциплинарних истраживања финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Литература:

1. Allison, M. J., Littledike E. T., James, L. F., 1977, Changes in ruminal oxalate degradation rates associated with adaptation of oxalate ingestion. *Journal of Animal Science* 45, 1173–1179.
2. Benjamin, D.N., 2006, Effects of fertilizer application and cutting interval on nitrate accumulation in bermudagrass, M.Sc.(Agri.), Thesis: Univ.Tennessee, Martin.
3. Blaney, B., Gartner, R., and Head, T., 1982, The effects of oxalate in tropical grasses on calcium, phosphorus and magnesium availability to cattle, *The Journal of Agricultural Science*, 99(3), 533-539.
4. Coley, P.D., 1986, Costs and benefits of defense by tannins in a neotropical tree. *Oecologia* 70: 238–241.
5. Dawson, K.A., Allison, M.J., and Hartman, P.A., 1980, Isolation and Some Characteristics of Anaerobic Oxalate-Degrading Bacteria from the Rumen, *Applied and environmental microbiology*, p. 833-839, Vol. 40, No. 4.
6. El-Khodery, S., El-Boshy, M., Gaafar, K., Elmashad, A., 2008, Hypocalcaemia in Ossimi sheep associated with feeding on beet tops (*Beta vulgaris*), *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 32, 199–205.
7. Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J. and Mantecón, A.R., 2004, Review. Tannins and ruminant nutrition, *Spanish Journal of Agricultural Research* 2 (2), 191-202.
8. Guerre M., Capozzolo M., Lencioni P. And Wattiaux

M., 2016, Effect of quebracho-chestnut tannin extracts at 2 dietary crude protein levels on performance, rumen fermentation, and nitrogen partitioning in dairy cows. *J Dairy Sci.* 99:4476-4486. **9.**Hagerman, A.E., Butler, L.G., 1991, Tannins and lignins. In: *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*, Vol I: The chemical participants, (Rosenthal G.A. and Berenbaum M.R., eds.), Academic Press, NY (USA), pp. 355-388. **10.**Liu H., Zhou D. and Li K. (2013). Effects of chestnut tannins on performance and antioxidative status of transition dairy cows. *J Dairy Sci.* 96:5901-5907. **11.**Kumar, R., and Sing, M., 1984, Tannins: Their Adverse Role in Ruminant Nutrition, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 32, No. 3. **12.**Launchbaugh, K., 2001, Risk management to reduce livestock losses from toxic plants. Fort Worth, TX: Grazing Lands Technology Institute. **13.**Makkar, H.P.S., Singh, B., Dawra, R.K., 1988, Effect of tannin-rich of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen, *Brit J Nutr* 60, 287-296. **14.**Marais, J.P, Barnabas, A.D, and Figenschou, DL, 1997, Effect of calcium nutrition on the formation of calcium oxalate in Kikuyu grass, *Proceedings XVIII International Grassland Congress, Canada, Sesion 17*, p.45. **15.**McSweeney, C.S, PALMER, B., Mcneill, D.M., Krause D.O., 2001, Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim Feed Sci Tech* 91: 83-93. **16.**Narjisse, H., Elhonsali, M.A., Olsen, J.D., 1995, Effects of oak (*Quercus ilex*) tannins on digestion and nitrogen balance in sheep and goats, *Small Ruminant Res* 18: 201-206. **17.**Patel, P.A., Smitha, S.C., Alagundagi, and Salakinkop, S.R, 2013, The anti-nutritional factors in forages - A review, *Current Biotica* 6(4): 516-526. **18.**Rahman, M.M., Abdullah, R.B. and Wan Khadijah, W.E, 2012, A review of oxalate poisoning in domestic animals: tolerance and performance aspects, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Blackwell Verlag GmbH. **19.**Reddy, D.V., 2001, *Principles of Animal Nutrition and Feed Technology*. Oxford IBM Publishing Company Pvt. Ltd., New Delhi. **20.**Savage, G.P., Vanhanen, L., Mason, S.M., Ross, A. B., 2000, Effect of cooking on the soluble and insoluble oxalate content of some New Zealand foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 13, 201-206. **21.**Shewangzaw, A., 2016, Effect of dietary tannin source feeds on ruminal fermentation and production of cattle; A REVIEW, *Online Journal of Animal and Feed Research*, Volume 6, Issue 2: 45-56. **22.**Singh, A., Tiwana, U.S., Tiwans, M.S. and Puri K.P., 2000, Effect of application method of level of nitrogen fertilizer on nitrate content in oat fodder. *Indian J. Anim. Nutr.*, 17:315-319. **23.**Waghorn, G., 1996, Condensed tannins and nutrient absorption from the small intestine, *Proc of the 1996 Canadian Society of Animal Science Annual Meeting, Lethbridge, Canada (Rode L.M., ed.)*. pp. 175-194.

PRELIMINARNI REZULTATI AKLIMATIZACIJE NAZIMICA SA HOMOLOGNIM SOJEM VIRUSA REPRODUKTIVNOG I RESPIRATORNOG SINDROMA SVINJA

PRELIMINARY RESULTS OF ACLIMATISATION GILTS WITH HOMOLOGIC VIRUS OF REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME OF PIGS

Jan Plut¹, Peter Njegovec², Urška Jamnikar Ciglencečki³, Marina Štukelj¹

¹ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Klinika za reprodukcijo in velike živali, Klinika za prežvekovalce in prašiče, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenija,

² VOA Ihan, d.o.o. Breznikova 89, 1230 Domžale, Slovenija

³ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenija

Kratak sadržaj

Reproduktivni i respiratorni sindrom svinja (PRRS) je još uvek najskuplja komercijalna bolest svinja koja se javlja u svetu. Sa novim saznanjima o PRRS mi smo u mogućnosti da sprečimo, kontrolišemo i eradikujemo bolest. Kod kontrole bolesti najbitnija je aklimatizacija nazimica, najbolje sa homolognim sojem virusa PRRS znači sa sojem koji cirkuliše na farmi.

Namera naše pretrage je bila ustanoviti dali je oralna tečnost uporediv uzorak za dokaz tako antigena kao i antitela protiv virusa PRRS sa serumom. Također smo želeli ustanoviti dali možemo dokazati antigen i antitela u oralnoj tečnosti prije nego u serumu.

U pretragu uključili smo 5 grupa nazimica koje su došle iz PRRS negativne farme na PRRS pozitivnu farmu. Aklimatizacija vršila se je u odvojenoj zgradi od ostalih zgrada farme. Nazimice su aklimatizirane kada više nemaju virusa i zaštićene su sa specifičnim antitelima. Za potvrdu aklimatizacije uzorkovali smo serum i oralnu tečnost na dan dolaska na farmu i onda svaku sedmicu isti dan, 8 narednih sedmica.

Ukupni broj uzorka seruma je bio 503, a broj ukupnog uzoraka oralne tečnosti 39. Rezultati dokaza nukleinske kiseline u serumu in u oralnoj tečnosti i vreme dokaza antigena su uporedivi. Rezultati serologije nisu uporedivi među serumom i oralnom tečnošću. Ako želimo ranije postići aklimatizaciju onda je efikasnije ako dodatno stavljamo uže ispunjeno oralnoj tečnosti. Također možemo zaključiti da su sve nazimice aklimatizirane nakon 9 sedmica.

***Ključne reči:** PRRS, nazimice, aklimatizacija, serum, oralna tečnost*

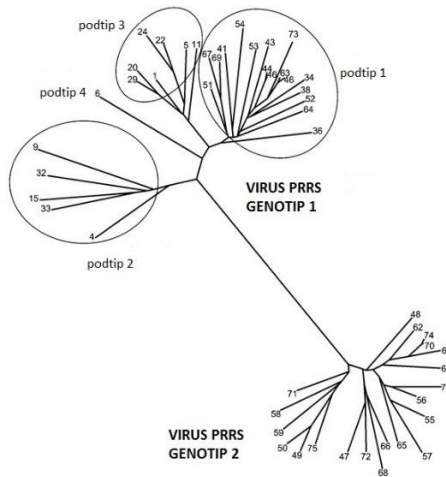
UVOD

Reproduktivni i respiratorni sindrom svinja (PRRS) je nakon trideset godina kada je bio prvi put potvrđen uzročnik bolesti još uvek najznačajnija in najskuplja bolest u svinjogojstvu u svetu. Studija objavljena u SAD je zaključila da su ukupni godišnji gubici zbog PRRSV-a u SAD bili oko 664 miliona dolara (Holtkamp i sar., 2013). Procenjuje se da godišnji uticaj bolesti u Evropi iznosi oko 1,5 milijardi € na svinje u odgoju i tovu i da je viši nego u priplodnom stadu - 54% naspram 46%. Tako da je PRRS bolest koja je promenila mnoge ideje u globalnoj proizvodnji svinja (Xavier de Paz., 2015).

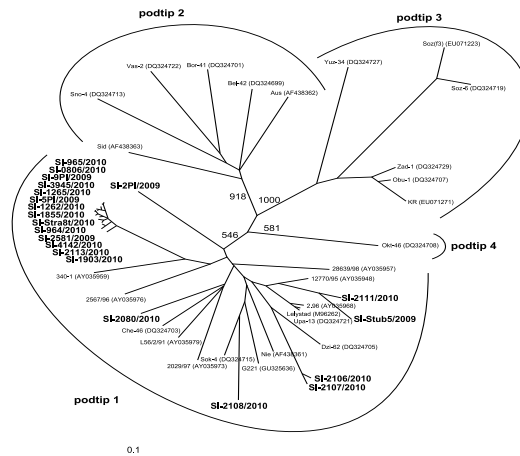
PRRS virus pripada redu Nidovirales i porodici Arteriviridae, virus je vrsno-specifičan i zbog toga se reprodukuje samo u pulmonalnim alveolarnim makrofagima (PAM) i u makrofagima drugih tkiva svinja (Cho i Dee, 2006), takođe se reprodukuje u matičnih ćelijama testisa nerastova (Sur i sar., 1997). Wensvoort i kolege (1992) podelili su virus PRRS na evropskim i američki izolat, koje su kasnije nazvali genotip 1 i genotip 2 (Stadejek i sar., 2006). Stadejek i kolege (2006) su utvrdili da postoje 4 podgrupe

unutar genotipa 1 (Slika 1). Istraživanja koja su sprovedena u Španiji (Prieto je i sar., 2009) pokazali su da pojava sojeva virusa PRRS nije geografski ograničena što znači da možemo iste sojeve naći u različitim područjima i takođe u različitim zemljama. U određenom području mogu postojati oba tipa virusa, naime genotipa 1 i genotipa 2. PRRS virus pokazuje izuzetnu genetsku raznovrsnost (Stadejek i sar., 2006; Stadejek i sar., 2008; Prieto i sar., 2009). Stadejek i saradnici (2006) su potvrdili pojavu četiri podtipa PRRS virusa genotipa 1, odnosno podtip 1, podtip 2, podtip 3 i podtip 4.

U Sloveniji je bilo dokazanih 6 genetski različitih sojeva PRRS u 30 uzgoja koji su bili 89,1-95,1% slični sa izolatom Lelystad (genotip 1) a sličnosti sa VR-2332 bila je samo 62,4-65,1% (genotip 2) (Toplak i sar., 2012). Svi dokazani izolati genotipa 1 u ovoj studiji pripadali su podgrupi 1 (Slika 2). Od 2011 potvrđen je u Sloveniji i genotip 2.



Slika 1: Filogenetsko stablo virusa PRRS koji su raspoređeni u genotip 1 in genotip 2 (priredeno po Stadejek i sar., 2006).



Slika 2: Filogenetsko stablo, gde su označene boldovane sekvence genotipa 1 iz Slovenije (pređeno po Toplak in sar., 2012).

Kao i kod drugih bolesti takođe vazi i za PRRS da se virus najčešće unosi u stado sa kupovinom pozitivnih svinja (56%), sa semenom (20%) sa izmetom (21%) i 3% na neodređeni način. Svinje se mogu inficirati intranazalno, intramuskularno, oralno, intrauterino (Magar i sar., 2004). Hermann i sar. (2005) utvrdili su da je infektivna doza koja je dovoljna da inficira 50% svinja u eksperimentu koje su izložene infekciji (ID₅₀) oralnim putem iznosi 10^{5.3} TCID₅₀, a na intranazalni način 10^{4.0} TCID₅₀. Manje od 20 odnosno 10 virusnih čestica dovoljno je za intramuskularnu infekciju (Zimmerman i sar., 2006). Virus se može širiti među svinjama istog uzgoja brušenjem zuba, skraćivanjem repova, rovašenjem, tetovažom i intramuskularnom (i/m) aplikacijom. Virus se prenosi intrauterino, sa krmače na prasad tokom prašenja i kada se prasad prenosi ka dojljama (Zimmerman i sar, 2012). Virus se širi i opremom, instrumentima, odećom, vodom, hranom i aerosolom.

Bolest se klinički manifestira kod svih kategorija svinja. Javljaju se reprodukcijски poremećaji kod krmača; povećan je broj abortusa, povećan je postotak neregularnih estrusa, produžen je period do ponovne ovulacije, manji postotak uspešne suprasnosti, skraćeno vreme nošenja, smanjen broj živorođene prasadi, povećan broj slabih, mrtvorodjenih i mumificiranih prasadi i povećan je procenat krmača sa agalaksijom. Kod krmača, nerastova i svinja u odgoju i tovu javlja se respiratorni poremećaji.

Kod nerastova primećujemo takođe slab apetit, apatičnost, smanjeni libido i loš kvalitet semena. Kod svih kategorija svinja viši je postotak uginuća, a najznačajniji je kod prasada na sisis in prasadi u odgoju (Zimmerman i sar, 2012).

Virus PRRS se reprodukuje u alveolarnim makrofagama što dovodi do ugrožavanja prve linije odbrane u plućima tako da PRRS virus ima imunosupresivni efekat i zbog toga su česte i sekundarne bakterijske i virusne infekcije. Povećana je incidenca endemičnih bolesti u priplodnom stadu, kod zalučene prasadi i kod svinja u odgoju. Tako da kod PRRS infekcije mnogo češće se javljaju streptokokni meningitis, češće su septikemije kod salmoneloze i Glässerove bolesti, eksudativni dermatitis, bakterijska bronhopneumonija i šuga (Tailor, 2006). Gubici su još veći zbog loše konverzije hrane i zbog smanjenja dnevnog prirasta.

Sa novim znanjima o PRRS mi smo u stanju da sprečimo, kontrolišemo i iskorenimo bolest. Ipak sprečavanje, kontrola i iskorenjivanje virusa PRRS koristeći trenutno poznate metode kontrole, dijagnoze i dostupnih vakcina veoma je teško. Za to postoji više razloga: npr. stalni uvoz novih sojeva PRRS virusa, problemi sa kliconosama, nedostatak informacija o svim mogućim načinima širenja virusa, ne preduzimanja mera biosigurnosti i nedostatku znanja uzgajivača i vlasnika svinja o bolesti.

Kod izbijanja bolesti možemo da preduzmemo različite akcije u zavisnosti od veličine farme i prevalence bolesti. Ako ne možemo izvoditi najbitnijih unutrašnjih biosigurnosnih mera koje su odvojene kategorije svinja po prostorijama in izvođenje sistema uzgoja sve unutra sve van (all in/all out) je jedina mogućnost da bolest samo kontrolišemo. Sa kontrolom bolesti smanjujemo morbiditet i mortalitet na farmi što je posledica cirkulacije virusa u stadu. Cilj kontrole je minimizirati posledice kruženja virusa u priplodnom stadu, a time i sprečiti vertikalni i horizontalni prenos i dostići razvoj specifične imunosti protiv virusnog soja koji kruži na farmi kako bi poboljšali proizvodne rezultate u čitavom stadu (Dee, 1998; Morrison, 2012). Zaštita svinja je najefikasnija ako je homologna što znači da su svinje sasvim zaštićene samo protiv istih ili veoma srodnih sojeva virusa PRRS koji su prisutni na farmi (Dijaz i sar., 2012).

Najbitnija mera kod kontrole bolesti je aklimatizacija nazimica pre ulaska u farmu; aklimatizacija znači izlaganje serološki negativnih nazimica (ako je moguće) homolognom soju virusa u dovoljno dugom periodu da se nazimice inficiraju i razviju specifičan imunitet (Batista i sar., 2004; Presente i sar., 2006; Vashisht i sar., 2008). Dosledna aklimatizacija nazimica poboljšava rezultate proizvodnje (Zimmerman i sar., 2012). Pre nego što udju u priplodno stado nazimice treba testirati sa ELISA i RT-PCR. Samo nazimice koje imaju specifična antitela i koje su negativne na virus mogu se uvesti u priplodno stado (Zimmerman i sar., 2012). Aklimatizacija nazimica traje od 30 do 60 dana, to je dovoljno dug period da se inficiraju i da se prevaziđe bolest (Dee, 2003). Aklimatizacija se može postići na način da se nazimice izloži zalučenoj prasadi koja ima viremiju takođe možemo koristiti za ovu svrhu tkiva mrtvorodjene, mumificirane i slabe prasadi. Nazimice možemo zaraziti i sa užetom ispunjenom oralnom tečnošću viremičnih svinja u odgoju, onda nazimice žvaću uže i na taj način se zaraze (Perez i sar., 2015). Uzorkovanje oralnetečnosti sve više se upotrebljava jer ovakav način uzorkovanje ne prouzrukuje nikakvog stresa svinjama i zbog toga je prijemljiv i sa stanovišta dobrobiti svinja (Ramirez i

sar., 2012). Sve Jedna od opcija je i serumizacija sa farmским homolognim sojem virusa ili vakcinacije sa živom oslabljenom vakcinom (Batista i sar., 2002; Dee, 2003; Zimmerman i sar., 2012).

Upotreba viremične prasadi u odgoju je relativno brza i veoma jeftina metoda (Vashisht i sar., 2008). Iz tkiva mrtvoprašenih, mumificiranih i slabih prasadi možemo pripremiti homolognu vakcinu i sa njom i/m vakcinišemo sve nazimice (Batista i sar., 2002; Zimmerman i sar., 2012). Serumizacija je efikasna zbog visoke heterogenosti PRRS virusa i činjenice da komercijalne vakcine ne promovisu dobru zaštitu protiv heterolognih sojeva PRRS virusa (Batista i sar., 2002). Uže ispunjeno sa oralnom tečnošću može služiti i za aklimatizaciju nazimica sa homolognim sojom virusa. Metoda je jednostavna i jeftina tako da ona postaje sve važnija (Perez i sar., 2015). Takođe se mogu koristiti za aklimatizaciju nazimica žive oslabljene vakcine, ali sa ograničenim efektom zbog visoke genetske raznolikosti virusa PRRS (Zimmerman i sar., 2006; 2012;). Uprkos heterolognosti vakcine ona ublažava kliničku sliku kao što su npr. poremećaj reprodukcije, smanjuje se broj mrtvoprašenih, mumificiranih i slabih prasadi (Pileri i sar., 2015; Park i sar., 2014).

Kada poboljšamo zdravstveno stanje svinja i kada uspostavimo takvo stanje kontrole bolesti, da se smanji incidenca sekundarne infekcije, poboljšavamo menadžment kao i spoljnu i unutrašnju biosigurnost možemo preći u eliminaciju i kasnije iskorenjivanje bolesti ako možemo izvoditi sve potrebne biosigurnosne mere. Međutim u cilju eliminacije bolesti moraju se ispuniti sledeći zahtevi za biosigurnost; kategorije svinja moraju biti odvojene po prostorijama, striktno mora da se implementira sve unutra/sve napolje pre nego što se dovedu nove svinje u bokseve. Boksevi moraju biti očišćeni, osušeni i dezinfikovani.

Eliminacija bolesti može se postići sa imunizacijom priplodnog stada na različite načine; prirodno zaražavanje, vakcinacija i serumizacija (Torremorell i Christianson, 2002; Torremorell i sar., 2003; Cho i Dee, 2006; Corzo 2010 i sar., Štukelj i Valenčak, 2012; Zimmerman i sar., 2012).

Najznačajnija spoljna biosigurnosna mera je kupovina svinja iz negativnih uzgoja i da su uvedene na farmu prolazeći kroz karantin, koji bi trebalo da traje najmanje 6 nedelja. Uvek i takođe u slučaju da je farma pozitivna na PRRS nužno je kupiti negativne svinje jer su najverovatnije inficirane sa različitim sojem virusa. To znači ponovno akutno izbijanje bolesti na farmi pored toga će na farmi cirkulisati dva različita soja virusa.

Najbitnije mere unutrašnje biosigurnosti bez kojih je nemoguće postići eliminaciju bolesti su odvojene kategorije svinja po prostorijama i izvođenje sistema uzgoja sve unutra/sve napolje. Pored navedenog takođe je važno sprečiti uvođenje PRRS virusa sa presvlačenjem i menjanjem obuće radnika pre ulaska na farmu. Takođe je neophodno potrebno ograničiti ulazak posetilaca na farmu. PRRS virus dugo preživi posebno u hladnim i vlažnim mesecima zbog toga se moraju svi alati i pomoćna sredstva i transportna sredstva za prevoz svinja redovno čistiti, osušiti i dezinfikovati. Takođe je neophodno redovno vršiti deratizaciju na farmi i kontrolisati muve i sprečiti pristup pticama (Pitkin i sar. 2011).

Namjera naše pretrage je bila ustanoviti dali je oralna tečnost uporediv uzorak za dokaz tako antigena kao i antitela protiv virusa PRRS sa serumom. Također smo želeli ustanoviti dali možemo dokazati antigen i antitela u oralnoj tečnosti prije nego u serumu.

MATERIAL I METODE

Material

Farma

Aklimatizaciju nazimica smo izvodili na farmi od 11.10. 2017 do 27.12. 2017. Farma ima oko 1500 krmača a proizvodnja se uključuje sve od prašenja do početka tova. Kada imaju svinje oko 20 kg voze jih u kooperaciju i tamo se tove do kraja. Farma je pozitivna na PRRS. Na farmi su četiri zgrade u tri ide proizvodnja a u jednoj zgradi koja je najbliže ograde izvodi se aklimatizacija nazimica.

Nazimice in aklimatizacija

Jednom nedeljom voze na farmu 16 nazimica koje imaju od 20-25 kg iz PRRS negativne farme. Nazimice stavljaju u prvu zgradu, gde izvode prekuženje. U zgradi su nazimice koje su došle pre nedelju dana ili prije. U ovoj zgradi ostaju nazimice tri meseca.

Naivne nazimice se zaraze sa direktnim kontaktom viremičnih nazimica koje su u boksovima pored ovih koje su uskoro došle. Nazimice zaraze i aerogenim putem, pored toga stavljaju u boksove naivnih nazimica i izmet viremičnih nazimica. Pored svega nabrojanog upotrebili smo i uže ispunjeno oralnoj tečnostju viremičnih nazimica.

U pretragu uključili smo 5 grupa nazimica. Prve tri grupe aklimatizirale su sa prirodnim prekuženjem, aerogeno i izmetom viremičnih svinja. Grupama 4 i 5 smo pored spomenutog stavljali i uže ispunjeno oralnoj tečnostju viremičnih nazimica.

Uzorkovanje

Serum

Ukupno smo oduzeli 503 seruma nazimica iz vene cave cranialis. Uzorkovali smo 9 nedelja, jedan put u nedelji. Prvo uzorkovanje (dan 0) je bilo na dan kada su nazimice došle na farmu. Onda smo isti dan u sedmici svih navodnih 8 sedmica uzorkovali iste nazimice.

Oralna tečnost

Ukupno smo oduzeli 39 zajedničkih uzorka oralne tečnosti. Za uzorkovanje upotrebili smo uže koje je bilo od 100 % pamuka i ostavili ga od 20-30 minuta u boksu. Ovo uže su sve nazimice žvakale. Nakon toga iz užeta iscedili smo oralnu tečnost u sterilne vijale i stavili na hladno sve do dolaska u laboratorij. U laboratoriju centrifugisali smo oralnu tečnost na 2000 okreta/10 minuta i sa pipetom oduzeli supernatant i stavili oralnu tečnost u sterilne vijale i sahranili na – 80° C do pretrage.

Metode

Dokaz virusne nukleinske kiseline

Za dokaz virusne nukleinske kiseline tako u serumu kao i u oralnoj tečnosti upotrebili smo metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR). Za izolaciju RNA upotrebili smo QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini, za umnožavanje QIAGEN OneStep RT-PCR Kit. Upotrebili smo primerj: PRRS F-P1 in PRRS R-P2.

Dokaz antitela

Za dokaz antitela tako u serumu kao i u oralnoj tečnosti upotrebili smo enzim-imunološki test (ELISA). Za dokaz antitela u oralnoj tečnosti upotrebili smo Qiagen Pigtype PRRSV Ab OF ELISA. Za dokaz antitela u serumu upotrebili smo Qiagen Pigtype PRRSV Ab ELISA.

REZULTATI

Rezultate dokaza nukleinske kiseline virusa PRRS u serumu i oralnoj tečnosti možemo usporediti. Na dan 0 svi uzorki su bili negativni i već sedam dana nakon dolaska u obe vrste uzoraka u svih 5 grupa dokazali smo virusnu nukleinsku kiselinu. Nazimice prve grupe su bile u viremiji do 7. sedmice nakon dolaska, kod grupe 2 više od 8 nedelja, kod grupa 3, 4 i 5 viremija trajale je do 8 nedelja nakon dolaska.

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

Tabela 1. Dokaz antitela u serumu sa ELISA

	dan 0	1.sedmica	2.sedmica	3.sedmica	4.sedmica	5.sedmica	6.sedmica	7.sedmica	8.sedmica
grupa 1	0/10 (0%)	0/10 (0%)	8/10 (80%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	9/10 (90%)	10/10 (100%)	/
grupa 2	0/16 (0%)	1/15 (6,7%)	4/15 (26,7%)	14/15 (93,3%)	14/15 (93,3%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)	15/15 (100%)
grupa 3	0/16 (0%)	2/15 (13,3%)	5/15 (33,3%)	14/14 (100%)	14/14 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)
grupa 4	0/16 (0%)	3/16 (18,8%)	10/16 (62,5%)	15/15 (100%)	13/13 (100%)	13/13 (100%)	13/13 (100%)	13/13 (100%)	13/13 (100%)
grupa 5	0/16 (0%)	1/15 (6,7%)	11/13 (84,6%)	13/13 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)
Ukupno	0/74 (0%)	7/71 (9,9%)	38/69 (55,1%)	66/67 (98,5)	63/64 (98,4)	62/62 (100%)	61/62 (98,3%)	62/62 (100%)	52/52 (100%)

Rezultati (Tabela 1) dokaza antitela u serumu pokazuju da su sve nazimice bile bez antitela kada su bile dovezene na farmu, već nakon 7 dana od smeštaja na farmi 9,9 % nazimica već je imalo antitela, od 5. sedmice nakon dolaska nazimica na farmu sve su već razvile antitela protiv virusa PRRS. Kod grupe 4 i 5 kojim smo dodatno stavljali uže ispunjeno oralnoj tečnosti svinja u viremiji, više nazimica i prije su razvile antitela kao nazimice drugih grupa. Što se dobro vidi po rezultatima u prvoj i drugoj sedmici nakon dolaska, kasnije se razlike ne vidi više.

Tabela 2. Dokaz antitela u oralnoj tečnosti sa ELISA

	dan 0	1.sedmica	2.sedmica	3.sedmica	4.sedmica	5.sedmica	6.sedmica	7.sedmica	8.sedmica
grupa 1	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	/
grupa 2	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
grupa 3	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
grupa 4	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
grupa 5	pos.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.

Rezultati dokaza antitela u oralnoj tečnosti nisu usporedivi sa rezultatima u serumu. Iz tabele 2 vidi se da su nazimice grupe 1, 4 i 5 imale antitela već na dolasku. Grupa 5 je bila onda u prvoj sedmici negativna i onda do kraja uzorkovanja pozitivna. Grupa 2 ostala je negativna još u prvoj sedmici, od druge sedmice dalje ostala je pozitivna.

RASPRAVA

Svinjski reproduktivni i respiratorni sindrom (PRRS) je najskuplja komercijalna svinjska bolest koja se javlja u svjetu i zbog toga je nužno izvoditi preduzimanja. Kod izbijanja bolesti imamo na raspolaganje različite načine preduzimanja u odnosu na veličinu farme i prevalencu bolesti. Možemo poduzimati različite akcije poput kontrole bolesti, eliminaciju bolesti i eradikaciju bolesti.

Činjenica je, da je najbolja zaštita protiv virusa PRRS homologna zaštita, znači da su životinje zaštićene samo protiv virusa sa kojim su došle u kontakt i razvile specifična antitela (Dijaz i sar., 2012). Homolognu zaštitu možemo postići bilo prirodnim prekuženjem, sa užetom ispunjenim oralnoj tečnosti ili serumizacijom. Na farmi gde ne možemo izvoditi najbitnijih unutrašnjih biosigurnosnih mera je jedini mogući način preduzimanja kontrola bolesti. Najbitnija faza u kontroli bolesti je aklimatizacija nazimica sa homolognim sojem (sojem koji cirkuliše na farmi) virusa PRRS (Dee, 2003; Zimmerman i sar., 2012).

Najjednostavniji način prekuženja je prirodno prekuženja, znači da nazimice dođe u kontakt sa virmičnim svinjama, možemo stavljati u boksove i izmet viremičnih svinja i također u prostoriji gde imamo akutno izbijanje bolesti puno je virusa i u zraku, tako, da se nazimice mogu inficirati i aerogenim putem. Ovakav način prekuženja je potvrđen kao mnogo efikasan sa strane različitih autora (Torremorell i Christianson, 2002; Torremorell i sar., 2003; Cho i Dee, 2006; Corzo 2010 i sar., Štukelj i Valenčak, 2012; Zimmerman i sar., 2012).

U našoj studiji za potvrdu aklimatizacije uzorkovali smo krv individualnih nazimica te grupni uzorak oralne tečnosti na dan dolaska iz PRRS negativne farme na PRRS pozitivno farmo i to ponavljali narednih 8 nedelja na isti dan u nedelji. Aklimatizacija vršila se je u odvojenoj zgradi od ostalih zgrada farme. Namera naše pretrage je bila ustanoviti dali je oralna tečnost uporediv uzorak za dokaz tako antigena kao i antitela protiv virusa PRRS sa serumom. Također smo želeli ustanoviti dali možemo dokazati antigen i antitela u oralnoj tečnosti prije nego u serumu. Uzorkovanje oralne tečnosti je iz godinu u godinu sve atraktivnije jer ovaj način ne uzrokuje nikakvog stresa kod svinja i zbog toga je veoma prihvatljiv što se tiče dobrobiti (Perez i sar., 2015; Ramirez i sar., 2012). U našoj studiji potvrdili smo, da je svih pet grupa nazimica već sedam dana nakon dolaska bila antigen pozitivna odnosno dokazali smo virusnu nukleinsku kiselinu tako u serumu kao i u oralnoj tečnosti. Grupama 4 i 5 smo pored spomenutog stavljali i uže ispunjeno oralnoj tečnostjo nazimica u viremiji. Kod ovih grupa nismo primetili nikakve razlike od grupe 1, 2, 3. Ako bi želeli potvrditi razliku morali bi izvoditi RT-qPCR. Rezultati dokaza nukleinske kiseline u serumu in u oralnoj tečnosti i vreme dokaza antigena su potpuno uporedivi, također se naši rezultati skladaju sa rezultatima različitih autora (Chittick i sar., 2011; Kittawornrat i sar., 2013; Prickett i sar. 2010).

Rezultati dokaza antitela u serumu pokazuju da su sve nazimice bile bez antitela kada su došle na farmu što potvrđuje da je farma izvora PRRS negativna. Nakon 7 dana od smeštaja na farmi 9,9 % nazimica već je imalo antitela, od 5. sedmice nakon dolaska nazimica na farmu sve su već razvile antitela protiv virusa PRRS. Rezultati su očekivani i potvrđuju identičan razvoj antitela kao i u studijama koje su objavili u znanstvenoj literaturi (Dee, 2003; Loving i sar., 2015; Lunney i sar., 2016). Kod grupe 4 i 5 kojim smo dodatno stavljali uže ispunjeno oralnoj tečnosti svinja u viremiji više nazimica i prije su razvile antitela kao nazimice drugih grupa. Što se dobro vidi po rezultatima u prvoj i drugoj sedmici nakon dolaska, kasnije nema više razlika između grupa. Što znači ako želimo ranije postići aklimatizaciju onda je efikasnije ako dodatno stavljamo i uže ispunjeno oralnoj tečnosti. Nazimice su aklimatizirane kada više nemaju virusa i zaštitene su sa specifičnim antitelima (Batista i sar., 2004; Presente i sar., 2006; Vashisht i sar., 2008). Samo nazimice sa ovakvim imunološkim statusom primerne su za rasplod. Rezultati dokaza antitela u oralnoj tečnosti nisu uporedivi sa rezultatima u serumu. Nazimice grupe 1, 4 i 5 imale su antitela već na dolasku. Grupa 5 je bila onda u prvoj sedmici negativna i onda do kraja uzorkovanja pozitivna. Grupa 2 ostala je negativna još u prvoj sedmici, od druge sedmice dalje ostala je pozitivna. Ovi rezultati nisu očekivani. Pretpostavljamo da je nešto naopako sa dijagnostičkim testom ili su poteškoće sa pripremom uzorka oralne tečnosti znači neki preanalitski problemi. Svakako potrebne su još studije da bi mogli potvrditi šta uzrokuje ovakav rezultat. Pored spomenutog možemo još zaključiti da su sve nazimice aklimatizirane nakon 9 sedmica od dolaska na farmu i se mogu staviti u priplodno stadu. Naši rezultati se slagaju sa rezultatima Dee (2003) koji navodi da aklimatizacija nazimica traje od 30 do 60 dana, to je dovoljno dug period da se inficiraju i da se prevaziđe bolest.

Literatura

1. Batista I., Pijoan C., Torremorell M (2002): Experimental infection of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) during acclimatization. *J Swine Health Prod* 10, 147–50. 2. Batista L., Pijoan C., Dee S., Olin M., Molitor T., Joo H.S., Xiao Z, Murtaugh M. (2004): Virological and immunological responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a large population of gilts. *Can J Vet Res* 68, 267–73. 3. Benfield D.A., Nelson C., Steffen M., Rowland R.R. (2000): Transmission of PRRS by artificial insemination using extended semen seeded with different concentrations of PRRSV. In: Annual meeting of the American Association of Swine Practicioners: proceedings. Indianapolis 405–408. 4. Chittick W.A., Stensland W.R., Prickett J.R., Strait E.L., Harmon K., Yoon K.J., Wang C., Zimmerman J.J. (2011): Comparison of RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus

in porcine oral fluid specimens. *J Vet Diagn Invest*, 23,248–253. **5.**Cho J.G., Dee S.A. (2006): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 66(3), 655–62. **6.**Corzo C.A., Mondaca E., Wayne S., i sar. (2010): Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 154, 185–192. **7.**Dee S.A. (1998): A protocol for defining breeding herd stability and classifying farms according to PRRS status to identify potential intervention strategies: a summary of 200 farms. In: 15th International Pig Veterinary Society Congress: proceedings. Birmingham: IPVS, 2. **8.**Dee S.A., Deen J., Rossow K., i sar. (2003): Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. *Can J Vet Res* 67, 12–19. **9.**Diaz I., Gimeno M., Darwich L., i sar. (2012): Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Res* 43, 1–30. **10.**Holtkamp D.J., Kliebenstein J.B., Zimmerman J.J., Neumann E., Rotto H., Yoder T.K., Wang C., Yeske P., Mowrer C.L., Haley C. (2013): Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod* 21 (2), 72–84. **11.**Kittawornrat A., Engle M., Panyasing Y., Olsen C., Schwartz K., Rice A., Lizano S., Wang C., Zimmerman J.J. (2013): Kinetics of the PRRSV humoral immune response in swine serum and oral fluids collected from individual boars. *BMS, Vet Res*: 61. **12.**Loving C.L., Osorio F.A., Murtaugh M.P., Zuckermann F.A. (2015): Innate and adaptive immunity against PRRSV. *Vet Immunol Immunopathol*, 167: 1–14. **13.**Lunney J.K., Fang Y., Ladinig A., Chen N., Li Y., Rowland B., Renukaradhya G.J. (2016): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: pathogenesis and interaction with immune system. *Annu Rev Anim Biosci*. 4:129–54. **14.**Morrison R.B. (2012): Control or elimination of PRRS virus? In: 4th European Symposium of Porcine Health Management: proceedings. Bruges: European College of Porcine Health Management, 60–63. **15.**Otake S., Dee S.A., Rossow K.D., i sar. (2002): Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by fomites (boots and coveralls). *J Swine Health Prod* 10(2), 59–65. **16.**Perez A.M., Davies P. R., Goodell C. K., Holtkamp D. J., Mondaca-Fernández E., Poljak Z., Tousignant S. J., Valdes-Donoso P., Zimmerman J. J., Morrison R. B. (2015): Lessons learned and knowledge gaps about the epidemiology and control of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in North America. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 246 (12), 1304-1317. **17.**Park C., Seo H.W., Han K., Kang I., Chae C. (2014): Evaluation of the efficacy of a new modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (Fostera PRRS) against heterologous PRRSV challenge. *Veterinary Microbiology* 172(3-4), 432-442. **18.**Pileri E., Gibert E., Soldevila F., Garcia-Saenz A., Pujols J., Diaz I., Darwich L., Casal J., Martín M., Mateu E. (2015): Vaccination with a genotype 1 modified live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus significantly reduces viremia, viral shedding and transmission of the virus in a quasi-natural experimental model. *Veterinary Microbiology* 175(1), 7-16. **19.**Pitkin A., Otake s., Dee S. Biosecurity protocols for the prevention of spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Swine Disease Eradication Center, University of Minnesota College of Veterinary Medicine, 2011: 17 str. http://www.aasv.org/aasv/VIRUS_PRRS_BiosecurityManual.pdf (5.11.2012). **20.**Presenta P., Rebonato V., Sandri G., Giovanardi D., Sperati R.L., Torriani S. (2006): Phylogenetic analysis of ORF5 in ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: a showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management. *Vet Microbiol* 114, 214–224. **21.**Prickett J.R., Cutler S., Kinyon J.M., Naberhaus N., Stensland W.R., Yoon K.J., Zimmerman J.J. (2010): Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *JSHAP*, 18(4): 187–195. **22.**Prieto C., Vázquez A., Núñez J.I., Álvarez E., Simarro I., Castro J.M. (2009): Influence of time on the genetic heterogeneity of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet J* 180, 363–370. **23.**Ramirez A., Wang C., Prickett J.R., Pogranichny R., Yoon K.J., Main R., Johnson J.K., Rademacher C., Hoogland M., Hoffmann P., Kurtz A., Kurtz E., Zimmerman J.J. (2012): Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev Vet Med* 104:292–300. **24.**Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Patapchuk D., Podgorska K. (2006): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol* 87, 1835–1841. **25.**Štukelj M., Valenčak Z. (2012): Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) with serumization, natural exposure and vaccination on six pig farms in Slovenia. *Savrem Poljopr* 61(1), 75–83. **26.**Taylor D.J. (2006): Pig diseases, 8th ed.: Glasgow: Taylor D.J. 60–68. **27.**Terpstra C., Wensvoort G., Ter Laak E.A. (1991): The »new« pig disease: laboratory investigations. In: CEC. The new pig disease: porcine reproductive and

respiratory syndrome: a report on the seminar/workshop held in Brussels on 29-30 April 1991. Brussels: European Commission Directorate General for Agriculture 36–45. **28.**Torremorell M., Christianson W.T. (2002): PRRS eradication by herd closure. *Adv Pork Prod* 13, 169–176. **29.**Torremorell M., Henry S., Christianson W.T. (2003): Eradication using herd closure. In: Zimmerman J, Yoon KJ, eds. *The PRRS compendium*. 2nd ed. Des Moines, Iowa: National Pork Board 157–161. **30.**Vashisht K., Erlandson K.R., Firkins L.D., Zuckermann F.A., Goldberg T.L. (2008): Evaluation of contact exposure as a method for acclimatizing growing pigs to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Am Vet Med Assoc* 232, 1530–1535. **31.**Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M. (2006): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus). In: Straw BE, Zimmerman JJ, D’Allaire S, Taylor DJ. *Diseases of swine*. 9th ed. Ames: Blackwell Publishing Professional 387–417. **32.**Zimmerman J.J., Benfield D.A., Dee S.A., i sar. (2012): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (porcine arterivirus). In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez KJ, Stevenson GW. *Diseases of swine*. 10th ed. Ames: Blackwell Publishing Professional 461–486. **33.**Toplak I., Rihtarič D., Hostnik P., Grom J., Štukelj M., Valenčak Z. (2012): Identification of a genetically diverse sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Slovenia and the impact on the sensitivity of four molecular tests. *J Virol Methods* 179, 51–56. **34.**Wensvoort G., de Kluyver E.P., Pol J.M., Wagenaar F., i sar. (1992): Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome: a review of mystery swine disease research at Lelystad. *Vet Microbiol* 33, 185–93.

ИНФЕКЦИЈЕ МАЛИХ ПРЕЖИВАРА УЗРОКОВАНЕ БАКТЕРИЈОМ
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS INFECTIONS IN SMALL RUMINANTS

Дејан Бугарски¹, Марко Кировски², Дубравка Миланов¹, Владимир Полачек¹,
Александар Миловановић¹, Далибор Тодоровић¹, Биљана Божић¹

¹Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“,

²Ветеринарски завод „Суботица“

Кратак садржај

Инфекције узроковане бактеријом *Clostridium perfringens* представљају значајан проблем у узгоју малих преживара. Типови *Cl. perfringens* имају различити значај у патологији, а такође и различито деловање код оваца, а различито код коза. Инфекције протичу као ентеротоксемија, абомазитис или ентероколитис. Због брзог тока ентеротоксемије лечење није могуће те се све мере посвећују предупредњу болести отклањањем што више неповољних утицаја и имунопрофилактиком.

Кључне речи: овце, козе, *Clostridium perfringens*

Увод

Клостридијалне инфекције, нарочито инфекције органа за варење, присутне су широм света код људи, домаћих и дивљих животиња. За клостридијалне инфекције малих преживара, у околностима када нису присутне значајне заразне болести, може се слободно рећи да представљају најчешћи здравствени проблем и да нема узгоја у којима у неком тренутку нису узроковали озбиљну штету. То се нарочито односи на инфекције узроковане са *Cl. perfringens*, узрочником низа различитих болесних стања оваца и коза свих старосних група.

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens је грам позитиван анаеробни, спорулирајући, токсин продукујући штапић широко распрострањен у окружењу. *Cl. perfringens* је становник органа за варење и здравих животиња и органе за варење колонизује првог дана живота у којима обезбеђује анаеробну средину, повољну за развој других облигатних анаероба као што су *Lactobacillus* и *Bacteroides*.

Инфекције са *Cl. perfringens* су честе у узгојима малих преживара и зависно од клиничког испољавања имају различите називе што може довести до забуне о којој се болести у ствари ради. Тако су у литератури наводе хеморагични ентероколитис, ентеротоксемија, дизентерија јагњаци, ентеротоксемична жутица, ентеритис јагњаци (*yellow lamb disease*), летња ентеротоксемија оваца и јагњаци (*pulpy kidney disease*), зимска ентеротоксемија оваца, клостридијални абомазитис и клостридијални ентеритис али је најчешће прихваћен уопштен назив ентеротоксемија због растварања бактеријских токсина и могућности њихове ресорпције. Ове болести изазивају различити типови *Cl. perfringens*-а (типови А, В, С, D, E) и обољења су последица пренамножавања узрочника у органима за варење и последичног ослобађања токсина и његовог локалног или системског деловања (1). Главни токсини су алфа, бета епсилон и јота на основу којих је извршена типизација и још бар 16 токсина у различитим комбинацијама.

***Clostridium perfringens* токсини**

Патогеност *Cl. perfringens* се везује за егзотоксине и типизација је извршена на основу на основу постојања гена и могућности стварања четири основна летална токсина: алфа токсин (ген *plc*), бета токсин (ген *cpb*), епсилон токсин (ген *etx*) и јота токсин (ген *iap/ibp*).

Алфа токсин ствара свих пет типова. Цитотоксичан је јер хидролизује фосфолипидну мембрану еритроцита и других ћелија. Улога алфа токсина у патогенези цревних болести није јасна али се поуздано зна да учествује у развоју гасне гангрене људи и још неких сисара, а код малих преживара узрокује ређи облик ентеритиса јагњади. У цревима оваца доводи до мултифокалне инфилтрације неутрофила у субмукози танких црева, а у дебелим цревима утиче на транспорт воде.

Бета токсин стварају *B* и *C* тип. Вегетативни облици бактерија луче протоксин који се се разграђује услед деловања протеаза и настаје бета токсин. Он доводи до некротичног ентеритиса и ентеротоксемије углавном код млађих јединки са ниском концентрацијом трипсина и цревном садржају јер се бета токсин брзо разлаже под деловањем трипсина (2).

Епсилон токсин стварају типови *B* и *D*. Дејством трипсина, химотрипсина или бактеријских протеаза на полипептидни протоксин настаје активни токсин. Епсилон токсин је некротизирајући и леталан и сматра се једним од најјачих бактеријских токсина. Доводи до повећања пропустљивости крвних судова и одговоран за нервне симптоме ентеротоксемије код оваца и коза јер оштећењем ендотелних ћелија крвних судова отвара се пут деловању токсина на неуроне мозга и ствара типична оштећења у виду симетричне енцефаломалације. Под утицајем епсилон токсина настају различите промене у органима за варење оваца и коза чиме се може објаснити разлика у испољавању ентеротоксемије ове две врсте (2).

Јота токсин садржи две подјединице *Ia* и *Ib* и обе су потребне за токсично деловање. Повећава пропустљивост крвних судова. Његов значај није потпуно разјашњен иако се сматра да учествује у патогенези ентеритиса (2).

Међу осталим токсинима издвајају се ентеротоксин, перфринголизин и бета-2 токсин. Ентеротоксин се ослобађа током спорулације и ствара најчешће тип *A*, односно сви типови који поседују *spe*-ген. Овај токсин нема значаја у патогенези обољења малих преживара и не учествује у патогенези ентеротоксемије оваца (3). Код људи се повезује са тровањима храном.

Бета-2 токсин стварају тип *A* и неки изолати типова *B*, *C*, и *E*. Значај бета-2 токсина није још тачно растумачен, сматра се да је саучесник у развоју абомазитиса и ентеритиса али не доводи до некрозе слузокоже црева.

Табела 1: *Clostridium perfringens*, типови и обољења које узрокује код оваца и коза

<i>Clostridium perfringens</i>	Токсини				Обољење оваца	Обољење коза
	Алфа ген <i>plc</i>	Бета ген <i>cpb</i>	Епсилон ген <i>etx</i>	Јота ген <i>iap/ibp</i>		
Тип						
<i>A</i>	++	-	-	-	Ентеритис јагњади, жутица, абомазитис, надун и чир сиришта	Надун и чир сиришта јаради
<i>B</i>	+	++	+	-	Дизентерија јагњади	Редак узрочник ентеротоксемије
<i>C</i>	+	++	-	-	Хеморагични ентеритис Ентеротоксемија	Хеморагични ентеритис Ентеротоксемија
<i>D</i>	+	-	++		Ентеротоксемија	Најчешћи узрочник ентеротоксемије
<i>E</i>	+	-	-	++	-	Пролив јаради

++ - ствара се као преовладавајући токсин

+ - ствара се у мањој количини

- - не ствара се

Предиспонирајући чиниоци за развој инфекције

Микроорганизми у органима за варење су у сталном додиру са ћелијама домаћина чиме се стварају дуготрајне везе са домаћином. Ове везе су кључне за одржавање функције слузокожа, имунитета, одржавање епителне бране, покретљивости и апсорпције. У нормалним околностима микробиом је у симбиотском односу са домаћином и доприноси здрављу, међутим, поремећај у микробиому црева доводи до неравнотеже односа са домаћином и развија се такозвана дисбиоза. *Cl. perfringens* као и друге клостридије је широко распрострањен у природи, присутан је у органима за варење и у уобичајеним околностима не долази до њиховог штетног утицаја, али у дисбиози се стварају услови за неповољно деловање по макроорганизам. За развој ентеротоксемије кључно је присуство *Cl. perfringens* у желудачно-цревном тракту, а затим вишак угљених хидрата или беланчевина које омогућавају пораст броја клостридија и смањена перисталтика црева чиме се смањује избацивање бактерија и токсина и омогућава њихово пренамножавање у одређеним деловима црева. Пролиферација клостридија и производња токсина често су последица нагле промене obroka у смислу врсте хранива и количине без претходног прилагођавања током више дана. Нагли прелазак на бујну пашу, испаша на стрништима различитих култура, интензиван тов, додаток уреје у оброк слободан приступ житарицама или концентрованој храни су најчешћи разлози за појаву ентеротоксемије. У овим случајевима знатна количина хране пролази кроз преджелуце неразграђена и у цревима представља подлогу за бујање клостридија. Ентеротоксемија се обично јавља код напредних јединки које узимају већу количину хране било да је реч о млеку, замени за млеко или концентрованој храни, тако да се може рећи да је ентеротоксемија и болест преједања. У узгоју оваца и коза треба још узети у обзир пренасељеност што доноси велику микробиолошку загађеност простора у којима животиње обитавају, унос земље и прашине приликом паше. Такође, нису ретки случајеви када узрок за појаву болести остане неоткривен.

Присуство појединих патогених клостридија у преджелуцима и цревима преживара је већ показатељ извесног степена дисбиозе (4). Поремећаји унутар равнотеже микроорганизама могу бити узроковани храном, тешким металима, токсичним супстанцама, бактеријским токсинима, антибиотицима и другим утицајима који доводе до ограниченог запаљења, системске реакције или интоксикације. Поремећаји у саставу микробиома органа за варење преживара утврђено у многим патолошким стањима. Тако је у односу на здраве животиње разлика у микробиому утврђена код говеда која су носилац *Clostridium botulinum*-а (4), крвог пролива јунади у тову (5), *Escherichia coli* O157:H7 клицоноша и паразита сиришта код коза где су утврђене разлике у киселости садржаја сиришта и секреторне активности (6). Чиниоци који омогућавају промене у микробиолошком односу су на разне начине везани за исхрану. Козе храњене оброком са високим садржајем протеина и скроба имају већи број клостридија укључујући и *Cl. perfringens* у колону и слепом цреву (7) него оне храњене кабастом храном. Истовремено у цревима долази до локалних запаљенских реакција, повећане киселости и пропустљивости епитела зида црева (8) што погодује и ресорпцији бактеријских токсина и развоју ентеротоксемије.

Инфекције узроковане са *Clostridium perfringens*

Инфекције са *Cl. perfringens* могу имати перакутни, акутни, субакутни или хроничан ток. Код оваца је чешћи перакутни ток, док је код коза уобичајена појава акутног, субакутног и хроничног тока. Последица инфекције може имати развој ентеротоксемије, појаву када долази до стварања егзотоксина и њихове апсорпције у крвоток услед чега се развија клиничка слика системског поремећаја здравља или развој клостридијалног абомазитиса и ентеритиса при чему није неопходна ресорпција токсина (1). Ентеротоксемије се развијају када се под одређеним околностима у цревима створе услови за пренамножавање клостридија или смањи перисталтика што омогућава бујање бактерија у цревима и производњу токсина у леталној количини. Код ентеротоксемија морбидитет се креће око 10%, а леталитет готово 100% (9). У целини гледано, инфекције узроковане са *Cl. perfringens* су много више проучаване и описане код оваца него код коза. Ентеротоксемије код коза протичу са нешто измењеном сликом него што је код оваца и

предиспонирајући утицаји другачије делују на козе, а другачије на овце (9). *Cl. perfringens* инфекције у узгоју се јављају спорадично или епизоотијски (10).

Cl. perfringens тип A

Најраширенији тип у природи и најчешћи тип утврђен у органима за варење здравих животиња (3). Познат је као узрочник гасне гангрене код људи и животиња.

Ентеротоксемија

Ентеротоксемија јагњади узрокована типом A се испољава као потиштеност, присутне су хемоглибинурија, анемија и жутица одакле је и потекао енглески назив за обољење – *yellow lamb disease*. Обољење траје 6-12 часова и завршава се угинућем. Патоморфолошки налаз није специфичан, присутна је жутица, увећана и бледа слезина и јетра, у мокраћном мехуру се налази мокраћа црвене боје. Патохистолошки налаз чине периацинарна некроза јетре, конгестија слезине и плућа са едемом, нефроза.

Ентеритис

Од ентеритиса оболевају јагњад и јарад. Акутног је тока и развија се за неколико часова. Запажа се одбијање хране, телесна температура није измењена, а пролив обично није присутан јер је смањена перисталтика црева. Обдукцијом се налазе црвена танка црева, пуна крвавог садржаја.

Бактериолошки налаз *Cl. perfringens* тип A у случајевима ентеротоксемије треба узети са резервом. Тип A је најраширенији у цревима здравих животиња и након угинућа се брзо може раширити по органима тако да његово присуство не мора да указује и на узрок угинућа (2).

Абозитис

Cl. perfringens тип A се често утврђује у случајевима абозитиса јагњади и јаради, мада је могућ и код старијих јединки. Оболеле животиње обично имају телесну температуру у физиолошком оквиру до наступања компликација у виду перитонитиса или сепсе када она може бити или смањена или повишена. Основни клинички знак је повећање трбуха услед накупљања гасова у сиришту. Услед надуна сиришта отежано је дисање и могуће је бледило видљивих слузокожа. У случају изостанка правовременог лечења смртност је 100%. Патоморфолошким прегледом се запажа увећање сиришта, запаљење или некроза сиришта, чиреви различите дубине до потпуног пробијања зида сиришта и последичним развоја перитонитиса. Могућ је емфизем или едем зида сиришта (2).

Патоморфолошки налаз код ентеротоксемија изазваним типом A није специфичан. Присутна је жутица, јетра и слезина су увећане и бледе. У мокраћном мехуру због хемоллизе и хемоглибинурије је могуће наћи мокраћу црвене боје (2).

Cl. perfringens тип B

Како је бета токсин осетљив на деловање трипсина оболевају само врло младе животиње. Јавља се као изненадно угинуће, а код старије јагњади мршављење, потиштеност и особено истезање приликом устајања што се сматра последицом деловања епсилон токсина на централни нервни систем. Патоморфолошки се утврђује мултифокални хеморагични или некротични ентеритис. При дужем трајању болести може се утврдити фокална симетрична енцефаломалација (2).

Cl. perfringens тип C

Клиничка слика је слична оној коју узрокује тип B осим што код дужег трајања болести изостају нервни симптоми. Патоморфолошки налаз се такође не може разлучити од оног који се налази у случајевима које је изазвао тип B (2).

Cl. perfringens тип D

Сматра се да је тип D најчешћи узрочник кластридијане ентеротоксемије оваца и коза. Ток код оваца је перакутан, а клинички знаци код ентеротоксемије оваца узроковане са *Cl.*

perfringens тип *D* су изненадно угинуће или отежано дисање, лежање са „завеслајима“ ногу, грчеви, блејање, слепило и опистотонус. Пролив се обично не јавља (11). Патоморфолошки налаз чине едем плућа, могућ хидроперикард, хидроторакс и асцитес са или без фибрина, едем можданих овојница, субкапсуларна петехијална крварења на бубрегу (11). Такође је могуће да патоморфолошки налаз буде негативан или са врло slabим променама. Размекшали бубрези су последица брзе аутолизе која настаје у ткиву оштећеном токсинима па дијагностички значај има једино код врло свежих лешева. Значајна микроскопска промена је симетрична фокална енцефаломалација (2). Клиничка слика код коза је другачија. Код младих јединки ток болести и патоморфолошки налаз је истоветан ономе код оваца (12) али код старијих јединки преовладава ентероколитис (10). Ток може бити перакутан (младе јединке), акутан, субакутан и хроничан. Разлике су последица различитог деловања епсилон токсина у цревима оваца и коза. Под утицајем епсилон токсина у танким и дебелим цревима се мења транспорт воде и јона преко различитих механизма код оваца и коза тако да код коза брже долази до накупљања воде у лумену што омогућава брже спирање бактерија и токсина него што је то случај код оваца код којих долази до акумулације токсина у цревима без знакова поремећаја током неколико часова (13).

Cl. perfringens тип *E*

О значају типа *E* има врло мало података. Доказан је као узрочник тешког ентеритиса новорођеног јарета (14).

Табела 2: Разлике у ентеротоксемији оваца и коза узроковане са *Clostridium perfringens* тип *D*

	Овце	Козе
Ток болести	Перакутан	Перакутан, акутан, субакутан, хроничан
Клиничка слика	Више изражени нервни симптоми	Преовладава пролив
Патоморфолошки налаз	Едем плућа и мозга, хидроперикард	Ентероколитис
Патохистолошки налаз	Периваскуларни едем, тј. накупљање ацидофилних протеина око зида малих артерија и вена	Нема типичних промена, могућ периваскуларни едем у акутном и субакутном току
Имунитет након вакцинације	Добар	Кратак, 3-4 месеца

Дијагноза

Приликом постављања дијагнозе треба узети у обзир анамнестичке податке, клиничку слику, патоморфолошки налаз и лабораторијске налазе. Анамнестички подаци, клиничка слика и патоморфолошки налаз дају добру основу за постављање сумње, али за коначну дијагнозу неопходно је лабораторијско испитивање односно изолација и типизација кластридија и доказивање присуства токсина у цревима или другим телесним течностима. Различите технике доказивања присуства токсина нису потпуно поуздане тако да налаз треба посматрати као део укупне слике болести (15).

Широко је прихваћено да се процеси распадања ткива одвијају брже код ентеротоксемија него код других узрока угинућа, а и неке промене које се уочавају код ентеротоксемија попут размекшања бубрега у суштини постмортална промена (2).

Као поуздана метода за утврђивање генотипа може се користити мултипла полимераза ланчана реакција којом се утврђује специфични ген токсина (16).

Код постављања дијагнозе ентеротоксемије оваца изазване типом *D* уз доказ кластридија и епсилон токсина у илеуму значајан је патохистолошки налаз ликвефактивне некрозе и периваскуларног едема у мозгу. Ипак треба имати у виду да код оваца патохистолошке промене на

мозгу и глукозурија који се сматрају патогномичним не морају бити присутне у свим случајевима (11).

Диференцијална дијагноза

Диференцијално дијагностички треба искључити сва обољења са брзим током и угинућем или нервним симптомима. У случајевима вишедневног присуства нервних симптома неопходно је микробиолошким испитивањем искључити листериозу без обзира што је могућ патоморфолошки налаз својствен ентеротоксемији. У оваквим случајевима не треба изгубити из вида да су клостридије природан становник црева и да у случају постојања предуслова за њихово пренамножавање током боловања могу прикрити примарно обољење. Присуство пролива захтева искључивање кокцидиозе, криптоспоридиозе и салмонелозе (10). У случају абомазитиса, надуна сиришта и чира треба искључити друге узрочнике попут *Sarcina* и других клостридија и то *Clostridium sordellii*, *Clostridium fallax* и *Clostridium septicum*. Последњих година се у домаћим узгојима све више уочавају поремећаји функције и здравља сиришта подмлатка како све више користе замене за млеко. *Clostridium sordellii* је изолован је у случајевима изненадног угинућа оваца свих старости мада чешће код јагњади старости 4-10 недеља. Патоморфолошки налаз обухвата благу надутост трбушног зида услед надутог сиришта. Код животиња старијих од 4 месеца је могућа појава подкожних едема. Код јединки старих до 10 недеља зид сиришта је задебљан, едематозан и емфизематозан, док код старијих од 4 месеца нема задебљања. На наборима сиришта су присутна подручја некрозе и конгестије, а могућ је и налаз чира. У трбушној дупљи је могуће присуство црвенкасте течности и примеса фибрина.

Лечење

Због брзог тока болести у случајевима ентеротоксемије често лечење није могуће. У случају продуженог тока може се покушати давањем инфузије, антибиотика и адсорбенса мада њихов ефекат није доказан. Запажено је да тетрациклин ефикасније делује на смањење лучења токсина него пеницилин (17). Нестероидни антифламаторици такође могу бити од користи у стабилизацији животиње од токсемичног шока и смањења бола (10).

Имунопрофилактика

У основи ентеротоксемије и абомазитиса и ентеритиса изазваних клостридијама лежи дисбиоза узрокована исхраном или претераним микробиолошким загађењем простора у којем животиње бораве, а искуство показује да је врло често тешко контролисати све неповољне утицаје који могу довести до развоја клостридиозе. Због тога основна и најједноставнија мера у спречавању појаве ентеротоксемија је имунизација. Ипак примена имунизације не значи да и даље не треба искључивати што је више могуће неповољних утицаја. Природни токсини у цревима су слабо имуногени али донекле изазивају имуни одговор тако значајан број одраслих животиња већ поседује титар антитела који међутим нема заштитну моћ. Антигени у вакцини су најчешће само токсини који имају за циљ стварање имуног одговора према токсинима.

Овце добро реагују на имунизацију. Искуство показује да иако произвођачи многих вакцина наводе да имунитет траје 10-12 месеци, ради постизања потпуне заштите стада имунизацију треба радити два пута годишње. Имунизација коза не даје увек жељену заштиту јер имунитет траје релативно кратко и за ову појаву још нема објашњења (18). Због краткотрајнијег вакциналног имунитета код коза постоје препоруке да се имунизација врши свака 3 до 4 месеца након прве вакцинације и ревакцинације (19) или барем полугодишње (10). Имунизација коза не штити од појаве ентероколитиса коза. У сваком случају, код обе врсте вакцинацију током године треба тако планирати да се имунују и бремените јединке 3-4 недеље пред порођај како би се добила жељена концентрација колостралних антитела која могу пружити заштиту до 12 недеља живота (20). Потомство вакцинисаних мајки треба вакцинисати по истеку колостралних антитела односно не пре 6 недеља живота (20) али не треба изгубити из вида особеност стада и ситуацију у погледу присуства клостридијалних инфекција.

Пожељнија је употреба што мање валентних вакцина ради постизања бољег имунитета. Вишевалентне вакцине осим што су скупље јер садрже и антигене који можда и нису потребни не дају задовољавајући имунитет према антигенима против којих постоји потреба (10).

Литература

1.Simpson KM, Callan RJ, Van Metre DC, 2018, Clostridial abomasitis and enteritis in ruminants. *Vet. Clin. Food Anim.* 34, 155–184. 2.Uzal FA, Songer, JG, 2008, Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 253–265. 3.Kalender H, Ertas HB, Cetinkaya B, Muz A, Arslan N, Kılıc A, 2005, Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. *Vet. Med. – Czech*, 50, 10, 439–442. 4.Krüger M, Shehata AA, Grosse-Herrenthey A, Ständer N, Schrödl W, 2014, Relationship between gastrointestinal dysbiosis and *Clostridium botulinum* in dairy cows. *Anaerobe*, 27, 100-105. 5.Zeineldin M, Aldridge B, Lowe J, 2018, Dysbiosis of the fecal microbiota in feedlot cattle with hemorrhagic diarrhea. *Microbial Pathogenesis*, 115, 123-130. 6.Li RW, Li W, Sun J, Yu P, Baldwin R L, Ur JF, 2016 The effect of helminth infection on the microbial composition and structure of the caprine abomasal microbiome. *Scientific Reports* 6, 20606, 1-10. 7.Metzler-Zebeli BU, Schmitz-Esser S, Klevenhusen F, Podstatzky-Lichtenstein L, Wagner M, Zebeli Q, 2013, Grain-rich diets differently alter ruminal and colonic abundance of microbial populations and lipopolysaccharide in goats. *Anaerobe*, 20, 65-73. 8.Emmanuel DG, Madsen KL, Churchill TA, Dunn SM, Ametaj BN, 2007, Acidosis and lipopolysaccharide from *Escherichia coli* B:055 cause hyperpermeability of rumen and colon tissues. *J. Dairy Sci.* 90, 12, 5552-7. 9.Sumithra TG, Chaturvedi VK, Siju SJ, Susan C, Rawat M, Rai AK, Sunita SC, 2013, enterotoxaemia in goats-A review of current knowledge. *Small Ruminant Research*, 114, 1, 1-9. 10.Smith MC, Sherman DM, 2009 *Goat Medicine*, Second Edition, Wiley-Blackwell, USA. ISBN: 978-0-781-79643-9. 11.Uzal FA, Kelly WR, Morris WE, Bermudez J, Baiso'n M, 2004. The pathology of peracute experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep. *J Vet Diagn Invest* 16, 403–411. 12.Karthik K, Manimaran K, Bharathi R, Shoba K, 2017, Report of enterotoxaemia in goat kids. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 5, 7, 289-292. 13.Fernandez-Miyakava ME, Uzal, FA, 2003, The early effects of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in ligated intestinal loops of goats and sheep. *Vet. Res. Commun.* 27, 231-241. 14.Kim HY, Byun JW, Roh IS, Bae YC, Lee MH, Kim B, Songer JG, Jung BY, 2013, First isolation of *Clostridium perfringens* type E from a goat with diarrhea. *Anaerobe*, 22, 141-143. 15.Uzal FA, Kelly WR, Thomas R, Hornitzky M, Galea F, 2003, Comparision of four techniques for the detection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in intestinal contents and other body fluids of sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 15, 94-99. 16.Kadra B, Guillou JP, Popoff M, Bourlioux P, 1999, Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR) . *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 24, 3, 259–266. 17.Stevens DL, Maier KA, Mitten JE, 1987, Effect of Antibiotics on Toxin Production and Viability of *Clostridium perfringens* Antimicrobial agents and chemotherapy, 213-218, 31, 2. 18.Veschi JLA, Dutra IS, Alves MAB, Perri SHV, 2012, Serological evaluation of polyvalent commercial vaccines against enterotoxemia in goats. *Ars Veterinaria*, 28, 4, 222-226. 19.Miyashiro S, Nassara AFC, Del Fava C, Cabral AD, Silva M, 2007. *Clostridium perfringens* types a and d associated with enterotoxemia in an 18- month-old goat. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 13, 2. 890. 20.de la Rosa C, Hogue DE, Thonney ML, 1997, Vaccination schedules to raise antibody concentrations against epsilon-toxin of *Clostridium perfringens* in ewes and their triplet lambs. *J. Anim Sci*, 75, 2328-2334.

КЕТОЗА И ИНСУЛИНСКА РЕЗИСТЕНЦИЈА КОД КРАВА*

KETOSIS AND INSULIN RESISTANCE IN DAIRY COWS

*Марко Р. Цинцовић¹, Радојица Ђоковић², Бранислава Белић¹,
Милош Петровић², Ивана Лакић¹*

¹Департман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду;

²Агрономски факултет Чачак, Универзитет у Крагујевцу

*Рад је део пројекта TR31062

Кратак садржај

Кетоза крава је комплексан поремећај метаболизма масти и угљених хидрата која се одликује негативним енергетским билансом, падом концентрације глукозе у крви и гликогена у јетри, интензивирањем метаболизма масти и процеса кетогенезе у јетри. Код крава оболелих од кетозе утврђена је високо значајна негативна корелација између концентрације глукозе у крви и концентрација слободних масних киселина, укупних липида и кетонских тела. Инсулинска резистенција у кетози крава се одликује смањеном одговором инсулина на глукозу као и смањеним антилиполитичким ефектом инсулина на масно ткиво. Повишена липолиза и повишена концентрација БХБ значајно су повезане са различитим показатељима инсулинске резистенције код крава. Вредности БХБ показују значајну повезаност са индексима инсулинске резистенције, као и са измереним параметрима током интравенског глукоза толеранс теста. Повезаност базалног и динамичког одговора НЕФА, БХБ, инсулина и глукозе значајно је детерминисана вредностима RQUICKI-BHB индекса.

Кључне речи: кетоза, инсулинска резистенција, краве.

Кетоза и метаболичка адаптација у раној лактацији

Метаболички стрес у раној лактацији код млечних крава лежи у основи многих обољења. НЕФА и БХБ су слабо варијабилне вредности и показују велики дијагностички значај у процени метаболичког и здравственог статуса крава, док је концентрација глукозе средње варијабилна вредност, па је њен дијагностички значај такође средњи. Пролонгирана хиперкетонемија и висока концентрација НЕФА имају негативан утицај на бројне аспекте адаптације млечних крава на перипартални метаболички стрес у перипарталном периоду. Поређења ради треба навести да концентрација НЕФА у распону од 0,3-0,5 mmol/l представља интензивну липидну мобилизацију, а вредност преко 0,7 mmol/l веома интензивну липидну мобилизацију. Концентрација БХБ преко 1,2 mmol/l указује на субклиничку кетозу, док се при вредностима изнад 2 mmol/l развија клиничка кетоза.

Постоје бројна истраживања у којима су краве класификоване на основу концентрације НЕФА и/или БХБ да и се испитале разлике у метаболичкој адаптацији. Нађено је да краве са концентрацијом НЕФА изнад 0,6 mmol/l и БХБ преко 1 mmol/l у раној лактацији показују значајне промене у метаболизму које указују на наглашен катаболизам, имуносупресију и дефицитарна стања, а појава обољења је значајно већа у овој групи крава. Све ово говори у прилог чињеници да је метаболички стрес у основи бројних обољења крава у раној лактацији (1,2).

Кетоза крава је комплексан поремећај метаболизма масти и угљених хидрата која се одликује негативним енергетским билансом, падом концентрације глукозе у крви и гликогена у јетри, интензивирањем метаболизма масти и процеса кетогенезе у јетри. Кетоза се обично појављује код високо-млечних крава у периоду одмах након тељења и у вези је са масном јетром и

гијазношћу крава (кетоза типа 2), као и за време максималне лактације, када се не уноси довољно хране према производњи мелка (кетоза типа 1).

Хормонске адаптације код крава у кетози су сличне адаптационим процесима које настају у раној лактацији, па се зато кетоза може окарактерисати као стање где долази до лошег хомеостатског рестројавања метаболизма (3,4).

Код крава оболелих од кетозе утврђена је високо значајна негативна корелација између концентрације глукозе у крви и концентрација слободних масних киселина, укупних липида и кетонских тела. То значи да се при хипогликемији повећава концентрација слободних масних киселина пропорционално смањењу концентрације глукозе у крви. Сама чињеница да је мобилизација слободних масних киселина у пуерпералном периоду интензивна код крава, интензивира се и синтеза кетонских тела као последица непотпуног сагоревања масних киселина у ћелијама јетре. На основу изнетог може се рећи да кетоза код високо-млечних крава представља сложен поремећај метаболизма угљених хидрата и масти, кога одликује повећана мобилизација слободних масних киселина из телесних депоа, хипогликемија, пражњење резерви гликогена у хепатоцитима, смањена глуконеогенетска активност и интензивирање процеса кетогенезе у јетри.

Непосредно пре, а нарочито после телења, у условима негативног енергетског биланса и нагле и неконтролисане липомобилизације, веома су ниске концентрације инсулина у крви, па самим тим изостаје липогени утицај инсулина на масно ткиво, а примарну улогу преузимају липолитички хормони (катехоламини, хормони раста, глукагон) који стимулишу липомобилизацију из телесних депоа и кетогенезу у јетри. Наиме, код високо-млечних крава почетком и током максималне лактације у циркулацији се налазе високе концентрације хормона раста и релативно ниске концентрације инсулина, IGF-I, лептина, кортизола и тиреоидних хормона. Ово омогућује лакше усмеравање материје и енергије ка млечној жлезди.

Хормонски статус и инсулинска резистенција у кетози

Промена хормонског статуса који се огледа у промени вредности IGF-I, СТХ, кортизола или тиреоидних хормона може директно утицати на развој инсулинске резистенције у кетози (5). Познато је да је у раној лактацији концентрација СТХ повишена, али упркос томе концентрација IGF-I опада. Као један од разлога који објашњава ову појаву наводи се смањена концентрација инсулина (инсулинска резистенција) која доводи до смањене експресије рецептора за СТХ. Дакле, недостатак инсулина или инсулинска резистенција могу бити у директној вези са смањеном концентрацијом IGF-I. Нађено је да излагање крава негативно енергетском билансу у раној лактацији доводи до пада RQUICKI индекса односно повећања резистенције на инсулин, уз пад вредности IGF-I. Смањена продукција IGF-I у хепатоцитима и делеција гена за продукцију IGF-I доводи до пада његове концентрације у крвотоку, што за последицу има повећање концентрације инсулина и слабији клиренс глукозе као знак типичне инсулинске резистенције. Функционална инактивација IGF-I рецептора уз рецепторе инсулина на нивоу скелетне мускулатуре доводи до дијабетеса типа II. Апликација СТХ код јуница доводи до пада вредности RQUICKI (повећања инсулинске резистенције) због пораста концентрације инсулина, глукозе и НЕФА. Развој инсулинске резистенције у раној лактацији зависи од карактеристика гена који дефинишу СТХ. Смањена концентрација IGF-I указује на смањену активност анаболичке осе у организму, а у вези је са смањеном концентрацијом инсулина и повећаном концентрацијом НЕФА у раној лактацији.

Код крава после апликације дексаметазона долази до повећања инсулинске резистенције. Овакав резултат је последица глуконеогенетског потенцијала кортизола код млечних крава, али и због чињенице да испољава и липолитички ефекат, обзиром да више вредности глукозе и НЕФА за исту јединицу инсулина управо значе постојање инсулинске резистенције. Одавно је познато да код здравих људи инсулинска резистенција настаје јер после апликације дексаметазона долази до смањене периферне употребе глукозе, а проблем постоји на пострецепторском нивоу. Ово је потврђено и на анималном моделу.

Настанак инсулинске резистенције као последица хипотиреоидизма потврђена је у многим радовима, како на анималном моделу тако и код људи. Механизми који су том приликом описани и којима је објашњена повећана инсулинска резистенција код хипотиреоидизма били су следећи: смањен ниво глуконеогенезе уз пад производње глукозе у јетри, смањена производња

гликогена из глюкозе, дисрегулација лептина у хипоталамусу када изостаје његово дејство на периферна ткива и поремећај у транслокацији GLUT4.

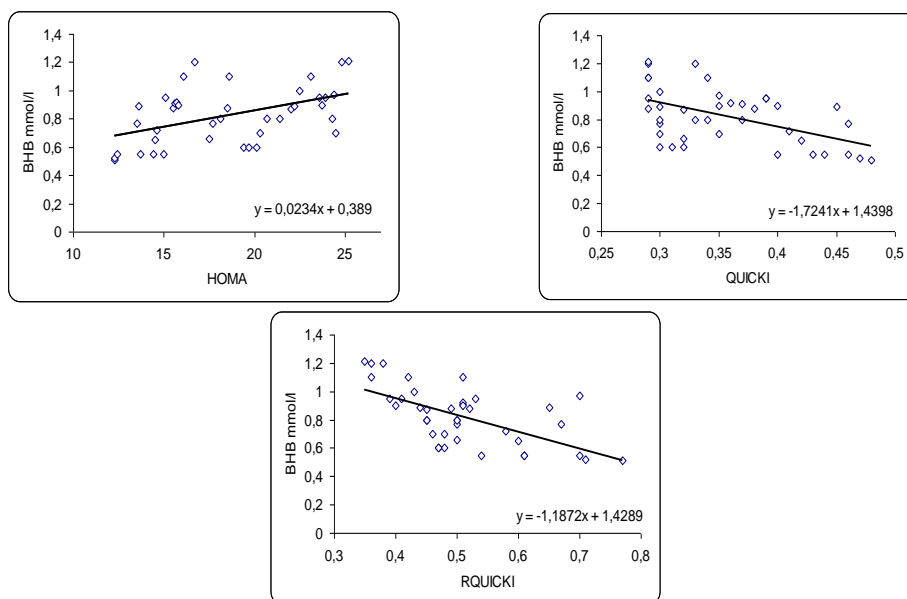
НЕФА, БХБ и инсулинска резистенција у кетози

Инсулинска резистенција у кетози крава се одликује смањеном одговором инсулина на глюкозу као и смањеним антилипидичким ефектом инсулина на масно ткиво. Повишена липолиза и повишена концентрација БХБ значајно су повезане са различитим показатељима инсулинске резистенције код крава (6,7). Резултати приказани у графиконима 1-5 и у Табели 1.

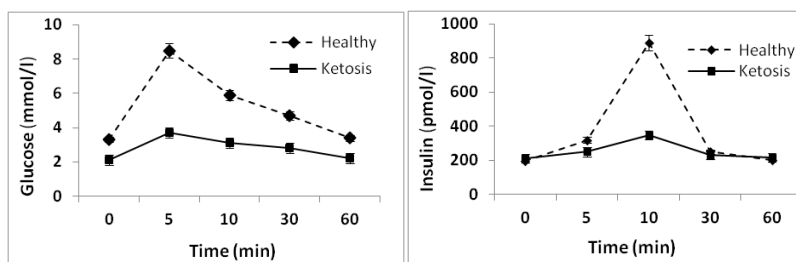
До ових резултата се дошло употребом различитих метода за мерење инсулинске резистенције. Све методе се могу поделити на: директне (хиперинсулинемијски еугликемијски кламп, тест супресије инсулина), индиректне (минимални модел анализа из често узиманих узорача крви током интравенског глюкоза толеранс теста, орални глюкоза толеранс тест, интравенски глюкоза толеранс тест) и сурогат методе (индекси добијени из базалне концентрације инсулина и глюкозе где спадају индекси 1/инсулин, инсулин:глюкоза однос, НОМА, QUICKI, RQUICKI (енг.: *Revised Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) и RQUICKI-BHB (RQUICKI модификован са вредношћу бета хидроксибутирата); као и индекси добијени из динамичких тестова. За све индексе инсулинске резистенције постоје тачно одређене формуле као и карактеристична тумачења. Вредности БХБ показују значајну повезаност са индексима инсулинске резистенције, као и са измереним параметрима током интравенског глюкоза толеранс теста.

RQUICKI индекс показује статистички значајну линеарну повезаност ($P < 0.05$) са базалним вредностима инсулина, глюкозе, НЕФА и БХБ. Вредности RQUICKI-BHB индекса показују негативну корелацију са базалним вредностима НЕФА, БХБ и њиховим клиренсом током интравенског глюкоза толеранс теста ($P < 0.01$) као и клиренсом глюкозе ($P < 0.05$), а позитивну корелацију са базалним вредностима инсулина и одговором глюкозе током ИВГТТ. Повезаност базалног и динамичког одговора НЕФА, БХБ, инсулина и глюкозе значајно је детерминисана вредностима RQUICKI-BHB индекса.

Повишена концентрација НЕФА може бити у вези са смањеним одговором инсулина после индукције глюкозом код крава које су у гладовању и које нису у лактацији нити гравидитету. Одговор глюкозе и инсулина после теста оптерећења глюкозом је значајно мањи у периоду лактације у поређењу са резултатима добијеним током засушења. Концентрација НЕФА у плазми је у негативној вези са максималним вредностима инсулина после теста оптерећења. Повишене концентрације НЕФА инхибирају искоришћавање глюкозе у инсулин зависним ткивима тако што доводи до абнормалности у транслокацији GLUT4 и промена у пострецепторским сигнаlima, а смањује и густину GLUT4. Испитивања у ин витро условима су поврдила да излагање адипоцита пацова високим концентрацијама НЕФА (посебно када се ради о инкубацији са палмитатом, чак и у ниским концентрацијама) доводи до инхибиције активације GLUT4. Повећана концентрација кетонских тела код крава иницира инсулинску резистенцију. Краве које су спонтано развиле кетозу и краве које смањено уносе храну имају значајно редуковану секреторни капацитет инсулина после глюкоза-толеранс теста. Кетоацидоза која се у овом периоду јавља може имати утицаја на настанак инсулинске резистенције, обзиром да излагање адипоцита киселим срединама доводи до значајне редукције везивања инсулина.



Графикон 1-3: Повезаност БХБ са индексима инсулинске резистенције код крава у раној лактацији (6)



Графикон 4-5: Вредности глукозе и инсулина, током итравенског глукоза толеранс теста (7)

Табела 1: Вредности индекса инсулинске резистенције код здравих крава и крава у кетози (8)

Индекс	Здраве (N = 8)	Кетозне (N = 7)*	p
RQUICKI	0.37±0.05	0.34±0.04	<0.05
RQUICKI-BHB	0.38±0.04	0.31±0.03	<0.01

*нижа вредност индекса значи већу резистенцију на инсулин

Концентрација неорганског фосфора и инсулинска резистенција у кетози

Концентрација неорганског фосфора (Pi) у крви опада током интравенског глюкоза толеранс теста (ИВГТТ) због пораста концентрације инсулина и глюкозе. Циљ једног нашег истраживања био је да се утврди веза између опадања вредности Pi са динамским променама вредности инсулина и глюкозе током ИВГТТ (AUC – укупна површина испод криве, AUC increment – површина испод криве од почетка ИВГТТ до момента када се постиже максимални одговор и CR-клиренс глюкозе), као и вредностима индекса инсулинске резистенције RQUICKI и RQUICKI-BHB (8). У експеримент су биле укључене здраве и кетозне краве. Метаболичке промене код кетозних крава су сличне променама код здравих крава у раној лактацији, с тим што кетоза настаје као знак лоше метаболичке адаптације са инсулинском резистенцијом. У обе групе нађен је пораст инсулина и глюкозе и Pi AUC током ИВГТТ, али су ове промене мање изражене код кетозних крава. Кетозне краве су имале нижу вредност RQUICKI и RQUICKI-BHB индекса, што указује на већи ниво инсулинске резистенције. Pi AUC је био у позитивној корелацији са одговором глюкозе (AUC глюкозе), а ова корелација је била под контролом одговора инсулина на глюкозу (AUC инсулина). Pi AUC позитивно корелира са максималном концентрацијом глюкозе и инсулина постигнуте током ИВГТТ, AUC и AUC increment за глюкозу и инсулин и CR глюкозе. Све наведене корелације су контролисане вредностима RQUICKI и RQUICKI-BHB индекса. Опадање Pi током интравенског глюкоза толеранс теста код млечних крава је повезана са свим аспектима инсулинске резистенције, а то су одговор инсулина на глюкозу (AUC инсулина) и одговор ткива на инсулин (RQUICKI и RQUICKI-BHB).

Литература

1.Cincović M.R., 2016, Metabolički stres krava. Monografija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad-Departman za veterinarsku medicinu; 2.Cincović M. i Starić J. (ur), 2017, Laboratorijska istraživanja metaboličkog statusa goveda. Monografija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad-Departman za veterinarsku medicinu i Veterinarski fakultet Ljubljana; 3.Đoković R., Cincović M.R., Belić B., 2014, Fiziologija i patofiziologija metabolizma krava u peripartalnom periodu. Udžbenik, Poljoprivredni fakultet Novi Sad-Departman za veterinarsku medicinu; 4.Djoković, R., Cincović, M., Kurćubić, V., Petrović, M., Lalović, M., Jašović, B., & Stanimirovic, Z. (2014). Endocrine and metabolic status of dairy cows during transition period. *Thai J Vet Med*, 44(1), 59-66; 5.Cincović M.R., 2013, Upotreba indikatora insulinске rezistencije u proceni metaboličkog statusa krava u ranoj laktaciji. Specijalistički rad, Fakultet veterinarske medicine Beograd; 6.Cincović, M., Kirovski, D., Vujanac, I., Belić, B., & Djoković, R. (2017). Relationship between the indexes of insulin resistance and metabolic status in dairy cows during early lactation. *Acta Veterinaria*, 67(1), 57-70; 7.Djoković, R., Dosković, V., Cincović, M., Belić, B., Fratrić, N., Jašović, B., & Lalović, M. (2017). Estimation of Insulin Resistance in Healthy and Ketotic Cows during an Intravenous Glucose Tolerance Test. *Pakistan Veterinary Journal*, 37(4); 8.Cincović, M. R., Djoković, R., Belić, et al. (2017). Inorganic phosphorus decrease after intravenous glucose tolerance test is associated with insulin resistance in dairy cows. *Veterinarski arhiv*, 87(4), 409-418.

АЛИМЕНТАРНИ ПРОЛИВИ ТЕЛАДИ

ALIMENTARY DIARRHEA OF CALVES

*Миодраг Радиновић, Ивана Давидов, Зорана Ковачевић,
Анна-марија Галфи, Михајло Ердељан, Милица Црногорац*

Департаман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Нови Сад

Увод

У постпарталном периоду здравствени статус телади је подложен утицају читавог низа фактора због специфичности функције дигестивног тракта и стања имуног система. Тело се рађа се неразвијеним имунитетом, а стиче пасивни имунитет од мајке уношењем колострума. Колострум је сложена биолошка течност која помаже у развоју пасивног имунитета новорођенчади и садржи значајне количине комплементарних састојака који делују као природни антимикробни агенси до сазревања имуног система новорођенчета. У саставу колострума су имуноглобулини, леукоцити, лактоферини, лизозими, цитокини (интерферон и интерлеукини), као и други имуномодулаторни чиниоци (фактори раста, хормони и слично). Конзумирање квалитетног колострума је битно за функцију имуног система и дигестивног тракта телета. Обољења дигестивног тракта у неонаталном периоду представљају најважнији здравствени проблем који изазива и највеће губитке, од укупног броја угинућа у прве две недеље пост партум готово 80% су последица поремећаја рада дигестивног тракта. Етиологија ових обољења је веома сложена и чине је пре свега грешке у исхрани и дејство инфективних фактора. Предиспозиција за настанак обољења је слаб локални имунитет на слузницама дигестивног тракта. Алиментарни проливи настају током млечне исхране, и последица су неразвијености дигестивног тракта телета, као и неадекватне исхране. У питању је осмотска дијареја, која настаје након повећања осмоларности у лумену црева и повећане секреције у лумен ово се дешава уколико несварени састојци млека доспеју у лумен црева.

Етиологија алиментарних пролива телади

Пролив као последица грешака у исхрани се може јавити код свих категорија говеда али најчешће код новорођене телади. У категорији телади старости до три недеље живота ово је један од најчешћих узрока појаве пролива. Етиолошки фактори су искључиво везани за храну али постоје и фактори предиспозиције везани за плоткињу, теле и услове смештаја. Грешке у исхрани се односе на квалитет колострума или млека, састав замене за млеко, количину хране, време храњења, температуру млека или замене за млеко, контаминацију или хигијенску неисправност хране.

Слабовитална, хиповитаминозна телад

Слабовитално и хиповитаминозно теле, рођено од слабе мајке, неће много добити ни када му се да квалитетан колострум, јер му је смањена ресорптивна способност слузнице црева, а тиме и искориштавање унетих материја. Слузница танких црева телади која пате од хиповитаминозе А, неспособна је да ресорбује заштитне и хранљиве материје, што представља тзв. слузнички блок. Истовремено, слузница сиришта је инсуфицијентна у секрецији лаб фермента, пепсина и хлороводоничне киселине. Таква телад пате од диспепсије. За постојање диспепсије говоре врло оскудни бактериолошки налази из измета код неких облика дијареје у неонаталном периоду, или се чак установе налази уобичајене микрофлоре. Висок рН желудачног садржаја (око 4 и мање), па и самог фецеса (8,5-9), некад указује на небактеријску етиологију

пролива, односно на диспепсију. Ово потврђује и објашњава разлоге неуспеле превентиве и терапије пролива антибиотцима, хемотерапеутицима и цревним антисептицима, јер узрок пролива није био биолошки фактор него дисфункција ресорптивно-секреторног система, односно инсуфицијенција слuzнице. Појам диспепсије, са патолошко-физиолошког становишта, углавном се везује за моногастричне животиње, па се овај појам може и на телад односити само у раном узрасту, када се физиолошки понашају као моногастричне животиње – у раном постпарталном периоду и периоду искључиво млечне исхране.

-време конзумације колострума

Ради постизања оптималног ефекта неопходно је да теле конзумира колострум непосредно након тељења. Слuzница танког црева има способност ресорпције имуноглобулина током 36 сати након партуса, али већ након истека 6 сати та се способност рапидно смањује. Осим тога, опада и вредност колострума - већ за 48 сати након тељења у колоструму има 10 пута мање гамаглобулина. Оптимално време за прву конзумацију колострума је у оквиру два сата након тељења.

-начин конзумирања млека

Телад се могу хранити на два начина, сисањем или напајањем. Предност сисања је у томе што је мања опасност од заразе и нема хлађења млека јер нема манипулације млеком од вимена до уста телета. Сисање је најбоља метода код крава мање производне вредности. Недостаци сисања леже у често прекомерном узимању млека што за последицу има пролив. Врло често теле не посиса сво млеко из вимена и сходно томе мора се вршити измузавање. Ако се заостало млеко не измузе, може доћи до упалних процеса у вимену. Напајање има предност у односу на сисање јер је количина млека тачно измерена. Ограниченим количинама млека се поспешује узимање суве хране. Врло је важно осигурати добру хигијену млека и путева које млеко мора проћи до самог напајања. Текад се могу напајати директно из канте или помоћу цуцле. Напајање из канте подразумева да теле узима млеко у великим гутљајима те изостаје активација рефлекса једњачког жлеба. Због овога део млека уместо у сиришту завршава у преджелуцима где настају трулежни процеси који доводе до продукције токсина и ослобађања гаса што може довести до пролива и тимпаније због дистензије преджелудаца. Исто тако напајањем директно из канте лако долази до преједања што такође може довести до пролива.

-температура млека

Млеко приликом напајања мора имати температуру приближну температури тела. Хладно млеко неповољно делује на перисталтику црева и на формирање груша у сиришту. Млеко температуре 35°C се угруша за 5 минута, док млеко температуре 20°C чак за 34 минута. Ако је температура млека 15°C биће потребно око 6 сати да се угруша. Исто тако хладно млеко неповољно делује на перисталтику и на тонус сфинктера чиме му се убрзава пасаж и смањује сварљивост.

-количина попијеног млека

Количина млека коју теле посиса треба да одговара запремини сиришта. Мања количина млека неће телету обезбедити осећај ситости и оно ће почети да једе простирку што може механички да оштети зид сиришта. Већа количина млека значи да ће део млека да заврши или у преджелуцима или да пропасира у танка црева. Због изостанка дејства хлороводоничне киселина и пепсина протеин из ове количине млека се неће моћи сварити већ ће подлећи трулежним процесима.

-квалитет замене за млеко

Замена за млеко може се користити у млечном периоду исхране као једина храна за телад, или заједно са starter смешама у каснијем периоду. Замена за млеко могу се давати одмах након завршетка колостралне исхране, али је уобичајено да се на њих прелази после 1-2 недеље исхране млеком. Количина обраног млеко у праху у заменама за млеко треба да износи између

50% и 90%. Преостали део смеше чине различите биљне и животињске масти, мање количине глукозе, брашна житарица и соје (1-3%), затим витамини А, Д, Е. Од угљених хидрата замена за млеко треба да садржи лактозу и глукозу јер њих дигестивни тракт телета може да свари. Уколико садрже сахарозу или скроб то код телата млађе од 4 недеље може довести до појаве пролива. Велики удео немлечних протеина у замени за млеко неповољно утиче на процес згрушавања у сиришту и погодује размножавању трулежних бактерија. Несварени протеин када доспе у црева погодује настанку осмотске дијареје.

Патогенеза

Присуство несварених компоненти хране у дигестивном тракту осмотски ривлачи воду у лумен црева, истовремено штетни продукти настали трулежним процесима ледирају слузокожу црева и изазивају запаљење и појачану ексудацију. Ово све доводи до губитка течности. Такође губи и електролите и албумине, што доводи до дехидрације и физиолошког гладовања. Ово доводи до хемоконцентрације, пораста хематокрита и хиповолемије са повећањем броја еритроцита. Услед губитка натријума, хлора и бикарбоната, као и нагомилавања млечне киселине и аминокиселине аланина у крви долази до ацидозе. Осим тога, долази до хипонатријемije и хипокалијемije. Услед олигурије долази до уремије и хиперфосфатемије, као и хипермагнезијемije, односно потпуне трансминерализације. У тако измењеним условима, ткива су слабо обезбеђена кисеоником, аминокиселинама, глукозом и витаминима, а повећана је количина хемоглобина и укупних серумских протеина.

Клиничка слика

Пролив се јавља трећи или шести дан, ређе осми и десети дан по рођењу, светло жућкасте боје, пенушав и исцрпљујући. Тело све више губи снагу, длака губи сјај и постаје сува и накретна, кожа губи еластичност, а очи губе сјај и упадају у очне дупље. Тело не сиса, али тражи воду. Све орално аплициране препарате врло брзо елиминише, јер је слузница црева, због губљења вилозитета, изгубила способност ресорпције, а секреција је повећана са губљењем воде, електролита и протеина. Ушне шкољке и екстремитети су хладни. Степен дехидратације се одређује према карактеристичним симптомима. У физиолошким условима, тело дневно губи до 200 ml телесне течности, док код пролива тај губитак износи 1-3,7 l на дан. Губитак воде је резултат појачане секреције, тј активности ћелија крипти. Степен дехидрације се одређује на основу смањења телесне масе телета услед губитка течности. Умерена дехидрација је ако је губитак до 5% телесне масе. Ако је губитак 6 до 8% телесне масе говори се о дехидрацији средњег степена, а тешки степен дехидрације настаје кад је губитак телесне масе 8-12%.

Дијагноза

Анамнестички подаци и клинички налаз дају довољно података за дијагнозу. У циљу постављања етилошке дијагнозе неопходно је спровести лабораторијске анализе. Ако су у питању замене за млеко корисно је испитати њихов састав и одредити време згрушавања.

Терапија

Потребно је обуставити исхрану млеком или заменом за млеко и перорално апликовати растворе електролита у току прва 24 сата. У тежим случајевима треба применити интензивну терапију путем интравенске апликације раствора електролита, глукозе, антибиотика. Интравенску инфузију треба изводити врло лагано, што није увек могуће у теренским условима. Због тога се прибегава интраперитонеалној апликацији, која се лако изводи, у кратком временском периоду могу се унети веће количине раствора, а ресорпција није пуно спорија од интравенске због велике површине перитонеума и широког лумена лимфних судова перитонеума. Перорално се могу апликовати адсорбенси и адстрингенси или препарати на бази пробиотика. Након што се тело стабилизује може се поново постепено уводити млеко или замена за млеко у оброк.

Профилактика

У интензивном одгоју теладџ треба оптимизацијом фактора исхране смањити појаву пролива на најмању могућу меру. Пожељно је у прве три недеље телад хранити пуномасним млеком а затим прећи на замену за млеко доброг квалитета.

Литература

1. Bartlett, K. S., McKeith, F. K., Drackley, J. K. (2002.): Effects of Energy Source in Milk Replacers on Growth and Body Composition of Male Holstein Calves. Illini Dairy Net. <http://www.livestocktrail.illinois.edu/dairy/paperdisplay.cfm?contentid=360>. (12.09.2012). 2. Hill, S. R., Knowlton K. F., Daniels, K. M., James, R. E., Pearson, R. E., Capuco, A. V., Akers, R. M. (2008.): Effect of milk replacer composition on growth, body composition, and nutrient excretion in preweaned Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, 91:3145-3155. 3. Quigley, J. D., Wolfe, T. A., Elsasser, T. H. (2006.): Effects of additional milk replacer feeding on calf health, growth, and selected blood metabolites in calves. *Journal of Dairy Science*, 89:207-216. 4. Zou Y, Wang Y, Deng Y, Cao Z, Li S, Wang J, Effects of feeding untreated, pasteurized and acidified waste milk and bunk tank milk on the performance, serum metabolic profiles, immunity, and intestinal development in Holstein calves, *J Anim Sci Biotechnol*. 2017 Jun 1;8:53. doi: 10.1186/s40104-017-0182-4. eCollection 2017. 5. Божич А., Звекич Д., Физиологија домаћих животиња, Нови Сад, 2017. 6. Јовановић Р., Симовић Б., Милојић М., Сточарство са исхраном, Београд, 2006. 7. Стојић РВ, Ветеринарска физиологија, Београд, 2010. 8. Ћутук Р., Радојичић Б., Захировић А., Синановић Н., Болести пробавног система преживара, Сарајево, 2011. 9. Уремовић З., Говедарство, Загреб, 2004.

МЕТАБОЛИЧКИ АСПЕКТИ РЕПРОДУКТИВНЕ ЕФИКАСНОСТИ ЈУНИЦА*

METABOLIC ASPECTS OF REPRODUCTIVE EFFICIENCY IN HEIFERS

*Иван Галић, Недим Захировић, Ивана Лакић,
Марко Р. Цинцовић, Иван Станчић, Бојан Тохол*

Департман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду

*Рад је резултат пројекта TR31062

Кратак садржај

Репродуктивна ефикасност јуница повезана је са телесним прирастом, метаболичким статусом и сазревањем ендокринолошких оса у организму. Телесни прираст значајно зависи од концентрације IGF-I у колоструму. Телесна кондиција може утицати на особине везе хипоталамус-хипофиза-полни органи. Присуство масти и позитиван енергетски биланс је показао позитивну везу са репродуктивним особунама укључујући и постизање полне зрелости као и успостављање редовног еструса након телјења. Лошија конституција позитивно утиче на продужетак анеструса. Инсулин као значајан антилиполитички хормон на еструс утиче позитивно преко хипоталамуса и есенцијалних аминокиселина неопходних за синтезу неуротрансмитера, који утичу на секрецију GnRH. Гојазност код цикличних јуница доводи до инсулинске резистенције тако да је инсулински одговор на тест оптерећења глукозом већи код гојазних јуница у односу на јунице слабије телесне грађе, али је одговор глукозе на тест оптерећења инсулином био слабији. Промене које настају током еструса одражавају се на метаболички и хематолошки профил код јуница, па могу бити један од индикатора еструса.

Кључне речи: јунице, репродуктивна ефикасност, метаболички статус, инсулинска резистенција.

Телесни пораст и ендокринолошка адаптација код јуница

Колострум има велики значај у порасту телади и касније јуница, што је у вези са концентрацијом инсулин-сличног фактора раста 1. Највећа концентрација инсулин растућег фактора 1 (IGF-I) у колоструму је присутна непосредно након телјења, и временом се смањује. У првих неколико дана лактације концентрација IGF-I је неколико пута нижа у односу на концентрацију у колоструму (1). IGF-I утиче на развој и функционалну способност гастроинтестиналног тракта (GIT) регулишући ћелиску пролиферацију GI- ћелија и повећавајући њихов интестинални раст (2). Цео процес је контролисан присуством IGF-I рецептора на различитим местима на цревима. IGF-I рецептори су локализовани на субмукози желуца, али такође могу бити локализовани и на танким цревима и криптама ентероцита. Крипте ентероцита преставаљају унутрашње наборе дела епителијума око цревних ресица. IGF-I рецептори такође постоје и на осталим ћелијама мукозе као и на дебелом цреву (1). Узимање колострума утиче на везивање IGF-I. Теле старости осам дана које је у прва три дана живота примило колострум, има већу способност везивања IGF-I поредећи га са животињом које је храњено заменама за млеко. Такође, теле које је унело колострум у току првих дана по рођењу, има већу концентрацију глукозе у плазми у односу на теле које је храњено заменама за млеко (3). Ово указује да колострум има позитиван ефекат на телесни развој, а такође показује и позитиван ефекат на активност IGF-I. Истраживачи (4) су показали да је концентрација IGF-I код телади у периоду пре постизања полне зрелости била слична као код јединке у старости од једног до шест месеци, а такође је и у позитивној вези са телесном масом старосне доби од шест месеци.

Телесна кондиција може утицати на особине везе хипоталамус-хипофиза- полни органи (5). Присуство масти у организму је показало позитивну везу са репродуктивним особинама укључујући и постизање полне зрелости (6) као и успостављање редовног еструса након тељења (7). Биомаркери специфични за метаболизам масти (чије се концентрације повећавају у експесним ситуацијама) као што су неестерификоване масне киселине (НЕФА) и бетахидроксибутират (БХБ), показују негативан утицај на репродуктивну ефикасност крава (8). Лошија конституција позитивно утиче на продужетак анеструса. Повећана концентрација биомаркера као што је СК, може сугерисати повећан метаболизам у мишићном ткиву (9). Такође је утврђено да старосна доб може утицати на количину масног ткива у организму (10), и на метаболички профил (11). Енергетске промене које су присутне у различитим фазама еструса (12) сугеришу да су индикатори енергетског метаболизма као што је *residual feed intake* (RFI - индекс који се користи за израчунавање ефикасности исхране код говеда у фази раста) битни за разумевање основа настанка еструса.

Многобројне студије су показале да су телесна маса и постизање полне зрелости строго повезаности. Једна студија је показала повезаност између анорексије и смањења концентрације естрогена (13). У другој студији су пацови подељени у две групе, једна група је храњена високоенергетским хранивима, док је друга група храњена храном са мањом концентрацијом енергије. Први еструс се код обе групе јавио када су имале приближно исту количину телесних масти, али се јавио у различитим временским интервалима, због разлика у исхрани и времена потребног да се депонују телесне масти. Овакви резултати указују на то да депони телесних масти утичу на појаву овулације (14). У другој студији (15) је показано супротно. Група мишева је подељена у три групе, једна група која је подвргнута физичком напору, друга је храњена са рестриктивном исхраном, а трећа је била контролна група. У огледу су мерени телесна маса, стопа раста и депо телесних масти. Резултати су показали да ниједан од испитиваних параметара није у вези са настанком овулације. Масно ткиво може метаболирати масти у стероидне хормоне, а такође утиче и на глобулин везујући полни хормон. Мишљења су да због оваквих промена настаје овулација. Али пошто је концентрација естрогена продукованог из масног ткива ниска, нема доказа који потврђују да телесне масти директно утичу на овулацију (16). Једино што показује утицај на постизање полне зрелости је укупан енергетски биланс. Огледи у којима је гликолиза и оксидација масних киселина инхибирана показују да њихов недостатак директно блокира еструсни циклус. Инсулин на еструс утиче позитивно преко хипоталамуса и есенцијалних аминокиселина неопходних за синтезу неуротрансмитера (норепинефрина и серотонина), који утичу на секрецију GnRH. GnRH а они утичу на повећање концентрације LH. (16). Да доступност прекурзора и инсулина утиче на активност хормона одговорних за настанак еструса потврдила је и студија која показује повећање концентрације LH у крви која садржи инсулин, глукозу и аминокиселине. Студија (17) показује да је ниска телесна маса у корелацији са ниском стопом фертилизације. Додавањем више енергије и протеина проценат зачећа расте за 42% до 72%. Позитивна веза између количине унете хране и активности репродуктивних хормона показује да недовољан унос хране нарушава репродуктивни хормонски циклус.

Код јуница полна зрелост настаје у периоду између девет и једанаест месеци (18) зато што хипоталамус стимулише продукцију гонадотропног рилизинг хормона, (GnRH), који стимулише повећање концентрације лутеинизирајућег хормона (LH) и фликулостимулирајућег хормона (FSH). Повећање концентрације LH и FSH стимулише јајнике на продукцију естрогена и прогестерона, што последично стимулише повећање секреције хормона раста. Током пубертета долази до интензивног телесног раста, што је индиректно контролисано са LH и FSH (19). Недостатак LH and FSH може настати због недовољног уноса хране и може довести до смањења концентрације естрогена и успореног раста. Секреција естрогена је стабилна онда када је енергетски биланс позитиван (20). Телесна маса у периоду достизања полне зрелости је различита и зависи од расе, нпр. Јунице Холштајн расе имају телесну масу од 245 kg, а јунице Шведског црвеног говечета (SRB) имају телесну масу од 260 kg (21). Интензитет исхране одређује старост јуница током првог тељења. Истраживачи (22) показују да су јунице код којих је дневни прираст био од 680 г/дану имале прво тељење са старошћу од 24,5 месеци, што иначе представља оптимум. Међутим, повећан интензитет исхране резултирао је и већим дневним прирстом од 940 г/дану а

старост при првом тељењу је смањена на 21 месец. Оптимална старост за прво тељење од 24,5 месеци је индивидуална и зависи од расе. За Холштајн расу старост би требало да буде већа у поређењу са SRB.

Истраживачи (23) су испитали утицај гојазности на метаболизам инсулина и глукозе у полном циклусу. Мерене су концентрације инсулина, глукозе, тироксина (T4), тријодтиронина (T3), естрадиола-17 β (E) и прогестерона (P) у серуму 50 јуница које у биле у еструсу и 73 диеструсне јунице. Код јуница Холштајн расе инсулински одговор на тест оптерећења глукозе био је присутан код 7 гојазних и 7 мршавих диеструсних јуница. Базална концентрација глукозе, T4, T3, E (естрогена) P (прогестерона) није била у вези са степеном гојазности иако су концентрације глукозе T4 и T3 биле веће (P<.05) у еструсу и диеструсу. Базална концентрација инсулина у еструсу и диеструсу је била у позитивној корелацији ($r = .6$; P<.001) што се слаже са стањем гојазности али је корелација била другачија између еструса и диеструса код мршавих крава (P<.001). Постојала је интеракција (P<.001) између телесне кондиције и еструса на базалну концентрацију (mean \pm SE) инсулина, са разликама у нивоу инсулина (μ U/ml) између 12 гојазних и 12 мршавих јуница у диеструсу (11.7 ± 1.3 vs $6.7 \pm .6$; P<.05) повећавајући се током еструса (21.9 ± 2.4 vs 10.8 ± 1.3 ; P<.001). Инсулински одговор на тест оптерећења глукозом је био већи код гојазних јуница у односу на јунице слабије телесне грађе. Гојазне јунице имају слабији одговор на инсулин, јер су хиперинсулинемија и еугликемија коегзистирали. Фракционо уклањање глукозе је било исто упркос већој концентрацији инсулина код гојазних јуница. Гојазност код јуница је повезана са инсулинском резистенцијом, базалном хиперинсулинемијом и већом глукоза индикованом секрецијом инсулна.

Метаболичке и хематолошке промене у еструсу

Поред различитих метода за детекцију естрауса (24), еструс је могуће идентификовати путем метаболичког профила. Предходне студије показују везу између метаболита крвне плазме и степена репродуктивне ефикасности јуница (25), као што је доказана већа концентрација са додатком фосфора током трајања еструса. Биологија еструса је боље разумљива уколико се проучи веза између метаболита плазме током трајања еструса, телесне масе, старосне доби и количине и састава хране. Током еструса постоје метаболичке промене које припремају репродуктивни тракт за улазак у еструс (26). Повећање концентрације натријума у серуму има позитиван утицај на стопу концентрације код јуница (25). Такође, повећање концентрације калцијума има позитиван ефекат на еструс (27). Ензими као што је (СК) су специфични за мишићно ткиво (9), и повећање њихове концентрације се доводи у везу са мишићном активношћу (28). Повећање концентрације ALP у серуму током еструса је повезано са повећањем изоформе ALP у утерусу. Маркери енергетског статуса бета-хидрокси-бутирична киселина (BHBA) су у позитивној вези са енергетским уносом током еструса код оваца (29). Тријодтиронин (T3) показује утицај на репродукцију тако што утиче на фоликулостимулирајући хормон који стимулише амплификацију и диференцијацију гранулоза ћелија током оулације код жена (30). Поред тога (T3) утиче и на метаболичке промене (31) сличне оним које су забележене током еструса. Ензими као што су ALP, аспартатаминотрансфераза (AST), креатин киназа (СК), гамаглутамилтрансфераза (GGT), глутамат дехидрогеназа (GLDH), утичу на одржавање енергетског метаболизма. Одређене студије показују повезаност између концентрације циркулишућих ензима и искористиљивости хране код говеда. Алкална фосфатаза катализује ослобађање неорганског фосфора из фосфатних естара и присутна је у многим ткивима које продукују различите изоформе овог ензима (јетра, кости, плацента) у зависности од метаболичког статуса (32). Потврђено је да ALP може утицати на транспорт холина (34) и фосфата (33) кроз ћелиску мембрану. Студије су показале индиректну везу између ALP и уноса хране (35) и прираста код говеда (36). Физиолошки статус такође може утицати на концентрацију циркулишућег (ALP). Током гравидитета утерус продукје плацентарну изоформу ALP (37), чија концентрација наставља да расте како гравидитет напредује (38) У огледу (39) је приказано да је ниво GLDH код гравидних јуница сличан новоу урее, а повећана концентрација урее се може повезати са смањењем катаболизма аминокиселина у циљу обезбеђивања доступних аминокиселина за раст и развој фетуса. Повећање концентрације СК може се повезати са бихевиоралним променама које су присутне током еструса (26). Већа

концентрација СК може указати на веће енергетске потребе мишићног ткива да подржи бихевиоралне промене присутне у еструсу. Присутне бихевиоралне промене стимулишу синтезу фосфокреатина посредством СК. Све ово указује на то да се СК може сматрати показатељем ефикасности исхране током еструса као и потенцијалним индикатором репродуктивне ефикасности.

Истраживачи (40) су показали да хематолишки профил може допринети лакшој детекцији еструса и пружити више информација за даљу карактеризацију биолошких промена током еструса. Код 107 јуница је посматрано понашање током трајања еструса, два пута дневно током 124 дана. Мерен је унос хране и продуктивне (телесна маса и сатав) особине, а унос хране је мерен преко остатака хране која није искоришћена (kg DM/day). Узорци крви су узимани када су регистровани видљиви знаци еструса, и узорковање је вршено на сваких 30 ± 2 дана. Сматра се да су јунице биле у еструсу ($n=1$) када је концентрација прогестерона у плазми била <0.6 ng/ml. Методом најмањих квадрата поређени су метаболички параметри код еструсног и не-еструсног статуса унутар еструсне групе. Јунице у еструсу показују веће концентрације алкалне фосфатазе, аспартат аминотрансферазе (AST), бетахидроксибутерне киселине, креатин киназе (СК) и тријодтиронина (Т3) за разлику од јуница које нису у еструсу. Јунице у еструсу показују нижу осмоларност и концентрацију калцијума, натријума и укупних протеина, за разлику од јуница које нису у еструсу. Млађе (и мање) јунице имају веће концентрације СК, гама глутамил трансферазе (GGT), глукозе и натријума у односу на старије јунице. Јунице са мањом концентрацијом масти имају већу осмоларност и концентрацију холестерола СК, фосфора, натријума и мању концентрацију нивоа Т3. Искористљивост хране има велики утицај на ниво AST, холестерола и GGT. Параметри метаболичког профила могу бити корисни у процени детекције еструса, али је потребно и узети у обзир и старост јединке, степен искористљивости хране као и телесну масу и проценат депонованих масти.

Литература

1. Burrin, D.G. (1997). Is milk-borne insulin-like growth factor-I essential for neonatal development? *The Journal of nutrition*, 127(5), 975S-979S.
2. Bühler, C., Hammon, H., Rossi, G. L., Blum, J.W. (1998). Small intestinal morphology in eight-day-old calves fed colostrum for different durations or only milk replacer and treated with long-R3-insulin-like growth factor I and growth hormone. *Journal of animal science*, 76(3), 758-765.
3. Blum, J.W. & Hammon, H. (2000). Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science*, 66(2), 151-159.
4. Wathes, D.C., Fenwick, M., Cheng, Z., Bourne, N., Llewellyn, S., Morris, D. G., Fitzpatrick, R. (2007). Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*, 68, S232-S241.
5. Pradhan R and Nakagoshi N (2008) Reproductive disorders in cattle due to nutritional status. *Journal of International Development Cooperation* 14, 45-66.
6. Brooks AL, Morrow RE, Youngquist RS (1985) Body composition of beef heifers at puberty. *Theriogenology* 24, 235-250.
7. Short RE and Bellows RA (1971) Relationships among weight gains, age at puberty and reproductive performance in heifers. *Journal of Animal Science* 32, 127-131.
8. Ospina PA, Nydam DV, Stokol T and Overton TR (2010) Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science* 93, 1596-1603.
9. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T (2006) Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. Biochimica et Biophysica Acta* 1762, 164-180.
10. Brody S (1945) Bioenergetics and Growth with Special Reference to the Efficiency Complex in Domestic Animals (Hafner Press).
11. Doornenbal H, Tong AKW, Murray NL (1988) Reference values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation. *Canadian Journal of Veterinary Research* 52, 99-105.
12. Parker GC, McKee ME, Bishop C and Coscina DV (2001) Whole-body metabolism varies across the estrus cycle in Sprague-Dawley rats. *Physiology & Behavior* 74, 399-403.
13. Sutherland, R., Mešter, J. & Baulieu, E.E. (1977). Tamoxifen is a potent 'pure' anti-oestrogen in chick oviduct. *Nature*, 267(5610), 434-435.
14. Frisch, J. E., & Vercoe, J. E. (1977). Food intake, eating rate, weight gains, metabolic rate and efficiency of feed utilization in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred cattle. *Animal Science*, 25(3), 343-358.
15. Bronson, F. H., Perrigo, G. (1987). Seasonal regulation of reproduction in muroid rodents. *American Zoologist*, 27(3),

929-940. **16.**Manning, J. M., Bronson, F. H. (1991). Suppression of puberty in rats by exercise: effects on hormone levels and reversal with GnRH infusion. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 260(4), R717-R723. **17.**Lanyasunya, T. P., Musa, H. H., Yang, Z. P., Mekki, D. M., & Mukisira, E. A. (2005). Effects of poor nutrition on reproduction of dairy stock on smallholder farms in the tropics. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(2), 117-122. **18.**Sejrsen, K., & Purup, S. (1997). Influence of prepubertal feeding level on milk yield potential of dairy heifers: a review. *Journal of animal science*, 75(3), 828-835. **19.**Thompson, L. D. (2012). *Head and Neck Pathology E-Book: A Volume in the Series: Foundations in Diagnostic Pathology*. Elsevier Health Sciences. **20.**Durrell, W.B. (1955). Anoestrus in heifers associated with plane of nutrition. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 19(5), 144. **21.**Karlsson, A., & Dieden, K. (2007). Effekter av olika tillväxthastigheter under kalvperioden. **22.**Van Amburgh, M.E., Galton, D.M., Bauman, D.E., Everett, R.W., Fox, D.G., Chase, L.E., Erb, H.N. (1998). Effects of three prepubertal body growth rates on performance of Holstein heifers during first lactation. *Journal of Dairy Science*, 81(2), 527-538. **23.**McCann, J.P., Reimers, T.J. (1986). Effects of obesity on insulin and glucose metabolism in cyclic heifers. *Journal of animal science*, 62(3), 772-782. **24.**Roelofs JB, Van Erp-van der Kooij E (2015) Estrus detection tools and their applicability in cattle: recent and perspectival situation. *Animal Reproduction Science* 12, 498-504. **25.**Small JA, Charmley E, Rodd AV and Fredeen AH (1996) Serum mineral concentrations in relation to estrus and conception in beef heifers and cows fed conserved forage. *Canadian Journal of Animal Science* 77, 55-62. **26.**Ball PJH and Peters AR (2007) The ovarian cycle. In: *Reproduction in Cattle*. Blackwell Publishing Oxford, pp. 40-55. **27.**Hugentobler SA, Morris DG, Sreenan JM and Diskin MG (2007) Ion concentrations in oviducts and uterine fluid and blood serum during the estrus cycle in the bovine. *Theriogenology* 68, 538-548. **28.**Kenny FJ and Tarrant PV (1988) The effect of oestrus behaviour on muscle glycogen concentration and dark-cutting in beef heifers. *Meat Science* 22, 21-31. **29.**Fernández-Foren A, Abecia JA, Vázquez MI, Forcada F, Sartore I, Carriquiry M, Meikle A and Sosa C, 2011: Food restriction in sheep : response endocrine - metabolic body reserves as dependent. *ITEA* 107, 257-271. **30.**Maruo, T.A.K.E.S.H.I., Matsuo, H.I.R.O.Y.A., Murata, K.A.Z.U.O., Mochizuki, M.A.T.S.U.T.O. (1992). Gestational age-dependent dual action of epidermal growth factor on human placenta early in gestation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75(5), 1362-1367. **31.**Villanueva I, Alva-Sánchez C and Pacheco-Rosado J (2013) Review Article. The role of thyroid hormones as inducers of oxidative stress and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 1-15. **32.**She QB, Mukherjee JJ, Huang JS, Crilly KS and Kiss Z (2000) Growth factor-like effects of placental alkaline phosphatase in human fetus and mouse embryo fibroblasts. *FEBS Letters* 469, 163-7. **33.**Corathers SD (2006) Focus on diagnosis: the alkaline phosphatase level: nuances of a familiar test. *Pediatric Review* 27, 382-384. **34.**Milne EM (1985) The diagnostic value of alkaline phosphatase in canine medicine: a review. *Journal of Small Animal Practice* 26, 267-278. **35.**Richardson EC and Herd RM (2004) Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 2. Synthesis of results following divergent selection. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 431-440. **36.**Walawski K, Majewski A, Lenzy Z, Dabrowska MJ and Ruszczynska B (1980) Relationship between the polymorphism and activity of alkaline phosphatase in the blood serum and the rate of growth in young black-and-white cattle. *Genetica Polonica* 21, 195-201. **37.**Cheung J (2007) 'Amniotic fluid alkaline phosphatase as a biomarker of fetal growth and development.' MSc thesis, McGill University, Montreal. **38.**Yokus B and Cakir UD (2006) Seasonal and physiological variations in serum chemistry and mineral concentrations in cattle. *Biological Trace Element Research* 109, 255-266. **39.**Gonano CV, Montanholi YR, Schenkel FS, Smith BA, Cant JP, and Miller SP (2014) The relationship between feed efficiency and the circadian profile of blood plasma analytes measured in beef heifers at different physiological stages. *Animal* 10, 1-15. **40.**Crane, E. M., Munro, J. C., Bourgon, S. L., Diel de Amorim, M., Ventura, R., Fredeen, A. H., Montanholi, Y.R. (2016). Metabolic blood profile of beef heifers during oestrous and non-oestrous states. *Reproduction in domestic animals*, 51(5), 819-826.

УТИЦАЈ СТАРОСТИ, ХЕМОЛИЗЕ, СТРЕСА И ЗДРАВЉА НА ВРЕДНОСТ
ХЕМАТОЛОШКИХ ПАРАМЕТАРА КРАВА*

*INFLUENCE OF AGE, HEMOLYSIS, STRESS AND HEALTH STATUS ON HEMATOLOGY
PARAMETERS IN DAIRY COWS*

*Бранислава Белић, Марко Р. Цинцовић, Ивана Лакић,
Сандра Николић, Славиша Ђокић*

Департаман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду

*Рад је део пројекта TR31062 и TR31095

Кратак садржај

Хематолошке анализе представљају неизоставан дијагностички чинилац код говеда. У овом раду приказани су резултати оригиналних истраживања аутора који се односе на хематолошке параметре и њихове промене услед деловања различитих фактора. Приказан је утицај периода лактације и старости јединке на вредност хематолошких параметара, утицај хемоллизе као преаналитичког фактора, утицај инфламације, утицај метаболичких болести и метаболичког стреса, утицај топлотног стреса и посебно је описан утицај односа неутрофила и лимфоцита у раној предикцији искључивања крва из производње.

Кључне речи: хематологија, краве, стрес, инфекција, старост, хемолиза.

Увод

Хематолошке анализе преставаљају неизоставан дијагностички чинилац код говеда. Постоји већи број особености хематопоезног система говеда у односу на остале животињске врсте (1). Процес еритропоезе у коме долази до стварања зрелих еритроцита траје 7-8 дана. Код паса, мачака, свиња и говеда у току физиолошке еритропоезе, дневно се производи 6×10^{11} еритроцита, који садрже око 7g хемоглобина. Концентрација хемоглобина је већа код паса (120-180 g/L), који су активнији него код преживара-говеда (80-140 g/L) и мачака, који су мање активни. Степен ухрањености и старост говеда могу бити повезани са концентрацијом хемоглобина и вредностима еритроцитних индекса. Неутрофилију изазивају и повишене концентрације глукокортикоида, као и ендотоксини, првенствено због тога што убрзавају излазак неутротила из резерви у костној сржи и из маргиналних депоа, а смањују излазак неутрофила из циркулације. Код говеда се неутрофилни одговор разликује од неутрофилног одговора код коња, паса и мачака. Велики преживари имају мањи број неутрофилних прекурзорских ћелија у односу на наведене животињске врсте и сам процес гранулопоезе траје дуже. Због тога они не одговарају брзо на инфламаторне стимулусе. Углавном се промени однос неутрофили : лимфоцити, на рачун смањења броја лимфоцита. Неутрофилија не изазива никакве клиничке знаке, а понекад, повећан број полиморфонуклеара може пролазно да затвори лумен крвних судова и изазове исхемију.

Утицај периода лактације и старости

Период лактације и старост животиња показује значајан утицај на морфолошке карактеристике еритроцита, а у мањој мери и померање дистрибуције фреквенције вредности осталих хематолошких параметара (2,3). Испитивани су хематолошки параметри код 40 крва Холштајн-Фризијске расе. Краве су биле у другој и трећој лактацији. Крв је узоркована у оквиру четири основна продуктивна периода и то: у засушењу (2-3 недеље пред порођај), у постпарталном периоду (0-2 недеље постпартум), у средини лактације (15-17 недеља постпартум)

и у касној лактацији (2-3 недеље пред почетак засушења). Налаз хематолошких вредности код Холштај-фризијских на нашој територији крава одговара референтним вредностима за дату врсту. Карактеристика налаза јесте скретање броја неутрофила и лимфоцита у десно и скретање концентрације хемоглобина у лево. Ово говори у прилог изложености стресу у свакодневној производњи. Перипартални период одликује се смањеним бројем еритроцита, сниженом концентрацијом хемоглобина, смањењем укупног броја леукоцита уз пораст броја неутрофила. Сви параметри су распоређени у оквиру нормалне (Гаусове) дистрибуције.

У оглед је ушло 7 женских телаци, 7 јуница, 9 крава старости две године, 8 крава старости четири године. Крв је добијена венепункцијом вене југуларис и брзо обрађена у лабораторији. Испитивне су карактеристике размаза еритроцита који је обојен по *May-Grundwald-Giemsa* методи. Прегледом са градуисаним окуларом нађено је да су еритроцити телаци и јуница значајно крупнији од еритроцита крава у лактацији. Анализом потенцијалног присуства анизозитозе (*Red Cell Distribution Width - RCDW*) показано је да је тај индекс већи код телаци и код крава старости три године у односу на остале категорије (22%, физиолошки до 20%). Еритроцити су били равномерно пребојени, али је број еритроцита са израженијим централним просветљењем растао са старашћу крава. Испитивањем присуства измењених облика еритроцита нађено је да су спорадично присутни и то код телаци, што је физиолошки. Приликом морфометријских испитивања у обзир се мора узети фактор старости јединке.

Утицај хемоллизе

Хемолиза је најзначајнији преаналитички фактор који значајно утиче на хематолошке вредности код говеда (4). У једном истраживању испитали смо утицај хемоллизе на вредност хематолошких параметара у крви крава у раној лактацији. У оглед је укључено 45 узорак крви крава у раној лактацији, тако да код 15 узорака није постојала хемолиза, код 15 је детектована умерена хемолиза (наранџасто до црвено пребојавање серума), а код 15 јака хемолиза (црвено пребојавање серума). Утицај хемоллизе испитан је одређивањем бијаса (%) и помоћу Wilcoxon-овог теста ранга. Резултати показују да у хемолизираним узорцима опада вредност хематокрита (HCT), број еритроцита и њихова средња запремина, а расте вредност MCH и MCHC индекса као и број тромбоцита. Укупан број леукоцита показује тренд опадања. Концентрација хемоглобина је била непромењена упркос различитим визуелним показатељима хемоллизе. Варирање вредности биохемијских параметара је значајно слабије уколико постоји умерена хемолиза, док значајније варирање постоји код изразито јаке хемоллизе.

Утицај здравственог статуса

У уводу су већ наведене соновне карактеристике еритропоезе и леукопоезе код говеда. Најчешћи здравствени проблеми у виду инфламације утеруса и вимена, заједно са променама у метаболизму значајно мењају крвну слику код крава у раној лактацији (5,6).

Циљ једног нашег истраживања био је да се испита крвна слика и концентрација НЕФА код здравих крава и крава са маститисом и метритисом у недељи пре и после партуса. Телјење је показало сигнификантан утицај на вредности испитиваних параметара, тако да после телјења постоји следећи налаз: смањен број еритроцита, снижена концентрација хемоглобина, смањен број леукоцита са релативним порастом процента неутрофила и сниженим процентом лимфоцита (стресни леуограм) и повећање концентрације НЕФА. Овакав налаз је постојао и код здравих и код болесних крава. Краве са упалом материце (у односу на контролу) показују значајно нижи број еритроцита како у периоду пре телјења тако и после, док је значајно нижа концентрација хемоглобина постојала само у недељи после телјења. Леукоцитни профил ових крава се карактерисао повишеним процентом неутрофила у недељи после телјења и снижен проценат моноцита у недељи пре и после телјења поредећи са здравом контролом. Краве са упалом млечне жлезде показују такође повишен проценат неутрофила у недељи пре и после телјења и снижен проценат еозинофила у поређењу са здравом контролом. Концентрација НЕФА је значајно виша код оболелих крава у недељи после партуса. Предвиђање настанка метритиса је могућа и у вези је са процентом моноцита у диференцијалној белој лози и степеном анемије, док је настанак

маститиса могуће предвидети у вези са процентом еозинофила у диференцијалној белој лози у периоду око тељења.

У другом истраживању испитали смо вредности метаболичког профила, крвне слике и телесне кондиције у прве четири постпарталне недеље код здравих крава и крава са различитим перипарталним болестима. У оглед је укључено 39 крава: 15 здравих и 24 оболелих крава. Кетоза је нађена код 13 крава у комбинацији са маститисом/метритисом (10 крава) и дислокацијом абомасума (3 краве). Ретенција палценте са метритисом постојала је код 8 крава, а код 3 краве је нађена комбинација дислокације сиришта и јаке шепавости. Код 13 од 24 оболелих крава дијагностикована је кетоза, која је била у комбинацији са маститисом и метритисом (код 10 крава) и са дислокацијом абомасума (код 3 краве). Краве са здруженим перипарталним болестима имају значајно вишу концентрацију НЕФА, БХБ, билирубина, АСТ и број неутрофила у прве четири постпарталне недеље. Концентрација глукозе, албумина, урее, калцијума и холестерола је била нижа код болесних крава. Хематолошки профил оболелих крава одликовао се нижим бројем еритроцита и лимфоцита уз снижену концентрацију хемоглобина. Укупан број леукоцита код болесних крава био је нижи у првој недељи после партуса, да би потом значајно порастао изнад броја утврђеног код здравих крава. Телесна кондиција оболелих крава показује интензивнији пад (0.7 : 0.4 јединице) у прве четири постпарталне недеље. У групи болесних крава нађена је значајно већа пропорција крава чије се вредности метаболичког профила и крвне слике биле изван референтних, а већи је био и губитак телесне кондиције.

Утицај перипарталног метаболичког стреса

Тељење и почетак лактације код млечних крава представља најзначајнији стресоген. Стресна реакција се развија у два правца: повећање активности надбубрежне жлезде са порастом концентрације кортизола као последица класичне стресне реакције и повећање липидне мобилизације са порастом концентрације неестерификованих масних киселина (НЕФА) као последица метаболичког стреса и повећаних енергетских потреба. Кортизол и НЕФА значајно утичу на физиологију уобличених елемената крви. Циљ једног рада (7) био је да се испита утицај кортизола и НЕФА у недељи после тељења на вредност параметара крвне слике код крава у раној лактацији. У оглед је укључено 50 крава. Крв је узета у 1,2,4 и 8 недељи после тељења. У првој недељи је одређена концентрација кортизола и НЕФА, а у свим недељама је одређена комплетна крвна слика (еритроцити, хемоглобин, леукоцити, неутрофили, лимфоцити, Н:Л однос, еозинофили, моноцити) и вијабилност леукоцита. Краве су класификоване на основу медијалне вредности кортизола и НЕФА на групу која је више оптерећена стресом (изнад медијалне вредности; кортизол Me^+ и НЕФА Me^+) и на групу која је мање оптерећена стресом (испод медијалне вредности; кортизол Me^- и НЕФА Me^-). Краве које припадају НЕФА Me^+ групи показују мањи број еритроцита, нижу концентрацију хемоглобина, мањи број леукоцита, већи број неутрофила и већи однос Н:Л у првој и другој недељи после партуса у односу на краве НЕФА Me^- групе. Краве које припадају кортизол Me^+ групи показују типичан стресни леукограм у првој недељи после тељења, па оне имају већи број неутрофила, мањи број лимфоцита, мањи број еозинофила и већи број моноцита, као и већи Н:Л однос. Код крава оптерећених метаболичким стресом (НЕФА Me^+ и кортизол Me^+) постоји нижа вијабилност леукоцита у првој и другој недељи после тељења. Стресно оптерећење крава утиче на крвну слику у првој и другој недељи после тељења. Стресно и метаболичко оптерећење крава у раној лактацији имају исти утицај на параметре крвне слике.

Кетоза је болест млечних крава која настаје као последица негативног енергетског биланса. Она се одликује порастом концентрације кетонских тела у крви. Кетонска тела изазивају стање оксидативног стреса у организму. Оксидативни стрес је израженији код крава са вишим скором телесне кондиције. У једном истраживању смо испитали (8) да ли постоји разлика у вредности еритроцитних параметра код здравих крава и крава оболелих од кетозе у функцији телесне кондиције. Доказана је статистички значајна разлика у концентрацији хемоглобина код здравих и оболелих крава ($p < 0,01$), а концентрација хемоглобина је нижа код крава са високим скором телесне кондиције ($p < 0,05$). Пронађена је виша вредност хематокрита код крава са кетозом, али није сигнификантно. Еритроцитни индекси су измењени у функцији предходно наведених

промена, али нису статистички сигнификантни. Клиничком анализом је утврђено да преко 75% кетозних крава показује пад концентрације хемоглобина, док је код 15% вредност хемоглобина остала слична, а код 10% крава је нешто виша од просека здраве контроле. Микроскопским прегледом размаза крви крава са субклиничком кетозом утврђен је пораст броја морфолошки измењених еритроцита (5:9,5%, $p < 0,05$), а расте и број еритроцита чији је дијаметар ван физиолошке вредности (RDW 3,77:6,54, $p < 0,05$). Појкилоцитоза је израженија код гојазних крава ($p < 0,05$). Анизозитоза и појкилоцитоза су у линеарној функцији са концентрацијом хемоглобина ($p < 0,01$). Овакви резултати могу бити у вези са стањем оксидативног стреса и измењеном функцијом јетре током кетозе млечних крава.

Утицај топлотног стреса

У летњем периоду на територији Војводине развијају се услови за настанак топлотног стреса код млечних крава. Индекс температуре и влажности ваздуха (ТХИ) превазилази 72, што је изван граница термонеутралне зоне за млечне краве. Топлотни стрес код млечних крава дешава се током јула и августа (ТНИ > 72).

У огледу је учествовало 10 крава у летњој и 10 крава у зимској сезони. Физички одговор: Пораст ректалне температуре и израженије диурналне варијације се могу запазити током лета (38,4:39, $p < 0,01$), а сигнификантан је и пораст респирација у минути (46,5:65, $p < 0,01$) и пад буражне контракције (10,75:5,5, $p < 0,01$). Хематологија: Током топлотног стреса долази до одређених хематолошких измена, а то су: пад броја еритроцита (7,38:6,51; $p < 0,01$), пад MCV (53,25:47,31, $p > 0,05$), пад хематокрита (39,3:30,8, $p < 0,01$), пад броја леукоцита (9,18:7,75, $p < 0,01$) и тромбоцита (425:351, $p < 0,05$). Опада и концентрација хемоглобина (111,5:107, $p > 0,05$). Хематолошке измене указују на знакове хиперхидратације, што је знак активног расхлађивања организма евапорацијом. Постоји корелација између физичког и хематолошког одговора (9).

Топлотни стрес доводи до дехидратације организма са повећањем хематокрита (30,8:39,3%; $p < 0,01$), а расте и број еритроцита. Средња запремина еритроцита показује тенденцију пораста приликом излагања топлотном стресу (53,25:47,31fl; $p > 0,05$), док концентрација хемоглобина (107:111,5g/L; $p > 0,05$) и средња вредност целуларног хемоглобина (14,5:17,13pg; $p < 0,01$) показују тенденцију смањења. Смањена концентрација хемоглобина редукује оксигенацију организма и доводи до оксидативног стреса, мада овакво стање краве компензују хипервентилацијом. Повећан хематокрит говори у прилог дехидратацији организма. Парадоксални налаз смањене концентрације хемоглобина, а повећане запремине еритроцита може да укаже или на оштећење еластичности зида еритроцита услед деловања топлоте или на хиперхидратацију еритроцита, с обзиром да није било знакова анемије. Потребно је урадити испитивања промене хидрираности плазме и еритроцита у акутном и хроничном излагању топлотном стресу, с обзиром на чињеницу да у топлотном стресу расте унос воде, који би акутно могао довести до дилуције крвне плазме, али се касније као декомпензација јавља дехидратација плазме (10).

Рана предикција искључења крава из запата помоћу односа неутрофила и лимфоцита (Н:Л или Н/Л однос)

Циљ једног нашег истраживања био је да се утврди гранична вредност и клинички значај Н:Л односа у процени искључења крава из производње у лактацији која следи (11). У току рутинског хематолошког прегледа код 114 крава 7-15 дана после партуса испитивали смо број неутрофила и лимфоцита као и однос неутрофила и лимфоцита. Гранична вредност Н:Л односа која најбоље дели краве које ће бити искључене из производње од оних које ће у производњи остати у лактацији која следи је 1,05. Ако је Н:Л однос на овом нивоу са више од 90% (специфичност 90,32) вероватноће можемо тврдити да ће краве бити касније искључене из производње. Ако је вредност Н:Л односа око 0,65 са преко 90% сигурности можемо предположити да ће краве остати у запату (сензитивност 90,92). Површина испод ROC криве је 0,751, тј. у опсегу $0,7 < AUC \leq 0,9$, што потврђује веома значајну везу између вредности Н:Л односа после партуса и искључења крава са фарме ($p < 0,01$). 72% крава са вредношћу Н:Л > 1,05 је било искључено из производње током 12 месеци, на супрот 20% искључених крава чији је Н:Л < 0,5. Однос

неутрофила и лимфоцита у раној лактацији је користан индикатор за процену ризика од искључења крава из производње.

Литература

1. Белић Б., Цинцковић М., 2015, Патолошка физиологија, Уџбеник, Департман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет Нови Сад. 2. Белић Б., Цинковић М., Крџмар Лј., Видовић В.: Reference values and frequency distribution of hematological parameters in cows during lactation and pregnancy, *Contemporary Agriculture*, 2011, Vol. 60, No 1-2, pp. 145-151; 3. Белић Б., Цинковић М., Стојановић Д., Ковачевић З.: Морфометријска својства еритроцита код крава различите старости, *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 2011, Vol. 11, No 1, pp. 111-114; 4. Цинковић, М. Р., Старић, Ј., Белић, В., Жежак, Ј., & Лаквић, И. (2016). Influence of Blood Sample Hemolysis on Hematological and Biochemical Parameters in Cows During Early Lactation. *Contemporary Agriculture*, 65(3-4), 39-43; 5. Белић Б., Цинковић М., Давидов И., Лаквић В., Потконјак А., Станчић И.: Periparturient hematological finding in dairy cows with uterus and udder inflammation, *Contemporary Agriculture*, 2012, Vol. 61, No 1-2, pp. 112- 118; 6. Цинковић М., Белић Б., Радојичић Б., Тохољ Б., Станчић И., Стеванчевић М.: Periparturient metabolic profile, blood picture and body condition score in healthy cows and cows with associated periparturient disease, *Contemporary Agriculture*, 2012; 7. Цинковић М., Белић Б., Старић Ј., Жежак Ј., Ђоковић Р.: Uticaj stresnog odgovora posle teljenja na krvnu sliku krava u ranoj laktaciji, *Letopis naučnih radova*, 2017, Vol. 41, No 1, pp. 49-55; 8. Белић Б., Цинковић М., Стојановић Д., Ковачевић З., Видовић В.: Morphology of erythrocytes and ketosis in dairy cows with different body condition, *Savremena poljoprivreda, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad*, 2010; 59(3-4): 306–311; 9. Белић Б., Цинковић М., Стојановић Д., Ковачевић З., Медић С., Симић В.: Hematology parameters and physical response to heat stress in dairy cows, *Contemporary Agriculture*, 2010, Vol. 59, No 1-2, pp. 161-166; 10. Белић Б., Цинковић М., Стојановић Д., Медић С., Симић В.: Uticaj toplotnog stresa na vrednost eritrocitnih indeksa kod mlečnih krava u cilju procene hidratacije i saturacije kiseonikom, *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 2010, Vol. 10, No 2, pp. 169-171; 11. Белић Б., Цинковић М.: Odnos neutrofila i limfocita u ranoj laktaciji kao prediktivni pokazatelj isključenja krava iz proizvodnje, *Arhiv veterinarske medicine*, 2012, Vol. 5, No 1, pp. 51-58.

РАДИОНИЦЕ

РАДИОНИЦА I

ПРАКТИЧНА ПРИМЕНА УЛТРАЗВУКА У РЕПРОДУКЦИЈИ МЛЕЧНИХ КРАВА

Милан Малетић, Владимир Магаш, Милоје Ђурић

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Кратак садржај

Последњих деценија пред говедарску производњу постављају се све већи захтеви у односу на интензитет ове производње. Упоредо са тим дошло је и до пораста учесталости метаболичких, а последично и репродуктивних поремећаја здравља код високомлечних раса крава. Репродуктивни поремећаји здравља се претежно јављају код високомлечних крава које имају изразито негативан биланс енергије (НЕБ) на почетку лактације, и огледају се пре свега у функционалним поремећајима јајника и субклиничким и клиничким ендометритисима. Лоши параметри плодности код крава у интензивној производњи често су у уској корелацији са проблемима попут: анестрије, ановулације и цистичне дегенерације јајника. Ултразвучни преглед јајника и материце доприноси бољем разумевању и решавању ових проблема. Поред употребе ултразвучних апарата у дијагностици патолошких промена на репродуктивним органима, они се могу користити и у циљу праћења ефеката терапије (одговора на терапију), као и у мониторингу и дијагностици физиолошких стања (гравидитет, фоликуларни таласи итд.) репродуктивног тракта код говеда. У овој радионици биће приказани најчешћи облици функционалних поремећаја јајника и материце, као и видови терапије истих. Поред тога биће речи и о могућностима дијагностике одређених физиолошких стања (гравидитет, детекција пола и сл.).

Кључне речи: ултразвучна дијагностика, репродукција, гравидитет, цистична дегенерација, ендометритиси

1. АКТИВНОСТ (30 мин)

У оквиру прве активности полазници радионице ће се, кроз уводно предавање, упознати са основама ултразвучног прегледа, различитим могућностима примене у репродукцији, врстама апарата и сонди ултразвучног апарата, предностима ултразвучног прегледа у односу на друге дијагностичке процедуре у репродукцији крава.

2. АКТИВНОСТ (180 мин)

Улазак у фарму, припрема ултразвучног апарата и прегледача за преглед, прилазак и фиксирање плоткиња, избор плоткиња за преглед.

-преглед крава у еуперијуму (праћење инволутивних промена на материци, цервиксу, јајницима);

-преглед крава припремљених за индукцију и/или синхронизацију еструса (преглед и утврђивање статуса промена на јајницима, предлог протокола на основу добијеног налаза)

-преглед крава на гравидитет (различита гестациона старост-од 30. до 120. дана) уз дефинисање специфичности промена на репродуктивним органима у различитој гестационој старости;

-преглед проблематичних грла (цистозне промене на јајницима, ендометритиси, цервицитиси,

ановулаторне промене на јаницима, итд) и предлози за терапију;
-преглед јуница.

3. АКТИВНОСТ (30 мин)

Након завршетка практичног рада разматраће се добијени налази и предложени протоколи.

РАДИОНИЦА II

ТЕХНИКА ОБДУКЦИЈЕ ЖИВОТИЊА

Дарко Маринковић, Милан Аничкић, Владимир Нешић

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Ветеринарска патологија је део патологије која је значајна грана медицинских наука (грчки Παθολογία, πάθος – патња, болест, λόγος – реч, у ширем смислу наука) која се бави болестима. Она се у ширем смислу бави проучавањем природе обољења, а представља везу и синтезу базичних грана медицине (анатомија, хистологије, микробиологија, имунологија, паразитологија, физиологија, патофизиологија и др.) и клиничке медицине са циљем изучавања структурних и функционалних промена у ћелијама и ткивима органа или органских система у оквиру одређених обољења. Главне области ветеринарске патологије су патолошка анатомија и патолошка хистологија.

Обдукција или некропсија представља методу биолошког и медицинског истраживања и уједно основна метода у оквиру патологије као медицинске гране. Она се дефинише као планско отварање и систематски преглед леша с циљем утврђивања, проучавања и објашњења патолошко-анатомских промена на основу којих треба донети закључак о узроку смрти или постојању болести. На основу ове дефиниције може се закључити да је основни циљ обдукције утврђивање патолошких промена на органима, као и утврђивање значаја и повезаности ових промена са одређеним болесним стањима.

У оквиру хумане медицине обдукцијом се баве искључиво специјалисти патологије и судске медицине. За разлику од хумане медицине, обдукције поред специјалиста ветеринарске патологије често обављају и ветеринарски форензичари, специјалисти епизоотиологије, а по потреби и ветеринари на терену. У оквиру практичне наставе из патологије на Факултету ветеринарске медицине, током основних студија студенти се упознавају и савлађују технику обдукције животиња. Али и поред интензивне едукације током студирања стиче се утисак да ветеринари на терену недовољно владају обдукционом техником. Ова чињеница може бити један од основних разлога што се обдукција ван факултета и ветеринарских института не обавља на прави начин, обавља се ретко или се не обавља уопште иако је значајан фактор у дијагностици и сузбијању болести, као и у смањењу штета нарочито у интензивном гајењу животиња.

Упознавање са материјом (активност 1)

Теоретско предавање о дефиницији, врстама обдукције, типовима егзентерације органа, месту и времену вршења обдукције, прибору за извођење обдукције, основним принципима обдукционог рада, мерама опреза, деловима обдукције, постморталним променама и дескрипцији промена које се током обдукције запажају на органима.

Практичан рад (активност 2)

Током практичног дела радионице, полазници ће имати прилику да се упознају са техником обдукције животиња приликом демонстрационе обдукције овце/телета. Полазницима радионице биће омогућено да се током демонстрационе обдукције упознају са редоследом и техником обдукције. Такође, упознаће се са начином прегледа и макроскопским карактеристикама органа. Биће истакнути детаљи прегледа солидних органа - положај, облик, величина, боја органа (и промена на органима), конзистенција као и унутрашња грађа органа, као и начина дескрипције уочених промена. Код прегледа луминозних органа - дигестивног, респираторног и урогениталног система као и крвних судова обратиће се пажња на детаље прегледа поменутих органа – њихову

ширину, количину и карактеристике садржаја у њиховом лумену, као и њихову унутрашњу страну (слузница или интима, зависно од врсте органа). Посебна пажња биће обрађена на препознавање постморталних промена и њихово разликовање од заживотних патоморфолошких промена. Полазницима радионице биће демонстрирано узорковање и адекватно паковање органа за хистопатолошки преглед.

Интерактивна учионица (активност 3)

Након завршетка практичног рада критички ће се разматрати и коментарисати резултати обављене обдукције.

Провера ефективности (активност 4)

На крају радионице сваки од полазника ће добити тест са 10 питања кроз која треба да покаже усвојена знања у вези са дефинисањем и врстама обдукције, обдукционом техником, типовима егзентерације органа, основним принципима обдукционог рада, постморталним променама и дескрипцији промена које се током обдукције запажају на органима (минималан број тачних одговора је 6 од укупно 10 питања).

Остали релевантни подаци

Број наставника који ће учествовати у извођењу радионице: Дарко Маринковић, ванредни професор, Милан Аничих, асистент, Владимир Нешић, ванредни професор, Катедра за патолошку морфологију и Катедра за судску ветеринарску медицину и законске прописе, Факултет ветеринарске медицине, Београд

Фаза и место реализације

Активности 1 и 4 је могуће спровести у предаваоници Хотела Палисад на Златибору.

Активности 2 и 3 је могуће спровести у Ветеринарској станици „Дими вет“ у Мачкату.

РАДИОНИЦА III

ЦИСТОСКОПИЈА КОД ПАСА

Иван Јевтић¹, Вања Крстић², Маја Васиљевић², Борис Перих³

¹Ветеринарска амбуланта ИВАБЕТ,

²Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

³Ранекс, KARL STORZ

Увод

Болести уринарног тракта су чест проблем код паса. За дијагностиковање ових болести користимо клинички преглед и дијагностичке методе као што су хематолошке и биохемиске анализе крви, физичко хемиски преглед урина, преглед уринарног седимента, микробиолошки преглед урина, рентгенско снимање и ултразвучни преглед абдомена. Ове анализе понекад не могу дати коначну дијагнозу. У дијагностиковању болести ових органа све чешће се користи ендоскопско испитивање уретре и мокраћне бешике, чиме нам је омогућена добра визуализација и могућност добијања тачне дијагнозе.

Упознавање са материјом (активност 1)

Обновите кратко предавање са анатомском грађом уринарног тракта, физиологијом и патологијом уретре и мокраћне бешике.

1. Индикације

Најчешће индикације за ендоскопски преглед уретре и мокраћне бешике су:

- Уринарна инконтиненција
- Полиурија
- Хематурија
- Болност код уринирања
- Повратне инфекције уринарног тракта
- Сумња на стенозу уретре
- Хроничну упалу мокраћне бешике
- Сумња на уролите
- Сумња на дивертикулум мокраћне бешике
- Код повреде уретре и мокраћне бешике
- Код крварења из урогениталног тракта које није повезано са мокрењем
- Код сумњи на неопластичне туморе, полипе и цисте

2. Контраиндикације

Контраиндикације за уретроцистоскопију обично су повезане са контраиндикацијама за анестезирање паса и то су

- Низак хематокрит
- Значајно повећана активност јетриних ензима
- Високе концентрације уреје и креатинина
- Поремећај кардиоваскуларног система
-

Упознавање са опремом (активност 2)

Упознати колеге са комплетном опремом неопходном за извођење ендоскопских процедура на уринарном тракту. Објаснити специфичности ригидних и флексибилних цистоскопа. За уретроцистоскопију могу се користити два типа цистоскопа и то:

- Флексибилни - промера су 3мм (за мужјакe и женке малe и средње расe) и 5 мм (за жене великих раса), имају флексибилну главу која се може савијати у свим правцима, изазива мању трауму приликом прегледа.
- Ригидни - користе се код женки. Недостатак је смањена визуелизација због њихове крутости па чини преглед тежим. На тај начин може доћи до озледа током испитивања.

Врло је битно да и један и други имају радни канал који омогућава да употребом одговарјуће опреме можемо узети материјал за додатно испитивање (биопсија или цитологија)

Практичан рад (активност 3)

Током практичног дела радионице, учесници ће имати прилику да се упознају са поступком увођења цистоскопа у уретер, праћење уретралног канала, улазак у мокраћну бешику и прегледа унутрашњости бешика.

Интерактивна учионица (активност 4)

Након завршеног практичног дела обавиће се консултације са учесницима и коментарисати саму процедуру.

Провера ефективности (активност 5)

На крају радионице сваки од учесника добиће тест са 10 питања кроз који треба да прикаже усвојена знања о самој процедури, као и о познавању опреме неопходне за њихово извођење.

Остали релевантни подаци

Очекивани број учесника максимално 40. Број наставника који ће учествовати у извођењу радионице: Иван Јевтић (Ветеринарска амбуланта ИВАБЕТ), Вања Крстић, Маја Васиљевић, (Факултет ветеринарске медицине, Универзитета у Београду), Борис Перић (KARL STORZ)

Фаза и место реализације

Активности 1, 2, 4 и 5 могуће је спровести у предаваоници, а активност 3 је неопходно спровести у посебно обезбеђеном простору због увођења пса у седацију и извођење процедуре.

РАДИОНИЦА IV

БЕЗБЕДНОСТ И КВАЛИТЕТ ТРАДИЦИОНАЛНИХ ПРОИЗВОДА ОД МЕСА

Неђељко Карабасил¹, Тамара Бошковић², Драган Василев¹, Мирјана Димитријевић¹

¹Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине

²Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде, Управа за ветерину

Увод

Производња традиционалних производа од меса на просторима Републике Србије има дугу традицију. У нашој земљи, изађују се различите ферментисане кобасице (нпр. Сремски Кулен, Лемешки кулен, Петровска клобаса и др.), као и сушени производи а међу њима су најпознатије суве шунке (нпр. Ужички пршут, Сремска шунка, Вршачка шунка и др). Повољне климатске услове за производњу традиционалних сувомеснатих производа имају регије у којима током целе године владају услови са нижом температуром, нижом релативном влажношћу и дувању сталних ветрова. Приликом израде месо се прво усољава, уситњава (за ферментисане производе од меса), а затим дими, суши и сазрева, при чему производи постају одрживи и добијају карактеристичну арому, конзистенцију и текстуру. Традиционална прерада меса није само део националне гастрономске баштине, већ је и важна економска активност за многа домаћинства која продају вишак производа на домаћем тржишту или неформалним каналима кроз „мрежу“ пријатеља и познаника. Удео ове активности је посебно висок када је у питању традиционална производња производа који су високо цењени и тражени од потрошача. Традиционални производи од меса последњих година окупирале су већу пажњу стручне јавности, како у погледу очувања квалитета, тако и у погледу њихове безбедности. Хигијена производње у свим сегментима ланца хране има значаја у добијању безбедног производа за крајњег корисника. Посебна пажња се поклања безбедности традиционалних производа од меса, с обзиром да неки од њих могу бити потенцијални носиоци зачажних опасности по здравље потрошача, од којих се посебно издвајају ботулизам код суве шунке и микотоксичне плесни, полициклични ароматични угљоводоници и ларвени облици инсеката, код сувомеснатих производа и ферментисаних кобасица. Ово је нарочито важно из угла разматрања успостављених правила националних мера за одступање од општих и посебних услова хигијене хране дефинисаних Правилником (Правилник о малим количинама примарних производа које служе за снабдевање потрошача, подручја за обављање тих делатности као и одступања која се односе на мале субјекте у пословању храном животињског порекла, Службени гласник Републике Србије, број 111/17), а односе се на „мале произвођаче“ у које се и убраја највећи број произвођача традиционалних производа од меса.

Приказ захтева у погледу безбедности и квалитета традиционалних производа од меса и Правилника Сл. гласник Р. Србије, број 111/17 (активност I)

У уводном делу радионица ће обухватити упознавање са параметрима безбедности и квалитета традиционалних производа од меса који су најчешће заступљени на тржишту Републике Србије, као што су ферментисане кобасице и сушени производи од меса. Такође, полазници ће се упознати са захтевима Правилника о малим количинама примарних производа које служе за снабдевање потрошача, подручја за обављање тих делатности као и одступања која се односе на мале субјекте у пословању храном животињског порекла (Службени гласник Републике Србије, број 111/17), у коме су прописани ближи услови хигијене и одступања за изградњу, уређење и опремање објеката за клање животиња и прераду меса малог обима производње и производњу традиционалних производа од меса.

Практичан рад (активност 2)

Током практичног дела радионице, полазници ће радити сензорску оцену традиционалних производа од меса. Сваки полазник ће имати задатак да користећи дескриптивну сензорну анализу, испита два узорка (1- ферментисана kobасица, нпр. Сремски кулен; 2-сушени производ, нпр. Ужичка пршута). Практичан рад ће бити организован у групама од 10 полазника и максимално 4 групе. Са сваком групом радиће један од предавача и критички разматрати сензорске параметре квалитета испитиваних традиционалних производа.

Интерактивна учioniца (активност 3)

У оквиру треће активности учесници радионице ће увежбавати, на претходно припремљеним моделима и примерима, поступке примене добре произвођачке и добре хигијенске праксе у условима традиционалне производње, као и тумачење резултата и мера које треба предузети у случају добијања незадовољавајућих резултата у односу на параметре безбедности хране и у односу на параметре хигијене у процесу производње.

Провера ефективности (активност 4)

На крају радионице сваки од полазника ће добити тест са 10 питања кроз која треба да покаже усвојена знања о безбедности и квалитету традиционалних производа.

Остали релевантни подаци

Очекивани број учесника: максимално 40 (четири групе по десет полазника). Број предавача који ће учествовати у извођењу радионице: др Неђељко Карабасил (Група 1: од 1. до 10. слушаоца), Тамара Бошковић, ДВМ, спец. хиг.и тех.нам (Група 2: од 11. до 20. слушаоца), др Драган Василев (Група 3: од 21. до 30. слушаоца) и др Мирјана Димитријевић (Група 4: од 31. до 40. слушаоца).

Фаза и место реализације

Активност 1 - реализују др Неђељко Карабасил и Тамара Бошковић, ДВМ, спец. као координатори радионице. Тамара Бошковић упознаје кандидате са *Правилником о малим количинама примарних производа које служе за снабдевање потрошача, подручја за обављање тих делатности као и одступања која се односе на мале субјекте у пословању храном животињског порекла* (Службени гласник Републике Србије, број 111/17). Драган Василев упознаје слушаоце са захтевима безбедности и квалитета традиционалних ферментисаних производа од меса, и Мирјана Димитријевић са захтевима безбедности и квалитета традиционалних сушених производа од меса. Др Неђељко Карабасил ће упознати полазнике са применом добре произвођачке и хигијенске праксе, анализи опасности и критичним контролним тачкама у објектима за производњу традиционалних производа од меса. Ова активност (1) се изводи у сали хотела Палисад, као и остале фазе радионице (2, 3 и 4).

Активност 2 и 3 - Свака група ће радити засебно др Неђељко Карабасил (Група 1: од 1. до 10. слушаоца), Тамара Бошковић, ДВМ, спец. хиг.и тех.нам (Група 2: од 11. до 20. слушаоца), др Драган Василев (Група 3: од 21. до 30. слушаоца) и др Мирјана Димитријевић (Група 4: од 31. до 40. слушаоца).

Активност 4. Сваки полазник добија тест са десет питања у вези са темом и садржајем радионице. Успешно положен тест сматра се уколико полазник оствари ≥ 7 поена.

РАДИОНИЦА V

ОТПОРНОСТ НА АНТИБИОТИКЕ
ОПШТИ АСПЕКТИ, ПРАЋЕЊЕ И ОДГОВОРНОСТ ВЕТЕРИНАРА

Душан Мишић¹, Mainguet Jean-Michel², Тамјана Лабус³

¹Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине

²Laboratoire Départemental de la Lozère Rue du Gevaudan 4800 Mende, France

³Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде, Управа за ветерину, Србија

Увод

Отпорност на антибиотици постала је глобални проблем јавног здравља и представља озбиљну претњу здрављу људи и животиња. Истовремено, то је и вишефакторски феномен заједнички за здравље људи, здравље животиња и домен животне средине при чему су антибиотици суштински важна средства за очување здравља и добробити животиња.

Болест изазвана бактеријама може се у неким ситуацијама контролисати искорењивањем, одржавањем одређеног здравственог статуса животиња, мерама биосигурности, вакцинацијом и добром хигијеном. Па ипак, антимикуробна хемотерапија и даље је од виталног значаја за лечење и спречавање болести изазваних бактеријама, у неким случајевима. Многе болести животиња изазване бактеријама потенцијално су фаталне; друге изазивају бол и патњу. Одговарајућом употребом антибиотика неке оболеле животиње ће се излечити и опоравак других ће се убрзати, а може се унапредити и добробит лечених животиња и смањити ширење инфекције на друге животиње, или, у случају зооноске болести, смањити се ширење на људе. Рационална употреба антибиотика представља изазов, уз минимизирање ризика од отпорности.

Циљ радионице биће да подсети на опште аспекте антимикуробне резистенције, као и да представи тренутно стање и текуће активности у контроли и смањивању ризика. Међуминистарска радна група тренутно финализира Национални програм и Акционе планове за борбу против отпорности на антибиотици. Први пилот програм мониторинга сачинила је Управа за ветерину заједно с твининг пројектом, и он ће се допунити како би се ускладио са захтевима Европске уније. Одржано је неколико обука за државне органе, заинтересоване стране и лабораторије. Ветеринари имају велику одговорност и њихова улога јесте не само да осигурају рационалну употребу антибиотика, већ су истовремено и важан извор информација и комуникације за пољопривреднике и друге држаоце животиња.

Састављене су и биће представљене смернице о доброј пракси за ветеринаре по питању рационалне употребе антибиотика.

Активност 1

Општи аспекти отпорности на антибиотици и улога ветеринара

Уводни део радионице садржаће опште информације о антимикуробној резистенцији, укључујући и ситуацију у земљи и иностранству. Биће представљени постојећи документи и текуће активности (Правилник о ветеринарским лековима, Национална радна група, План мониторинга, развој Смерница за рационалну употребу антибиотика). Ставиће се акценат на значајну улогу ветеринара.

Активност 2
Практичан рад

У практичном делу радионице, учесници ће радити у 4 групе, на различитим студијама случаја везано за антимикуробну резистенцију.

Чланови група ће анализирати расположиву документацију и лабораторијске резултате, радиће на тумачењу антибиограма и предложати даљи ток лечења и друге мере.

Група 1 – кућни љубимци / коњи
Група 2 – свиње
Група 3 – живина
Група 4 – телад

Четворо експерата (Србија, Француска) из области отпорности на антибиотике ће циркулисати, бити на располагању да одговори на питања и води дискусију с групом.

Активност 3
Интерактивна учионица

У склопу активности 3, учесници радионице ће представити закључке са студија случаја, тумачење резултата и даље мере које треба предузети.

Дискусија ће се односити на расуђивање случаја и образлагања различитих одлука које су донете, као и предлагања алтернативних решења.

Активност 4
Тест учинка

На крају радионице, сваки учесник ће добити тест са 10 питања како би се показала стечена знања о примени добрих пракси за рационалну употребе антибиотика у терапији.

Остале значајне информације

Очекивани број учесника: минимално 10, максимално 40 (четири групе по 10 учесница).
Број тренера на радионици:
Душан Мишић (Србија)
Јелена Ашанин (Србија)
Mainguet Jean-Michel (Француска),
Татјана Лабус (Србија)

Тим твининг пројекта ЕУ биће на располагању за помоћ и симултани превод.
Потребно трајање радионице: 5 сати.

Фазе и место одржавања радионице

Активност 1
Модерирају Душан Мишић и Mainguet Jean-Michel као координатори радионице, кроз различите презентације објасниће тренутно стање и подсетити на улогу ветеринара.
Ова активност ће се одржати у XXX.

Активност 2

Свака група ће радити засебно на доступној студији случаја, укључујући лабораторијске резултате (антибиограме). Активност ће се одржати у сали хотела Палисад.

Активности 3 и 4 ће се одржати у сали хотела Палисад.

ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ VI

***ЗДРАВСТВЕНА ЗАШТИТА
КУЋНИХ ЉУБИМАЦА***

КОРТИКОСТЕРОИДИ У ДЕРМАТОЛОГИЈИ – КАДА, КАКО И КОЈИ

CORTICOSTEROIDS IN VETERINARY DERMATOLOGY - WHEN, HOW AND WHICH ONE?

Никола Поповић

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Кратак садржај

Кортикостероиди се широко користе у ветеринарској дерматологији мада постоје контраверзни ставови о њиховим ефектима, начину примене, дозирања и другим моментима везаним за њихову примену. Кортикостероиди су највише коришћени али и злоупотребљавани лекови у ветеринарској али и хуманој дерматологији. У постојећој ситуацији су незаменљиви у лечењу алергија, пруритичних дерматоза и аутоимуних болести. Генерално гледајући, њихови нежељени ефекти су присутни када се ови лекови примењују у великим дозама а током дужег периода времена.

У овом раду, дефинишемо сугестије за коришћење топикалних и системских кортикостероида, принципе њихове примене у дерматологији, њихове позитивне и негативне ефекте.

Кључне речи: кортикостероиди, алергије, пруритичне дерматозе.

Кортикостероиди у ветеринарској дерматологији

Најважнији и најчешће коришћени лекови у ветеринарској и хуманој дерматологији јесу антибиотици и кортикостероиди. Међутим, у овој грани медицине, антибиотици и кортикостероиди се често користе погрешно у смислу лошег избора лека и/или његовог неадекватног давања. Посебно се кортикостероиди „злоупотребљавају“ у смислу симптоматског сузбијања инфламаторних и/или пруритичних манифестација кожних обољења не водећи довољно рачуна о базичним разлозима ових болесних стања. Увођењем кортизола у медицинску употребу (хидрокортизон) половином прошлог века направљена је револуција у дерматологији. Од тада су начињени многобројни синтетски кортикостероиди чија је структура веома слична природним. Модификација хемијске структуре повећала је њихову ефикасност али и нежељена дејства. Ови хормони су незаменљиви у лечењу појединих обољења али њихова примена мора да буде рационална да би се њихови потенцијални нежељени ефекти свели на минимум.

Имајући наведено у виду, овом приликом желимо да да опишемо рационалне принципе за употребу кортикостероида у овој грани клиничке праксе.

Кортикостероиди су хормони које синтетише адренални кортекс кичмењака и њихови синтетски аналози. Револуција у дерматологији се догодила 1950. године када су хемичари Calvin и Maisson открили хормоне надбубрежне жлезде за шта су добили Нобелову награду.

У кори надбубрежне жлезде се синтетишу минералокортикоиди (алдостерон) који примарно регулишу промет електролита и воде и глукокортикоиди (кортизол) који регулишу метаболизам угљених хидрата, масти и протена а такође утичу на многобројне имунолошке функције.

Кортизол (у медицинској употреби –хидрокортизон) синтетише се у зони фасцикулати надбубрежне жлезде и у условима његовом претераног присуства у организму настаје Кушингова болест, док при мањку кортизола настаје Адисонова болест.

Структура синтетских кортикостероида (глукокортикоида) је веома слична природним. Модификација њихове хемијске структуре повећала је ефикасност али и њихова многобројна нежељена дејства.

У терапијском смислу ови хормони смањују инфламацију, користе се у третману хиперимунитета (алергије, астма, аутоимуне болести) у третману канцера (лимфоми и леукемије) и у циљу супримирања негативних ефеката цитостатика.

У ветеринарској дерматологији кортикостероиди се користе топикално и/или системски код алергије на саливу буве (FAD), нутритивне алергије, алергијског контактнoг дерматитиса, контактнoг дерматитиса и код аутоимунних болести.

Топикални кортикостероиди

Топикални кортикостероиди се примењују када год је то могуће као замена за системски третман. Када се примењују на одговарајући начин, нежељени ефекти су минимални. Ипак треба имати у виду да сваки кортикостероид приликом топикалне примене доводи до атрофије коже и других нежељених ефеката ако се дуго примењује а то значи, у континуитету дуже од 2 недеље. Њихова ефикасност зависи од типа, јачине и формулације препарата. Слабији топикални кортикостероиди се користе за акутне инфламаторне промене локалног карактера док се за хроничне, посебно хиперкератотичне дерматозе користе више потентни топикални кортикостероиди. За суву и лихенификовану кожу се користе топикални кортикостероиди у форми масти. Треба имати у виду да се топикални кортикостероиди никада не примењују код пиодермије.

На нашем тржишту, кортикостероид слабог деловања јесте хидрокортизон, средњег деловања алклометазон а кортикостероиди јаког деловања јесу бетаметазон, дезоксиметазон, флуоцинолон, дифлукортонол и мометазон. Свакако да ефекат кортикостероида зависи и од његове формулације а у смислу: маст > гел > крем > лосион > раствор > спреј.

Неадекватна примена топикалних кортикостероида на месту апликације може довести до истањене коже, губитка еластичности коже, настанка комедона, ехимоза, улцерација са пиодермијом и малих ирегуларних пустула које не реагују на антибиотике. Ова појава се назива топикални јатрогени Кушинг.

Орални кортикостероиди

Орални кортикостероиди се користе за генерализоване лезије, затим када промена на кожи не реагије на локални третман и онда када је промену немогуће третирати локално. Приликом избора системских кортикостероида морамо имати у виду њихов антиинфламаторни ефекат, њихов полу живот и њихов минералокортикоидни ефекат:

Кортикостероиди	Антиинфламаторни ефекат	Полуживот (h)	Мин кортик. еф.
Кортизол/хидрокортизон	1	8-12	1
Преднизон/преднизолоне	4	12-36	0,8
Метил предизолон	5	12-36	0,5
Триам цинолон	3-5	24-48	0
Дексаметазон	29	35-54	0

Нежељени ефекти кортикостероида више су везани за њихове минерално кортикоидне ефекте него за глукокортикоидне ефекте

У сваком случају, предисон, предниолон метилпреднисолон и дексаметазон се добро апсорбују приликом пероралног давања. Доза ових често коришћених кортикостероида за алергијске и друге пруритичне дерматозе је 0.5-1 mg/kg на дан, тј. најмања доза која остварује жељене ефекте. Притом се ови лекови дају свакодневно само током иницијалног третмана. На алтернативно давање (сваки други дан) се прелази чим је то могуће, тј. чим је дошло до одговарајућег клиничког побољшања, а затим и ову алтернативну дозу треба постепено смањивати да би се надбубрежна жлезда укључила у синтезу физиолошких доза кортизола. Ако је потребно системске кортикостероиде користити дуже од три месеца упутно је на свака три месеца урадити уринокултуру, и проверити хематолошке и биохемијске параметре.

Ефекат дуготрајног давања кортикостероида са системским деловањем доводи до појаве која се назива јатрогени кушинг. Ова појава се клинички очитује као катаболичка атрофија мишића, пендулозни абдомен, протеинурија, имуносупресија са последичним уринарним инфекцијама, појава опортунистичких инфекција (бактерије, гљивице, демодекс) и појава инсулинске резистенције праћене дијабетесом. Такође су могући акумулација гликогена у хепатоцитима са последичним увећањем јетре, повећање вредности алкалне фосфатазе, успоравање стварања еритроцита, инхибиција синтезе протективних простагландина, гастроинтестиналне улцерације, смањење синтезе колагена, септични артритис и тд.

У сваком случају, ако се кортисте на прави начин, користи од кортикостерида су веће од штете.

Закључак

У закључку овог разматрања могло би се напоменути:

- Када не знаш шта да радиш, дај антибиотике а не кортикостероиде.
- Кортикостероиде дај само када знаш зашто.
- Кортикостероиди су веома корисни, понекада не заменљиви.
- Треба их примењивати разумно.
- Клијентима треба објаснити да кортикостероиди нису “темпирана бомба”.

Литература

1. Veterinary Clinics Of Nort America, Updates In Dermatology, Karen L. Campbell, January 2006. 2. Bolesti kože malih životinja, Nikola Popović, Miodrag Lazarević, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva 2003. 3. A Practical Guide To Canine Dermatology, Eric Guaguere, Pascal Prelaud, Mark Kraig, Merial, 2008. 4. Registar lekova 2016, Velefarm, Bb-Soft, Izdavaštvo Beograd.

ZGLOBNI LOM

FRACTURE OF THE JOINT

Mario Kreszinger¹, Bojan Toholj², Ozren Smolec¹

¹Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

²Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

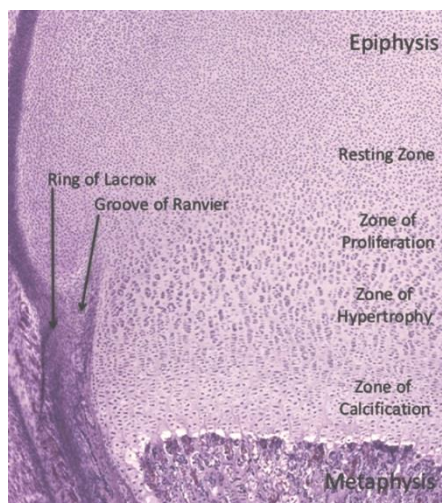
Uvod

Oboljenja lokomotornog sistema mogu se po svojoj anatomskoj lokalizaciji podeliti na oboljenja kostiju, zglobova, mišića i drugog mekog tkiva (tetine, ligamenti). Ova oboljenja mogu biti urođena i stečena, kao i traumatske, infektivne, metaboličke etiologije, zatim neoplazije i dr.

Oboljenja kostiju koja dovode do hromosti najčešće su traumatske prirode (frakture, fisure i dr) ali i inflamatorna oboljenja kostiju (panosteitis, osteomijelitis), neinflamatorna oboljenja (hipertrofična osteodistrofija, osteoliza) ili pak neoplazije (osteosarkom).

Istorijat

Frakture koje obuhvataju epifiznu i fiznu su česte pogotovo kod mladih životinja tj kod jedinki sa otvorenim zonama rasta. U humanoj populaciji na ove prelome otada oko 15-18% svih preloma i predstavljaju ortopedski izazov usmislju dijagnostike i terapije. Foucher (1863) je prvi opisao epifizne prelome, a 1898. god. Poland ih je klasifikovao u četiri kategorije. Aitken je 1936. god. dao nešto detaljniji opis ovih kategorija uzimajući u obzir lokaciju i mogućnost oslonca. Međutim tek je 1963. godine, od strane dva kanadska ortopeda, Robert B. Salter (1924–2010) i W. Robert Harris (1922–2005), opisan i razrađen sistem klasifikacije zglobovih fraktura koji se bazirao na anatomiji, izgledu loma i prognozi. Ovaj sistem klasifikacije je po njima i dobio naziv Salter-Harisova klasifikacija. Salter i Harris su uvažili i histološke osobine fize. Oni nalaze da se frakture kroz fiznu najčešće dešavaju kroz tzv. zonu provizione kalcifikacije, koja predstavlja tranzicionu zonu koja se nalazi između kalcifikovanog i nekalcifikovanog ekstracelularnog matriksa što je čini slabijom u odnosu na ostala tkiva koja se nalaze u blizini.



Slika 1. Histološki preparat zone rasta,

prelom se uvek dešava u zoni hipertrofije sa provizornom kalcifikacijom (Capela, 2016).

Podela fraktura

Fraktura se definiše kao potpuni ili delimični prekid kontinuiteta kosti ili hrskavice s manjom ili većom ozledom okolnog mekog tkiva. Podela fraktura se može obaviti na više načina. Najčešće se frakture dele po načinu nastanka, lokaciji, morfologiji linije loma, po tome da li komuniciraju sa spoljašnjom sredinom, stabilnosti nakon aksijalnog poravnjanja, broju fragmenata i dr.

Od značaja su podele fraktura prema **načinu nastanka**, gde se dele na one nastale dejstvom direktne spoljašnje sile, pod dejstvom indirektno sile, patološke lomove i frakture nastale usled ponovljenog stresa; zatim na otvorene i zatvorene frakture, koje se detaljnije opisuju prema tzv. **Gustilo-Anderson klasifikaciji**. Podela lomova prema lokaciji, izgledu lomne linije i stepena frakture se vrši prema tzv. **AO vet klasifikaciji** (skraćena od Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen), koja se koristi za sistematizaciju lomova dugih cevastih kostiju.





Posebnu grupu lomova, čine tzv. **zglobni lomovi** koji se u zavisnosti od pravca protezanja zglobne linije i zahvaćenosti struktura zgloba i metafize, klasifikuju po tzv. Salter-Harisovoj klasifikaciji.


Podela fraktura ima veliki praktični značaj jer način terapije se drastično menja u odnosu na tip frakture. Ozlede kranijuma i kičme tako spadaju u prvi red hitnosti i pristupamo terapiji bez odlaganja. Otvoreni lom po pravilu rešavamo što pre, a zglobni lom u roku od 1-2 dana. Zatvoreni dijafizni lom možemo imobilizirati i pričekati sa definitivnom terapijom 3-4 dana.

Salter-Harisova klasifikacija zglobnih lomova.

Intraartikularne frakture ili zglobni lomovi nastaju protezanjem linije loma na zglobnu površinu. Metafizni, fizni i lomovi zglobne površine klasifikuju se prema tzv. **Salter-Harris sistematizaciji** (tabela 1).

Tabela 1. Salter - Harris sistematizacija lomova

Tip	Shematski prikaz	Opis
I		Fizni lom. Nije zahvaćena zglobna linija, ali je došlo do odvajanja ili prokliznuća epifize.
II		Fraktura kroz fizealnu ploču s odlomom metafize. Najčešći tip SH frakture.
III		Fraktura kroz fizealnu ploču s odlomom epifize. Potpuni artikularni T lom.
IV		Fraktura kroz fizealnu ploču s odlomom metafize i epifize. Potpuni artikularni Y lom.

V		Nabijeni fizni lom usled impakcije, značajan kod mladih životinja. Nije vidljiv rendgenski. Izostaje rast kosti u fiznoj liniji.
---	---	--

Hill je (2015) definisao i kratki animirani podsetnik koji nam služi za lakšu determinaciju tipa frakture (slika 2).

Salter_Haris fraktura tip 1

Frakturna linija se proteže kroz fizu odnosno kroz zonu rasta. Ove frakture najčešće nastaju dejstvom sile koja je okomita na osu kosti pa suled njegovog dejstva dolazi do prokliznuća epifize i metafize. Često izostaju i očigledni RTG znaci loma, pogotovo ako nije došlo do smaka epifize i metafize, ali redovno je prisutno proširenje fizne linije a klinički se može konstantovati otok mekog tkiva a često i abnormalna pokretljivost.

Salter_Haris fraktura tip 2

Ova fraktura podrazumeva prelom kroz fiznu liniju koji se proteže i na metafizu i to tako da jedan deo metafize ostane u fezi sa epifizom. Ovo je ujedno i najčešći tip zglobne frakture. Fragment metafize se naziva jop i Thurston-Holland fragment.

Salter_Haris fraktura tip 3

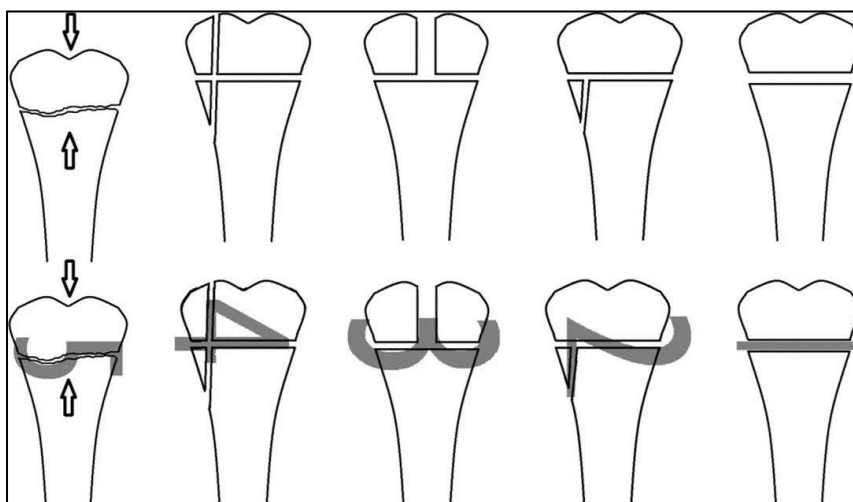
Ova fraktura zahvata zonu rasta (fizu) ali i epifizom. Epifiza je frakturnom linijom podeljena na dva dela. Naziva se još i potpuni artikularni T lom.

Salter_Haris fraktura tip 4

Fraktura zahvata zonu rasta (fizu) ali je odlomljen i deo metafize kao i deo epifize, Odlomljeni delovi epifize i metafize su obično i dalje u vezi preko odlomljenog dela fize. Naziva se još i potpuni artikularni Y lom.

Salter_Haris fraktura tip 5

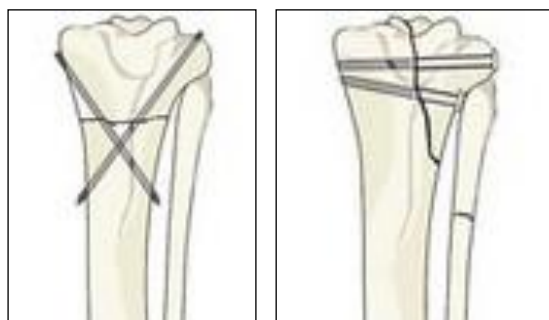
Ovaj tip frakture ustvari predstavlja impakciju zone rasta kosti usled udarca. Pomak kostiju se zapravo rentgesnki i ne uočava. Međutim, nakon izvesnog vremena javlja se deformacija ekstremiteta usled izostanka rasta kosti.



Slika 2. Animirani podsetnik fraktura koje se klasifikuju prema Salter Harisu

Terapija zglobnog loma

Terapija zglobnih lomova se svodi na nekoliko postulata, a dobrim delom zavisi i od tipa frakture. Terapiju treba sprovesti što pre kako bi se preveniralo dalje oštećenje zone rasta i nastanak kontrakture zglobova. Anatomska repozicija i redukcija je važna kako bi se sprečilo zatvaranje zone rasta i kad je reč o frakturi tipa SH 3 i SH 4 kako bi se sprečilo stvaranje zjapa i stepenice unutar zgloba. Repozicija ulomaka mora da se sprovodi pažljivo kako bi se sprečilo dalje oštećenje zone rasta. Važno je napomenuti i da je zona rasta tako koncipirana da se distalni (epifizni deo kosti i metafizni deo kosti) spajaju u fizi preko interdigitacije pa kada se nameste u anatomsku poziciju ostaju relativno čvrsti (naravno uz postavljanje odgovarajućih alateza). Zarastanje je takođe prilično brzo, delom i zbog velikog potencijala tkiva za reparaciju (mlade životinje). Upravo zbog izbegavanja stvaranja kompresije u zoni rasta alanteze koje se postavljaju za sanaciju SH 1 i SH2 fraktura su kiršnerove igle postavljene kroz pin tehnikom ili pak u vidu intermedularnih čavala. Pinovi se uvode na neartikulacionim površinama epifize i usmeravaju se prema fizi tako da sa njom zaklapaju ugao od 90, prolaze metafizu kosti probijajući korteks sa druge strane dijafize. Na ovaj način postavljani, pinovi vrše minimalno oštećenje zone rasta (fize) istovremeno pružajući odgovarajuću stabilnost. Upotreba zavrtneva bi u ovom slučaju dovelo do kompresije zone rasta a time i nastanka deformiteta. Međutim, koštani zavrtnevi se obavezno koriste kod sanacije fraktura tipa SH 3 i SH4, kako bi se postigla rigidna interfragmentalna kompresija epifiznih ulomaka. Na ovaj način se onezbeđuje optimalna kongruentnost zglobnih površina, a povezivanje epifize sa metafizom se opet postiže pomoću kiršnerovih igala.



Slika 3. Levo - Sanacija SH 1 frakture kros pinning tehnikom, desno Sanacija SH4 frakture, postavljanjem kompresionog vijka za psotizanje interfragmentarne kompresije i postizanja adekvatne kongruentnosti zglobnih površina.

Literatura

1.Aitken AP. The end results of the fractured distal tibial epiphysis. *J Bone Joint Surg Am.*;18:685–691, 1936. 2.Cepela. D., Tattaglion J.: Classifications In Brief: Salter-Harris Classification of Pediatric Physeal Fractures *Clin Orthop Relat Res.* 474(11): 2531–2537, 2016. 3.Foucher JT. De la divulsion des epiphyses. *Cong Med France.* 1:63–72, 1863. 4.Hill CE: An *aide-mémoire* for the Salter–Harris classification of paediatric growth plate fractures *Ann R Coll Surg Engl.* 97(6): 479, 2015. 5.Salter RB, Harris WR. Injuries involving the epiphyseal plate. *J Bone Joint Surg Am* 1963; 587–622. 6.Poland J. Traumatic Separation of the Epiphyses. London, England: Smith, Elder & Co; 1898.

BRAHICEFALIČNI SINDROM

BRACHYCEPHALIC SYNDROME

Marko Stejskal

Klinika za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Kratak sadržaj

Ovim predavanjem nastojimo dati savremen pogled na brahicefalični sindrom u pasa. Ono obuhvaća kliničke znakove brahicefaličnog sindroma, vezane gastrointestinalne probleme, dijagnostičke postupke i hirurško lečenje. Opisane tehnike uključuju eksciziju laringealnih vrećica, stafilektomiju sa svojim modifikacijama i resekciju stenotičnih nosnih otvora. Opisat ćemo i novije hirurške tehnike: *folded flap* palatoplastiku, H palatoplastiku, LATE - laserski asistiranu turbinektomiju te savremenu modifikaciju operacijskog lečenja na više nivoa. Uz tehnike opisat ćemo njihove moguće komplikacije i prognozu. Na kraju ćemo nešto vremena posvetiti etičkim aspektima brahicefaličnog sindroma i ulozi veterinara.

Uvod

Brahicefalični sindrom je skup naslednih malformacija koje rezultiraju progresivnom opstrukcijom gornjih dišnih puteva. Karakterišu ga jako skraćene kosti lica i dorzalna rotacija gornje i donje vilice, koje za posledicu imaju dislokaciju struktura nosa. Četiri glavne značajke brahicefaličnog sindroma su: stenotične nosnice, produženo meko nepce, hipoplastična traheja i everzija laringealnih vrećica. Tipične brahicefalične pasmine su engleski buldog, francuski buldog i mops.

Klinička slika

Klinički znakovi uključuju stertor (hrkanje), stridor (oštar zvuk visoke frekvencije, šištavo, zviždukavo disanje), što upućuje na kolaps larinksa, inspiratornu dispneju, otežano disanje, teško podnošenje fizičkog napora, povraćanje i/ili regurgitaciju (74% pasa ima gastrointestinalne simptome, Poncet, 2005), hipertermija i sinkopu. Klinički znakovi brahicefaličnog sindroma dele se prema težini u tri stepena (Poncet, 2005). Gastrointestinalni problem obuhvaćaju distalni ezofagitis (30% pacijenata), gastritis (97% pacijenata), gastroezofagealni refluks i hijatalnu herniju. Leče se primenom omeprazola, metoklopramida i sukralfata. Hijatalna hernija može zahtijevati hirurško liječenje.

Dijagnoza

Dijagnostički postupci obuhvaćaju detaljnu istoriju bolesti, klinički pregled, pregled gornjih dišnih puteva (meko nepce, tonzile, grkljan), analizu plinova u krvi (acidobazni status), endoskopski pregled grkljana i dušnika te rendgenološku pretragu grudnog koša radi procene srca, pluća i hipoplazije dušnika. Na lateralnoj projekciji grudnog koša omer promera dušnika i *aperture thoracis cranialis* je u nebrahicefaličnih pasmina 20%, brahicefaličnih pasmina 16%, a u buldoga svega 13%.

Lečenje

Hitna obrada brahicefaličnih pasa uključuje terapiju kiseonikom, sedacija i privremena traheostoma. Trajno lečenje uključuje eksciziju evertriranih laringealnih vrećica, stafilektomiju i resekciju nosnica/aloplastiku. Konvencionalna stafilektomija ili hirurško izrezivanje predugog mekog nepca znači da se meko nepce reže Metzenbaum makazama nakon čega se šiju nosna za oralnu sluznicu. Stafilektomija može biti modifikirana zavisno o visini i obliku reza (H palatoplastika). Stafilektomijna se može izvesti pomoću CO₂ lasera ili LigaSure™ bipolarnе elektrode za zavarivanje krvnih žila (Brdecka, 2008), što ubrzava postupak i umanjuje krvarenje. *Folded flap* palatoplastika izvodi se u slučajevima kad

je meko nepce ne samo predugo, već i odebljalo (Findji, Dupré, 2013). H palatoplastika je palatoplastika s tonzilektomijom, a izvodi se CO₂ laserom. Za tu tehniku objavljena je stopa komplikacija od 13% sa rezultatom poboljšanja u 97% pacijenata (Carabalona, 2018). Klinasta resekcija nosnica izvodi se na nekoliko načina, a najčešće su vertikalna i horizontalna. Tim zahvatom nosnice se proširuju, a nos čini 80% ukupnog otpora dišnih puteva prilikom inspirija.

Najčešće komplikacije konvencionalnog/tradicionalnog hirurškog lečenja su edem gornjih dišnih puteva, Povraćanje, regurgitacija i, posledično, aspiracijska pneumonija. Edem može biti toliko opsežan da posve opstruiše dišne puteve. U tim slučajevima pacijenta se mora hitno intubirati ili podvrgnuti privremenoj traheostomi.

Dugoročna prognoza uopšteno je dobra. Periooperativna smrtnost je 3.2-6.8%, a dugoročna smrtnost oko 5%. Stopa uspeha je iznad 88% (Trappler, 2011). Negativni prognostički faktori obuhvataju mladu dob, normalno gojno stanje, kolaps larinksa i tradicionalno hirurško lečenje (nasuprot modificiranom zahvatu na više razina [*modified multilevel surgery*], Liu, 2017).

LATE [*laser-assisted turbinectomy*] ili laserski asistirana turbinektomija je endoskopski zahvat u nosnoj šupljini kojim se laserom uklanja opstruktivno tkivo konha čime se znatno proširuju nosni prohodi. Opisane komplikacije uključuju intraoperacijsko krvarenje u 32% slučajeva i ponovni rast turbinata u 16% slučajeva (Oechtering, 2016).

Operacije na više nivoa [*multilevel surgery*]: tradicionalno to znači eksciziju evertitiranih laringealnih vrećica, konvencionalnu stafilektomiju i vertikalna klinasta resekcija nosnica. Novija modifikacija obuhvaća (modificirau) rinoplastiku, *folded flap* palatoplastika, endoskopsku eksciziju evertitiranih laringealnih vrećica, parijalnu kuneiformektomiju i parcijalnu tonzilektomiju prema potrebi. Rezultati su nešto bolji u poređenju s tradicionalnom operacijskom tehnikom (Liu, 2017).

Veterinarska profesija se vrlo kasno (otprilike pre dve godine) uključila u raspravu o etičkim pitanjima vezanim uz brachicefalične pse. U skandinavskim zemljama i Velikoj Britaniji preduzimaju se aktivnosti s ciljem smanjenja privlačnosti i potražnje za izrazito kratkoglavim psima. Nastoji se osvijestiti javnost kako su to životinje koje se praktički stalno bore za vazduh. U rešavanju toga problema, ako prihvatimo da problem postoji, važne uloge imaju i uzgajivači, i kupci i veterinari.

Literatura

1.Brdecka DJ, Rawlings CA, Perry AC, Anderson JR: Use of an electrothermal, feedback-controlled, bipolar sealing device for resection of the elongated portion of the soft palate in dogs with obstructive upper airway disease. *J Am Vet Med Assoc* 2008;233:1265–1269. 2.Carabalona J, Poncet C: A novel surgical approach to brachycephalic syndrome: description and long-term outcome in 450 consecutive dogs. *Proceedings ECVS 27th Annual Scientific Meeting, Athens, Greece, 5-7 July 2018*. 3.Dupre G, Findji L, Oechtering G. Brachycephalic airway syndrome. In: Monnet E, ed. *Small Animal Soft Tissue Surgery*. 1st ed. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2013:167-180. 4.Findji L, Dupré G: Brachycephalic Syndrome: Innovative Surgical Techniques. *Clinician's Brief*. June 2013; 79-85. 5.Liu NC, Oechtering GU, Adams VJ, Kalmar L, Sargan DR, Ladlow JF: Outcomes and prognostic factors of surgical treatments for brachycephalic obstructive airway syndrome in 3 breeds. *Vet Surg*. 2017 Feb;46(2):271-280. 6.Oechtering GU, Pohl S, Schlueter C, Schuenemann R: A Novel Approach to Brachycephalic Syndrome. 2. Laser-Assisted Turbinectomy (LATE). *Vet Surg*. 2016 Feb;45(2):173-81. 7.Oechtering GU, Roesch S: Brachycephalic obstructive airway surgery: nose and nasal cavity. *Proceedings ECVS 27th Annual Scientific Meeting, Athens, Greece, 5-7 July 2018*. 8.Poncet CM, Dupré GP, Freiche VG, Estrada MM, Poubanne YA, Bouvy BM: Prevalence of gastrointestinal tract lesions in 73 brachycephalic dogs with upper respiratory syndrome. *Journal of Small Animal Practice* (2005) 46, 273–279. 9.Tobias KM: *Manual of Small Animal Soft Tissue Surgery*. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell, 2010. 10.Tobias KM, Johnston SA: *Veterinary Surgery: Small Animal*. St. Louis, MO, Elsevier Saunders, 2012. 11.Trappler M, Moore KW: Canine Brachycephalic Airway Syndrome: Pathophysiology, Diagnosis, and Nonsurgical Management. *Compendium* May 2011; E1-E5. 12.Trappler M, Moore KW: Canine Brachycephalic Airway Syndrome: Surgical Management. *Compendium* May 2011; E1-E8.

LEČENJE OTVORENIH PRELOMA U PASA I MAČAKA

TREATMENT OF OPENED FRACTURES IN DOGS AND CATS

Marko Pećin¹, Mario Kreszinger¹, Marko Stejskal¹, Bojan Toholj², Ozren Smolec¹

¹Klinika za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu;

²Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Kratak sadržaj

Procenjuje se da 5-10% svih lomova čine otvoreni lomovi. Klasifikacija otvorenih lomova pomaže pri proceni rizika od komplikacija i funkcionalnog ishoda, a koristi se Gustilo – Andersenova klasifikacija. Koštano zarastanje složeni je fiziološki proces koji podrazumeva koordinirano delovanje većeg broja ćelija i njihovih prekursora kao odgovor na ozledu, a posledica je potpuna obnova jednakovrednoga koštanog tkiva i preuzimanje fiziološke funkcije tog tkiva. Tokom zarastanja dolazi do reakcije četiri različita faktora: periosta, kosti, koštane srži i okolnoga mekog tkiva. Rana otvorenog loma treba biti obrađena na adekvatan način. Područje oko rane treba biti očišćeno te oprano, a sama rana isprana velikim količinama sterilne slane rastvora pod niskim pritiskom. Pacijent se mora stabilizovati i potrebno je ga staviti na antimikrobnu terapiju u skladu s procenom stepena loma. Nakon debridmana rane, koji može biti hirurški, mehanički ili enzimatski, potrebno je lom hirurški stabilizovati. Možemo koristiti metode vanjske ili unutarašnje fiksacije. Koju ćemo hiruršku tehniku koristiti zavisi o vrsti i težini loma, stabilnosti pacijenta te finansijskim mogućnostima vlasnika. Ukoliko se pacijent ne može odmah podvrgnuti operaciji, mesto loma treba imobilizovati. Najčešće se imobilizacija vrši Robert – Jonesovim zavojem koji pruža vanjsku potporu i zaštitu tkiva, smanjuje edem i sprečava dodatno oštećenje tkiva. Cilj lečenja otvorenih lomova je sprečavanje daljnje kontaminacije, sprečavanje dodatnih oštećenja kostiju i okolnog tkiva, naročito krvnih sudova i nerva. Spoljašnji fiksatori pokazali su se kao dobar odabir stabilizacije otvorenih lomova jer se njihovom primenom izbjegava stavljanje implanata u već inficirano tkivo.

Ključne reči: otvoreni lom kosti, lečenje, pas, mačka

UVOD

Lom je potpun ili nepotpun prekid kontinuiteta kosti i hrskavice. Često je popraćen manjim ili većim stepenom oštećenja okolnih mekih tkiva, uključujući krvne žile, uz poremećenu funkciju lokomotornog sistema. Otvoreni lom je ozleda kod koje je prekinut kontinuitet kože ili sluzokože u blizini loma kosti usled pomicanja ulomaka (fragmenata) kosti. Najčešći uzrok loma kosti je direktno delovanje sile na kost. Najviše lomova uzrokovano je motornim vozilima, ali uzroci mogu biti i indirektni te bolesti kostiju. Procenjuje se da 5-10% svih lomova čine otvoreni lomovi. Prema istraživanju, kosti na kojima su otvoreni lomovi u pasa i mačaka najučestaliji su femur (45%), tibija (26%), radijus i ulna (16%) te humerus (13%) (1). Uz navedene duge cevaste kosti, često se javlja i otvoreni lom mandibule (2).

Otvoreni lomovi predstavljaju veliki izazov za doktora veterinarske medicine zbog posebnog načina sanacije i tretmana pacijenta. Takvi pacijenti često su životno ugroženi te zbog same učestalosti otvorenih lomova, veterinarska praksa mora biti upoznata s načinima sanacije otvorenih lomova. Uz pravilan odabir lečenja, važno je da su opšta načela dobro usklađena. Opšta načela uključuju klasifikaciju loma, antimikrobnu terapiju, ispiranje rane, debridman i stabilizaciju prijeloma. U ovom radu prikazana su opšta načela s naglaskom na lečenje, odnosno stabilizaciju loma.

Cilj lečenja otvorenih lomova je sprečavanje daljnje kontaminacije, sprečavanje dodatnih oštećenja kostiju i okolnog mekog tkiva, naročito krvnih žila i nerava.

Gustilo – Andersonova klasifikacija

Klasifikacija otvorenih preloma može pomoći pri određivanju načina lečenja prijeloma i potrebi tretiranja okolnog mekog tkiva. Klasifikacija takođe pomaže pri proceni rizika od komplikacija i funkcionalnog ishoda. Razvrstavanje lomova u kategorije uključuje ne samo način na koji je došlo do loma, već i potrebnu energiju za stvaranje loma, stepena gubitka tkiva i ono što je potrebno za lečenje loma i okolnih mekih tkiva. Važno je naglasiti da kost ne mora nužno biti vidljiva izvan kože da bi se lom proglasio otvorenim. Svaki prelom na ekstremitetu koji sadrži ranu se smatra otvorenim i tretira se kao takav (3). Varijabilni ishodi među različitim tipovima otvorenih fraktura, s različitim stepenima oštećenja, potaknuli su razvoj sistema koji ih klasifikuju na temelju povećanja težine povezane s oštećenjem mekih tkiva. Ovi sistemi pomažu kod određivanja optimalne terapije, poboljšavaju komunikaciju i istraživanje, te daju mogućnost predviđanja ishoda. Najčešće upotrebljavana klasifikacija otvorenih fraktura postala je Gustilo-Anderson klasifikacija. Kao i s mnogim drugim klasifikacijskim sistemima, svrha Gustilo-Anderson sheme je dati prognostički okvir koji navodi lečenje i olakšava komunikaciju među hirurzima i naučnicima (4). Gustilo-Anderson klasifikacija je klasifikacija otvorenih preloma prema stepenu oštećenja mekih tkiva. Razlikujemo 3 stepena, s tim da treći stepen ima 3 podstepena.

I. stepen: rana u području preloma prvog stepena površinom je manja od jednog centimetra u promeru i čistog je dna. Oštećenje okolnog tkiva je neznatno, a tip preloma je većinom dvofragmentaran (postoje dva fragmenta kosti, proksimalni i distalni).

II. stupanj: rana je u promeru veća od jednog centimetra. Steepn zagađenja dna rane je umeren. Oštećenje okolnog mekog tkiva je veće nego u prvom stepenu, a tip preloma je dvofragmentaran ili multifragmentaran (višeiverni ili kominutivni).

III. stepen: rana je u ovom stepenu nepravilnog oblika uz elemente nagnječenja (*contusio*). Prijelomi su multifragmentarni (višeiverni ili kominutivni) s pomakom, te s većom ozljedom mekih tkiva. Stupanj zagađenja je velik. Perioist je oštećen pri trećem stupnju. Treći stup.anj dijeli se na podstupnjeve (a, b i c).

III a stepen; rana je u promjeru veća od 10 cm, okolno tkivo je nagnječeno i zagađeno, rana se ne može primarno zatvoriti, ali postoji dovoljno tkiva za zatvaranje rane kad to bude moguće. III b stepen; rana je u promjeru veća od 10 cm, okolno tkivo je nagnječeno i zagađeno, rana se ne može primarno zatvoriti te je potrebno defekt pokriti regionalnim ili slobodnim transplantatom. III c stepen; uz oštećenja navedena uz a i b postoji i ozleda veće krvne žile koja se mora zbrinuti kako bi se spasio ekstremitete.

LEČENJE OTVORENIH LOMOVA

Otvoreni prelom je onaj u kojem slomljena kost probija kožu, otkrivajući prelom vanjskoj sredini. Otvoreni lomovi mogu dovesti do kontaminacije mesta preloma, što pak može dovesti do infekcije, uključujući osteomijelitis. Postoji nekoliko opštih načela i koraka u lečenju otvorenih lomova, iako neki tipovi preloma zahtevaju specifičan tretman ili hitniju sanaciju. Otvoreni prelomi mogu imati produženo vreme zaraštavanja i više su skloniji nepotpunom celjenju (u poređenju sa zatvorenim prelomima) čak i bez infekcije. Međutim, s odgovarajućom terapijom, teški otvoreni lomovi mogu imati uspešne ishode (5). Svi otvoreni lomovi smatraju se kontaminiranim. Pretpostavlja se da su kontaminirani otvoreni prelomi ili rane starije od 8 sati (3). Odgovarajuća aseptička tehnika je potrebna svaki put kada se susrećemo s otvorenim prelomom. Treba voditi brigu kako se ne bi dodatno oštetila meka tkiva tokom manipulacije. Zavisno o klasifikaciji loma i hoće li kost prodreti u kožu, uticat će na to da li se početna priprema, ispiranje, dekontaminacija i vraćanje kosti natrag u meko tkivo provodi pod sedacijom ili pod općom anestezijom. Stabilnost pacijenta također će uticati na ovu odluku. Ako pacijent nije stabilan za anesteziju i nismo u mogućnosti vratiti kost u tkivo ili izvršiti hiruršku stabilizaciju, tada se izbočena kost mora prekriti sterilnom vlažnom gazom te postaviti odgovarajući zavoj kako bi se sprečile daljnje traume. Prilikom prvog pregleda sterilni zavoj se može primeniti isključivo kako bi se sprečila daljnja kontaminacija bolničkih patogena. Nakon što se pacijent stabilizuje, možemo početi tretirati ranu.

Prva pomoć pri otvorenim lomovima i obrada rane

Kada se pojavi otvoreni prelom, potrebno je pokriti ranu sterilnom kompresom, što je moguće čišće, nakon čega sledi postavljanje odgovarajućeg zavoja. Način oblaganja nije toliko važan, ali treba biti sterilan i ne smije ostavljati čestice. Krvarenje treba kontrolisati pritiskom, odnosno jačinom zatezanja zavoja. Nakon što je pacijent stabilizovan, otvoreni lom treba biti hirurški obrađen. Inicijalno hirurško lečenje trebalo bi provesti do 6 sati nakon nastanka loma, ali ova tvrdnja nije dokazana u humanim istraživanjima (5). U svakom slučaju, hiruršku obradu potrebno je provesti što je ranije moguće kako bi se sprečila moguća infekcija ili zaustavila njena progresija, pogotovo ako se radi o trećem ili višem stepenu loma Gustilo-Anderson klasifikacije.

Čišćenje početne rane može se obaviti u nesterilnom, ali dovoljno čistom području lečenja, ali debridman i završno čišćenje treba završiti u sterilnom hirurškom prostoru. Pacijent bi trebao biti anestetiziran kako bi pravilno čišćenje rane bilo što lakše i temeljnije.

Svo veterinarsko osoblje koje obrađuju ranu i dolaze u kontakt s njom, morali bi nositi rukavice, a sav pribor koji se koristi pri obradi trebao bi biti sterilan te ponovno očišćen i steriliziran nakon upotrebe. Područje oko rane treba biti ošišano i oprano fiziološkim rastvorom. Neki autori preporučuju da se područje oko rane očisti 4% -tnom rastvorom hlorheksidina (6). Ispiranje rane je važno zbog uklanjanja stranih tela i onečišćenja (7). Svrha ispiranja je ukloniti čestice iz rane, a ne ih gurati dublje u nju zato je važno ispirati „preko rane“, a ne „u ranu“. Iako je opšte poznato da je potrebno obilno isprati ranu, malo je podataka koji bi tačno volumen tečnosti za ispiranje trebalo koristiti. To ostaje na odluci hirurga i ovisit će o stepenu preloma i nivou kontaminacije. Ako je dostupna, jedna tekućinska vrećica od 1 L s prigušnicom na pritisak, na 300 mm Hg dovodi do odgovarajućeg pritiska za ispiranje (8).

Ispiranje se može provesti i sa 4 do 6 L fiziološkog rastvora pomoću brizgalice od 60 mL i igle veličine 18 G (1.2 mm), što bi uzrokovalo približno adekvatan pritisak za ispiranje. Razređenje je rešenje onečišćenja, tako da je ključno obilno ispiranje. Za ispiranje se obično koristi sterilni rastvor soli. Neki autori navode kako treba izbegavati dodavanje antibiotika, antiseptika (npr. jodirane otopine hlorheksidina) ili vodonik peroksida u rastvoru za ispiranje. Korišćenje tih proizvoda u većim koncentracijama, tj. s manje vode, može uzrokovati oštećenje tkiva i obojenje tkiva. Neka druga istraživanja govore da je obilno ispiranje poželjno vršiti zagrijanom otopinom soli ili Ringer laktatom, kako bi se sprečila hipotermija pacijenta, posebno kod onih s velikim ranama te preporučuju dodavanje hlorheksidina u 0,05% -tnom razređenju u rastvor za ispiranje (3).

Uklanjanje neodrživog tkiva najvažniji je faktor u sprečavanju infekcije, jer mrtva koža može olakšati rast bakterija. Rubovi rane trebaju biti uklonjeni samo ako su mrtvi. Sigurni znakovi nepodobne kože su tamna obojenost, rezni rubovi koji ne krvare ili maceracija. Budući da ne igra veliku ulogu u zarastanju, fascija bi trebala biti uklonjena. Tanki rubovi fascije lako se uklanjaju škarama. Također, trebalo bi ukloniti mrtvo tkivo mišića s pozornošću na četiri karakteristike kako bi se odredila održivost mišića: boja, kontrakcija, cirkulacija i konzistencija. Mišić bi trebao biti svijetlo crvene boje, kontrahirati se na podražaj, krvariti iz reznih rubova i imati čvrstu konzistenciju (4). Male izložene tetive treba ukloniti. Veće tetive, osobito *tendo calcaneus communis*, potrebno je očuvati jer su potrebne za funkciju uda. Mali fragmenti kosti bez privitaka mekog tkiva trebaju se ukloniti. Nedostatak kosti najbolje se liječi autogenim koštanim graftom tokom fiksacije.

Ako su velike površine kortikalne kosti izvan mekog tkiva, uključujući periosteum, tada treba izvršiti mikrofuražu kosti. To omogućuje da krvne i mezenhimalne matične ćelije dolaze iz medularne šupljine kako bi potpomogle održivost kortikalne kosti. To ne oslabljuje znatno kost i omogućuje brzu granulaciju u 3 do 5 dana. Nakon debridmana, ponovno se treba obaviti ispiranje kako bi se uklonila sva preostala hirurška maziva, prljavština, krv i čestice tkiva iz rane.

Prelom se može stabilizirati nakon debridmana rane i ispiranja. Za tipove I i II moguće je koristiti bilo koju tipičnu fiksaciju. Međutim, pažljivije razmatranje metoda fiksacije potrebno je sa svim otvorenim lomovima tipa III. Kada je to moguće, vanjski učvršćivači mogu dopustiti lečenje bez implantata u području preloma. Fiksiranje igle može omogućiti izlaz za eksudate. Fiksatori se često primjenjuju na distalnom dijelu ekstremiteta. Otvorene frakture humerusa i femura su problematičnije jer su fiksatori manje kruti u tim kostima. Ovde se fiksatori koriste kada je to moguće ili se može odabrati zaključavanje ploče (5).

Debridman

Debridman rane može se postići hirurškim, mehaničkim ili enzimskim tehnikama. Stepen hirurškog debridmana varira zavisno o vrsti rane i stepenu ozlede i kontaminacije. Incizije ne moraju zahtevati debridiranje, dok rane s ozbiljnom ozledom tkiva i onečišćenjem mogu zahtevati opsežan debridman. Obično se provodi debridman tako da se rana čisti, ostavljajući hirurški čiste margine koje se mogu primarno zatvoriti jer to omogućuje procenu održivosti tkiva. Tetive i živci trebaju se očuvati, a ulomke kosti ostaviti na mestu kad god je to moguće. Bilo koje drugo nekrotično ili devitalizirano tkivo uklanja se iz rane. Mišićno tkivo je posebno osetljivo na nekrozu i oštećeno je ako ne krvari. U početku je teško oceniti njegovu održivost zbog privremene vazokonstrukcije i edema. Održiva koža ne mora krvariti. Stoga, ako je u bilo kakvoj sumnji, debridman kože treba odgoditi za 48-72 sata dok se ne vidi jasna razlika u boji. Preporučljivo je upotrebljavati oštricu od skalpela, a ne makaze, jer oštrice dovode do manje ozljede tkiva.

Mehaničko debridiranje provodi se pomoću prijanjajućih zavoja. Najčešće se upotrebljava mokro - suhi (koristi se u viskozno - eksudativnim ranama) i suho-suhi zavoj (koristi se u obilnim eksudativnim ranama). Mokro - suhi zavoji se sastoje od vlažne gaze s sterilnom slanom otopinom koja se primenjuje direktno preko rane. Važno je pokušati sprečiti da mokri dio pokriva netaknutu kožu oko rane jer bi koža mogla postati macerirana. Na vrh se nanosi suhi sloj gaze, koji apsorbira eksudat isušujući prvi sloj. Mehaničko debridiranje rane provodi se kada se ukloni primarni sloj. U suho - suhom zavoju, oba su sloja suha ali, kako se primenjuju u visoko eksudativnih rana, učinak je sličan vlažno - suhim zavojima. Oba zavoja uzrokuju mehaničko debridiranje rane koja nije selektivna, šteti novim regenerativnim ćelijama i uklanja eksudat bogat faktorima rasta i citokinima. Treba voditi računa o uklanjanju dodirnog sloja, jer ostaci iz gaze mogu ostati u rani. Pacijenta je ponekad potrebno sedirati jer uklanjanje kontaktnog sloja može biti bolno.

Enzimatsko debridiranje igra manje važnu ulogu u lečenju otvorenih rana kod malih životinja. Neki od proizvoda koji se mogu koristiti su tripsin i himotripsin, koji se primenjuju lokalno. Prednosti enzimatskog debridiranja uključuju činjenicu da ne zahteva sedaciju/anesteziju te da čuva važne strukture, kao što su nervi. Nedostaci uključuju veći trošak, potrebno vreme i često neodgovarajuće debridiranje (9).

Antimikroba terapija

Svi otvoreni lomovi su prema definiciji kontaminirani i moraju se tretirati kao takvi (4). Metode lečenja mogu se razlikovati zavisno o vrsti preloma. Rizici infekcije takođe se razlikuju po vrsti loma, a procenjeno je da se rizik infekcije nalazi u rasponu od 0 do 2% za prelome tipa I, 2 do 10% za prelome tipa II i 10 do 50% za prelome tipa III (10). Novija istraživanja su pokazala da su stope kliničke infekcije povećane na 1,4% (7/497) za prelome tipa I, 3,6% (25/695) za prelome tipa II i na 22,7% (45/198) za prelome tipa III. Ti su podaci slični studiji o lečenju otvorenih preloma tibije (11).

Budući da je većina otvorenih preloma kontaminirana, upotreba antibiotika ne smatra se profilaksom (10). Cochrane-ov sistematični pregled pokazao je da primena antibiotika smanjuje rizik od infekcije za 59% (12). Vrlo je bitno krenuti s intravenoznom antimikrobnom terapijom što pre (13). U humanoj medicini provedeno je istraživanje na 1104 otvorenih lomova u ljudi te je dokazano značajno smanjenje stope infekcije kada su antibiotici dani unutar 3 sata od ozlede (4,7%) u odnosu na pacijente koji su antimikrobnu terapiju primili nakon 4 sata ili kasnije (7,4%) (14). Sistemske antibiotike odabrane za početno lečenje otvorenog loma trebaju biti usmereni prema širokom rasponu gram negativnih i gram pozitivnih mikroorganizama. Nepotrebno držanje rane otvorenom, znatno povećava rizik od infekcije (15). Poželjno je napraviti antibiogram pre ispiranja rane kako bi se videlo koji su mikroorganizmi prisutni u rani te ga ponoviti nakon ispiranja i obrade kako bi se otkrilo da li smo mi pri obradi kontaminirali ranu.

Preporučena terapija za prelome prvog i drugog stepena su cefalosporini prve ili druge generacije, a za prelome trećeg stepena potrebno je pridodati i aminoglikozide (16). Neki autori zagovaraju zamenu aminoglikozida s fluorohinolonom kako bi se izbegli štetni učinci aminoglikozida (17). Mnogi autori su saglasni da pri riziku od anaerobne infekcije treba dodati penicilin ili ampicilin u terapiju (7).

Teško je odrediti optimalno trajanje antimikrobne terapije. Mnogi autori preporučuju trodnevnu terapiju nakon koje slede još tri dana terapije bez obzira na tekuće kliničke postupke (10). Tokom poslednjih dvadesetak godina, često se koristi lokalna antibiotska terapija na mestu otvorenog prijeloma. Pokazalo se da visoke koncentracije antibiotika na mestu ozljede, a niske doze sistemski u organizmu smanjuju nuspojave pojedinih antibiotika (18). Sredstva koja su toplinski stabilna i u obliku praha te aktivna protiv očekivanih mikroorganizama su prikladan odabir za lokalnu antimikrobnu terapiju. Ove uslove ispunjavaju aminoglikozidi i vankomicin, ali se zbog sve veće rezistencije na vankomicin, upotrebljavaju aminoglikozidi (7). Pokazalo se da je primena lokalnih antibiotika kod teških otvorenih preloma dobar adjuvans za sprečavanje duboke infekcije (19).

Tehnika „bead-pouch“ opisuje upotrebu antibiotika u obliku zrnaca ispunjena polimetakrilatom (PMMA) koja se stavljaju direktno u ranu, koja se zatim prekriva poroznom membranom. Ovo je tehnika koja se obično koristi u ljudi, ali ima i dobar učinak kod pasa. Tom tehnikom postiže se visoka lokalna koncentracija antibiotika, smanjuje se sistemska toksičnost, rana se štiti od spoljašnjih uticaja čime se sprečava sekundarna bakterijska infekcija, istodobno održavajući ranu u aerobnim uslovima (10).

Robert-Džonsov zavoj

Pružava vanjsku potporu i zaštitu tkiva, smanjuje edem i sprečava dodatno oštećenje tkiva. Sastavljen je od lepljivih traka postavljenih uzdužno na kožu u distalnom delu ekstremiteta, a nazivamo ih stremen. Obuhvaća ekstremitet tako da povijanje obavezno kreće od prstiju pa do iznad zgloba koji se nalazi iznad mesta ozlede. Stremeni se postavljaju od karpusa, tj. tarzusa do 10 do 15 cm ispod prstiju. Slobodni dio stremena se umeće nakon postavljenog prvog sloja zavojne vate između slojeva zavojne vate ili između zavojne vate i završne trake. Time se smanjuje mogućnost skidanja zavoja, odnosno njegova iskliznuća. Između zavojne gaze i završne elastične trake može se umetnuti udloga kao mehaničko pojačanje. Robert-Jonesovim zavojem postižemo blagu, a izbegavamo prejaku kompresiju koja sprečava cirkulaciju.

Vanjski fiksator

Vanjski fiksatori mogu se koristiti kod skoro svih vrsta lomova, uključujući i lomove koji ne mogu srasti ili imaju produženo vrijeme sraštanja. Prednost vanjskih fiksatora je u tome što se može postaviti poštujući postulate biološke osteosinteze uz minimalan otvoreni ili zatvoreni pristup. Zbog manje muskulature potkolenice, zatvoreni je pristup lakše izvediv nego prilikom sanacije humerusa ili femura. Vanjski fiksator je posebno povoljan izbor kod otvorenih vrsta lomova zbog toga što se izbegava stavljanje implantata u već kontaminirano tkivo. S druge strane, vanjski se fiksator može koristiti u kombinaciji s ostalim alatezama kao što su ortopedska žica, pritezni vijak ili intramedularni čavao. Okviri vanjskih fiksatora mogu biti linearni, nepravilni ili kružni. Linearni okvir može imati jednu, dvije ili tri povezujuće šipke. Fiksacija se postiže upotrebom igala koje se plasiraju kroz oba korteksa kosti, a mogu i ne moraju probijati kožu sa suprotne strane. Mogu imati glatku ili narezanu površinu. Improvizirani okviri nepravilnog oblika sastoje se od igala ili čavala međusobno spojenih polimerom. To se postiže upotrebom polimetilmetakrilata umesto povezujućih šipki. Kod kružnog fiksatora po Ilizarovu okvir se sastoji od prstenova međusobno povezanih narezanim šipkama. Okvir je pričvršćen za kost napetim Kirschnerovim iglama. Ovakva konfiguracija okvira omogućuje bezgraničnu geometrijsku prilagodbu. Linearni i kružni okviri se mogu kombinirati u hibridne oblike.

Unutarašnja fiksacija

Pod unutarnjom fiksacijom smatramo hiruršku stabilizaciju uz upotrebu hirurških naprava koje ugrađujemo u kost ili na površinu kosti. Dostupan je različit hirurški pribor koji se koristi u tu svrhu kao što su igle, ploče, vijci, čavli i žice.

Kirschnerove igle

To su intramedularni čavli koji su tanji od 2mm. Kirschnerove igle koriste se uglavnom za fiksaciju fragmenata uz upotrebu drugih alateza. Opiru se savijanju, ali su relativno slabe, pa se koriste uglavnom kod manjih pacijenata. Upotrebljavaju se za sprečavanje rotacije, tako da se najčešće koriste u

paru paralelno ili u kombinaciji sa priteznim vijkom. Pri njihovoj upotrebi postoji zabrinutost da će implantat dodatno inficirati tkivo (20).

Zaključavajuća ploča

Zaključavajuće ploče imaju minimalan kontakt s kosti, dugačko premošćivanje i manje vijaka potrebnih za fiksaciju. Stabilnije unutarnje alanteze omogućavaju lomovima brže zarastanje, a u isto vreme funkcija zglobova i mekih tkiva ostaje očuvana. Do njihovog otkrića došlo se u poslednjih 15-ak godina kada su istraživači AO grupe (*Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen*) došli do spoznaje da se smanjenjem rigidne kompresije koju pružaju DCP i LC-DCP ploče, očuva periost i njegova cirkulacija, te se time postiže brže zarastanje rana i smanjuje mogućnost komplikacija nakon operacija. Zaključavajuće ploče svoju osnovu imaju u PC- Fix (Point Contact Fixator) pločama, čija se osnova zasnivala na elastičnoj, ali stabilnoj osteosintezi, te je na taj način omogućavala zarastanje kalusom. Svrstavamo ga u ploče, ali deluje kao unutrašnji fiksator. Razvijen je kako bi se otkrio koncept unutarnjih fiksatora s nekortikalnim vijcima u sklopu MIPO-a (Minimally Invasive Plate Osteosynthesis). Pokazao se kao izrazito dobar fiksator i kosti brzo zarastavaju i vraćaju svoju prijašnju funkciju. Najveća prednost uporabe MIPO-a je mogućnost stavljanja unutarnjih alanteza kroz jako malu ranu na meošto loma sa samonarezujućim vijcima. Uporabom MIPO-a izbegavamo veliko hirurško polje i omogućavamo sanaciju loma kod nagnječenja kože.

ZAKLJUČAK

Iako se u današnje vreme još uvek vode brojne debate o pravilnim postupcima pri susretu s otvorenim lomovima, postoje čvrsti principi vezani uz sam pristup pacijentu kojih bi se trebali pridržavati kako bi se komplikacije smanjile na najmanju moguću mjeru. Sistemska antimikrobna terapija protiv širokog spektra mikroorganizama treba biti započeta što prije. Obilno ispiranje rane sterilnom slanom otopinom pri niskom pritisku, ključno je zbog uklanjanja stranih tela, bakterija i drugih čestica iz rane. Nakon pravilnog prvobitnog pristupa pacijentu, obrade rane i debridmenta znatno se smanjuje mogućnost infekcije te vodi ka lakšem ozdravljenju pacijenta. Hirurška stabilizacija treba se učiniti čim je to moguće bez nepotrebnog odgađanja kako bi se rana mogla čim pre zatvoriti. Vanjski fiksatori pokazali su se kao dobar odabir jer se njihovom primenom izbegava stavljanje implanata u već inficirano tkivo.

Literatura

1.Harasen G, 2003, Common long bone fracture in small animal practice-Part 2. Can. Vet. J. 44, 503-4. 2.Nunamaker D, 1985, Fractures and dislocations of the mandible. Chapter 18. http://cal.vet.upenn.edu/projects/saortho/chapter_18/18mast.htm. 3.Au J, 2011, Managing open fractures. <http://veterinarycalendar.dvm360.com/managing-open-fractures-proceedings>. 4.Perry KL, 2016, Management of open fractures: Part 1. Companion Animal Vol. 21. 3, 165-9. 5.Kraus KH, 2013, Surgical repair of open fractures. Clinician's brief Oct, 93-7. 6.Lambrechts NE, Hurter K, Picard JA i sur., 2004, A prospective comparison between stabilized glutaraldehyde and chlorhexidine gluconate for preoperative skin antisepsis in dogs. Vet. Surg. 33, 636. 7.Okike K, Bhattacharyya T, 2006, Trends in the management of open fracture. J. Bone Joint Surg. 88, 2739-48. Gall T, Monnet E, 2010, Evaluation of fluid pressures of common wound-flushing techniques. Am. J. Vet. Res. 71, 1384-6. 8.Lafuente P, 2013, Initial management of the trauma patient. Vet. Ireland Journal Vol. 3. 9, 496-02. 9.Zalavras CG, Marcus RE, Levin S, Patzakis MJ, 2007, Management of open fractures and subsequent complications. J. Bone Joint Surg. 89, 883-95. 10.Templeman DC, Gulli B, Tsukayama, DT, Gustilo RB, 1998, Update on the management of open fractures of the tibial shaft. Clin. Orthop. Relat. Res. 178, 36-41. 11.Gosselin RA, Roberts I, Gillespie WJ, 2004, Antibiotics for preventing infection in open limb fractures. Cochrane Database Syst. Rev. 1, CD003764. 12.Lenarz CJ, Watson JT, Moed BR i sur., 2010, Timing of wound closure in open fractures based on cultures obtained after debridement. J. Bone Joint Surg. Am. 92, 1921-26. 13.Patzakis MJ, Wilkins J, 1989, Factors influencing infection rate in open fracture wounds. Clin. Orthop. Relat. Res. 243, 36-40. 14.Weitz- Marshall AD, Bosse MJ, 2002, Timing of closure of open fractures. J. Am. Acad. Orthop. Surg. 10, 379-84. 15.Olson SA, Flinkmeier CG, Moerhing NN, 2001, Open fractures. 5th edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 285-318. 16.Patzakis MJ, Bains RS, Lee J i sur., 2000, Prospective, randomized double-

blind study comparing single-agent antibiotic therapy, ciprofloxacin, to combination antibiotic therapy in open fracture wounds. *J. Orthop. Trauma.* 14, 529-33. **17.**Eckman JB, Henry SL, Mangino PD, Saligson D, 1988, Wound and serum levels of tobramycin with the prophylactic use of tobramycin-impregnated polymethylmethacrylate beads in compound fractures. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 237, 213-15. **18.**Brown KV, Walker JA, Cortez DS, Murray CK, Wenke JC, 2010, Earlier debridement and antibiotic administration decrease infection. *J. Surg. Orthop. Adv.* 19, 18-22. **19.**Corr S, 2012, Complex and open fractures: a straightforward approach to management in the cat. *J. Feline Med. Surg.* 14, 55-64.

ПРИМЕНА МОЛЕКУЛАРНО ГЕНЕТИЧКИХ МАРКЕРА У ИДЕНТИФИКАЦИЈИ ПАСА И КОНТРОЛИ СПОРНИХ РОДБИНСКИХ ОДНОСА КОД ПАСА

APPLICATION OF MOLECULAR GENETIC MARKERS IN INDIVIDUAL IDENTIFICATION AND PARENTAGE VERIFICATION IN DOGS

Владимир Димитријевић, Ружица Траиловић, Мила Савић, Елмин Тарић, Жолт Бечкеи

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Кратак садржај

Током дугог периода заједничког живота са човеком, домаћи пас се развио као једна од фенотипски најваријабилнијих животињских врста. Спровођење ефективне одгајивачке стратегије која подразумева одржање интегритета појединачних раса у оквиру подврсте домаћи пас и смањење вероватноће појаве наследних обољења, као и прецизну идентификацију јединке у форенички релевантним случајевима, захтева поуздан систем за индивидуалну идентификацију и верификацију педигреа односно контролу спорних родбинских односа. До данас је идентификован велики број генетичких ДНК маркера који се могу користити у сврху индивидуалне идентификације и у контроли спорних родбинских односа код паса. У савременим форензичко генетичким студијама, као најкориснији и најдоступнији, углавном се користе микросателитски маркери. Велики, али ипак релативно стабилан полиморфизам микросателита кључни је фактор који је допринео томе да су микросателити постали један од најчешће коришћених генетичких маркера. Поред тога, за употребљивост микросателита као генетичких маркера свакако је важна и чињеница да је техника генотипизације микросателита релативно једноставна и широко доступна. Сетови микросателитских маркера који се данас препоручују у сврху индивидуалне идентификације имају веома високу кумулативну вредност вероватноће подударанја од 1×10^{-9} , а за контролу спорних родбинских односа код паса искључују спорно родитељство са вероватноћом од преко 99%.

Кључне речи: домаћи пас, молекуларно генетички маркери, идентификација, родитељство

Порекло подврсте домаћи пас

Подврста домаћи пас (*Canis lupus familiaris*) припада фамилији *Canidae*, реду *Carnivora* и суперфамилији *Caniodea*, која обухвата и медведе, ласице, творове, ракуне и пинипеде (фоке, морски лавови и моржеви). Фамилија *Canidae* филогенетски се највише разликује од осталих чланова суперфамилије и процењује се да је до издвајања од осталих карнивоора дошло пре више од 50 милиона година (1). Домаћи пас је последња подврста која се током еволуције издвојила у оквиру фамилије *Canidae* (1).

Све врсте у оквиру рода *Canis* филогенетски су блиско повезане и постоји у мањој или већој мери могућност њиховог међусобног укрштања. Charles Darwin је сматрао да изразито велика фенотипска разноликост у оквиру подврсте домаћи пас указује на порекло од две или више различитих врста дивљих канида (2). Konrad Lorenz такође је сматрао да је у питању већи број врста, а примарно вукови и шакали (3). Данас највећи број аутора сматра да подврста домаћи пас води порекло од сивог вука, *Canis lupus* (3,4,5,6,7). Оваква претпоставка заснива се на резултатима великог броја морфолошких, бихејвиоралних и, пре свега, молекуларних генетичких студија. Ипак, још увек постоје извесне недоумице око непосредних предака, географског порекла, времена и начина доместикације домаћег пса.

Анализе митохондријске и нуклеарне ДНК савремених паса, за центре одвијања процеса доместикације опредељују источну Азију (5,8), блиски исток (9) и централну Азију (10). Анализе митохондријске ДНК древних пса указују на Европу као центар доместикације ове подврсте.

Време када се доместикација одвијала одређена је калибрацијом мутационе стопе неутралног гена (молекулски сат) у узорцима пореклом од древних паса. На основу ових анализа утврђено је да се процес доместикације паса одвијао пре 20.000 до 40.000 година. (10,7).

Подврста домаћи пас (*Canis lupus familiaris*) обухвата преко 500 различитих раса, по неким ауторима чак 1.000, тако да представља морфолошки најваријабилнију врсту сисара. Поред морфолошких разлика, између раса ове подврсте постоје и веома наглашене физиолошке и разлике у понашању. Кључни фактор за настанак тако великог броја раса различитих особина је циљана селекција коју је човек спроводио током процеса доместикације паса. Највећи број модерних раса домаћег пса настао је током последњих 300 година. Средином XIX века основани су кинолошки клубови и асоцијације и дефинисани су стандарди за расе, чиме је и формално успостављен принцип репродуктивне изолације између различитих раса. Установљено је правило "баријере расе", односно правило да ниједан пас не може бити регистрован као припадник дате расе ако оба родитеља нису регистровани као припадници исте расе. Оваква пракса и стриктни одгајивачки програми, дизајнирани тако да омогуће одржавање и ширење популације пожељних фенотипских особина, довели су до тога да свака раса представља релативно затворену генетичку субпопулацију. Диверзитет неких раса додатно је смањен услед ефекта популарних мужјака. У питању су мужјаци који имају посебно пожељне фенотипске особине за дату расу и, стога, током свог живота могу дати и преко 100 легала (6). Једна од очигледних негативних последица смањења генетичке варијабилности је појава великог броја наследних болести у оквиру ове подврсте. До данас је утврђено преко 500 наследних болести које се јављају код различитих раса домаћег пса. Јасно је да спровођење ефективне одгајивачке стратегије која подразумева одржање интегритета појединачних раса и смањење вероватноће појаве наследних обољења, захтева позудан систем за верификацију педигреа односно контролу родитељства.

Генетички маркери у индивидуалној идентификацији и контроли спорних родбинских односа код паса

Први коришћени генетички маркери у контроли родитељства код паса били су протеини, најчешће растворљиви ензими који се називају и алозими или изозими. Студије које су се бавиле најчешће коришћеним класичним протеинским маркерима у могућност контроле родитељства (12), пружиле су низ корисних сазнања, али су и показале извесна ограничења полиморфних протеинских система као класичних генетичких маркера. Кључни недостатак протеина као класичних генетичких маркера јесте да се испитивањем ових маркера открива само мали део реалне варијације у секвенци ДНК из неколико разлога: (1) с обзиром на то да су протеини продукти гена, варијација у протеинима не открива варијацију у некодирајућим деловима генома; (2) за велики број протеина, нарочито структурних, нису доступне одговарајуће боје, тако да је могућа анализа само локуса који кодирају протеине за које постоји одговарајућа техника визуелизације; (3) одређени број промена у секвенци аминокиселина не доводи до промене у покретљивости у гелу, што значи да се та варијабилност анализом протеинских маркера не може уочити; (4) многе промене у кодирајућој секвенци ДНК не доводе до промене у секвенци аминокиселина, тако да не могу бити детектоване испитивањем протеинских маркера. У студијама које су испитивале ефикасност различитих комбинација протеинских маркера у контроли родитељства, највиша установљена вероватноћа за искључивање спорног родитељства применом ових маркера износила је свега 75% (12).

Прекретница у области контроле родитељства код различитих врста, укључујући и домаћег пса, настаје са развојем техника молекуларне биологије током последње три деценије. Преглед научне и стручне литературе јасно показује да је примена генетичких ДНК маркера, примарно микросателита, данас постала стандард у контроли родитељства паса. Супериорност молекуларно генетичких маркера у односу на класичне протеинске маркере је недвосмислена. Сетови ДНК генетичких маркера који се данас препоручују за контролу родитељства искључују спорно родитељство са вероватноћом од преко 99%.

Молекуларно генетички ДНК маркери

Генетички маркер је сегмент ДНК са познатом локацијом на хромозому чије наслеђивање се може пратити. Постоје три својства која пресудно дефинишу ДНК генетичке маркере: локус специфичност, полиморфизам у датој популацији и техничке могућности генотипизације. Постоји већи број фактора који је допринео широкој примени ДНК генетичких маркера. Међу најважнијим су: развој технике ланчане реакције полимеразе (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), која омогућава амплификацију одређених секвенци ДНК до концентрација које се лако могу детектовати и анализирати; дефинисање сетова еволуционо конзервираних ПЦР прајмера, чиме је отворена могућност амплификације различитих циљних секвенци; увођење аутоматског секвенцирања ДНК у рутински рад; и развој компјутерских програма који омогућавају поуздано праћење и свеобухватну анализу резултата добијених молекуларним генетичким истраживањима.

ДНК генетички маркер може бити селектован ген (локус) или селективно неутралан ген (локус). Селектован ген односно локус је онај који утиче на преживљавање и/или репродуктивни успех јединки у условима дате средине. Неутралан генетички маркер је маркер који нема фенотипски ефекат или његов фенотипски ефекат нема утицаја на адаптивну вредност јединки. ДНК генетички маркери се према локализацији деле на нуклеарне аутозомалне, полно везане и маркере на митохондријалној ДНК, а по типу могу бити микросателити (STRs - *Short Tandem Repeats*), полиморфизам појединачних нуклеотида или тачкасти полиморфизам (SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*) и инсерције/делеције (инделс). У контроли родитељства као и у индивидуалној идентификацији код подврсте домаћи пас користе се различите категорије генетичких маркера, а најчешће микросателити.

Микросателити су локуси који садрже поновљене кратке секвенце ДНК (поновци) које се ређају узастопно једна за другом по принципу глава-реп. Понављане секвенце су по дужини најчешће ди-, три- и тетрануклеотиди, а просечан број понављања је 10 до 50 (13). Микросателити су најчешће полиморфни генетички маркери, јер се број поновљених кратких секвенци на истој локацији у геномској ДНК може разликовати између различитих јединки, популација и врста. Свака секвенца са специфичним бројем понављања означена је као алел. То практично значи да је локус са, на пример, осам поновљених кратких секвенци један алел, док је исти локус који код друге јединке садржи, на пример, 10 понављања, други алел. Јединка која је хомозигот за дати локус, имаће исти број поновљених секвенци на оба хромозома, док ће јединка која је хетерозигот за дати локус, на два хромозома имати различит број поновљених секвенци (13).

Микросателити су најчешће неутрални генетички маркери и њихов полиморфизам је последица мутација чија учесталост се процењује на 10^{-6} до 10^{-2} по локусу по генерацији. Сматра се да је предоминантни механизам мутација микросателитске ДНК "проклизавање" приликом репликације ДНК (*DNA replication slippage*) (14). Током репликације ДНК, полимеразе "проклизавањем" изоставља или додаје кратке поновљене секвенце у растући ланац ДНК. Учесталост мутација микросателита резултат је два процеса: примарне учесталости "проклизавања" током репликације ДНК и ефикасности корективних механизма за исправку погрешно спарених база ("mismatch" корективни систем). Када је у питању настанак микросателита, највећи број аутора сматра да кратки "прото"-микросателити настају случајним тачкастим мутацијама, а да затим "проклизавањем" током репликације долази до њихове екстензије (14).

Велики, али ипак релативно стабилан полиморфизам микросателита кључни је фактор који је допринео томе да су микросателити постали један од најчешће коришћених генетичких маркера. Поред тога, за употребљивост микросателита као генетичких маркера свакако је важна и чињеница да је техника генотипизације микросателита релативно једноставна и широко доступна. Према крајње поједностављеном моделу, прво се изводи ПЦР амплификација циљних локуса микросателита коришћењем прајмера за секвенце ДНК које ограничавају дати локус. Следећи корак је капиларна електорфореза добијених ПЦР продуката, која омогућава процену њихове величине. Поред веома јасних добрих карактеристика микросателита као генетичких маркера, постоје и одређени недостаци. То је, пре свега, сложен и хетероген модел мутације микросателита

који донекле отежава поуздано тумачење резултата добијених генотипизацијом ових генетичких маркера. Поред тога, могу се јавити и грешке у генотипизацији услед појаве неспецифичних продуката амплификације трака и техничких артефаката као што су „испадање“ алела (*dropouts*), нулти алели, лажни алели и други.

Микросателити су присутни у великом броју у геному свих сисара. У геному домаћег пса описани су микросателити који садрже ди-, три- и тетрануклеотидне поновке (15). Велики број студија установио је присуство микросателита на аутозомалним хромозомима (15) и полним хромозомима (16). Микросателити у геному домаћег пса су као маркери коришћени у великом броју различитих истраживања, као што су мапирање генома домаћег пса, проучавање генетичке основе наследних болести, популационе генетичке студије, испитивање генетичке основе различитих фенотипских карактеристика, анализа генетичке хетерогености појединачних раса, дефинисање приступа за контролу родитељства и идентификацију јединки у оквиру раса и врсте, конзервационој генетици и друга.

Примена микросателита као генетичких маркера у индивидуалној идентификацији код паса

Микросателити су најчешће коришћени генетички маркери за ДНК типизацију биолошких трагова анималног порекла и представљају златни стандард у ДНК профилисању. Микросателита у геному има много, полиморфни су и лако се анализирају коришћењем технике ланчане реакције полимеразе коришћењем ласерског система за детекцију флуоресцентно обележених ДНК фрагмената. Примена је у великој мери унапређена применом мултиплекс есеја, што анализу чини економичном и технички једноставнијом.

Индивидуална идентификација паса се примењује најчешће у форензички релевантим ситуацијама које укључују пса: пас као жртва, пас као починилац, пас као сведок (типизација ДНК пса користи се за повезивање осумњичене особе са почињеним делом).

Пси поред мачака су најчешћи субјект форензичке истраге јер су у питању веома бројне популације животиња које живе у врло блиској асоцијацији са људима. У том смислу, јасно је да је велики број студија усмерен на анализу генетичких маркера у геному домаћег пса за потребе форензичке ветеринарске медицине. Данас је идентификован велики број микросателитских маркера у геному домаћег пса који се користе у различитим студијама генетичке карактеризације ове подврсте. Међутим, за највећи број ових маркера недостају детаљни подаци о структури њихових алела, њиховој ДНК секвенци као и учесталости појављивања интермедијарних алела. Поред тога, актуелна номенклатура микросателитских маркера у геному домаћег пса донекле је збуњујућа јер аутори често за исте маркере користе различите ознаке. Примена микросателитских маркера у форензици захтева дефинисање сета стандардизованих маркера са јасном номенклатуром односно маркера за које су установљени сви наведени параметри (ознака, структура алела, секвенца, интермедијарни алели). Само такав сет омогућиће добијање валидних и међусобно упоредивих резултата у различитим лабораторијама. Данас је од стране Међународног друштва за генетику животиња (*International Society for Animal Genetics - ISAG*) дефинисан такав сет који тренутно укључује 21 ди-нуклеотидни сет поновака и три тетра-нуклеотидна микросателитска локуса у геному домаћег пса. Прво је дефинисан сет од 15 таквих маркера (17), а затим је 2006. године допуњен са још шест (18). Овакав приступ требало би да допринесе формирању јединствених база ДНК профила паса по угледу на базе хуманих ДНК профила које имају веома велики значај у хуманој форензичкој медицини (19). Објективне мане ди-нуклеотидних маркера као што су честа појава "статера" као и низак степен дистинкције између суседних алела, указале су на потребу за проналажењем адекватних маркера са већим бројем поновака. До сада је креирано неколико панела који су се користили у компарабилној, поновљивој индивидуалној идентификацији. Друго важно питање које се поставља јесте колико је маркера потребно испитати за поуздану индивидуалну генетичку идентификацију паса. Према резултатима актуелних истраживања довољна је анализа 10 (20) до 15 (18) микросателитских маркера. Показано је да се и већ споменути комерцијални сет од 10 маркера (*StockMarks® for Dogs Canine Genotyping Kit, Applied Biosystems*) такође може са успехом користити у ветеринарској форензичкој медицини (19,21,30). Наиме, у истраживању генетичке карактеризације расе

југословенски овчарски пас шарпланинац, корићењем стандардизованог сета микросателита изабрани панел од 10 маркера достигао је кумулативну вероватноћу подударња од $1,1 \times 10^{-9}$. Панели са најбољим карактеристикама у смислу мутационих стопа, робустности, малој учесталости микро варијанти алела, појаве искакња из алелског опсега, као и великог алелског опсега који води у проблеме као што су испадање алела и дисбаланс пикова у електроферограму, креирани су независно у две лабораторије у САД и то под називом "DogFiler" и Finnzymes canine 2.1 STR multiplex kit (*ThermoFisher Scientific*). Ови мултиплекс есеји садрже 15 тетра-нуклеотидних маркера који укључује и маркер за детерминацију пола, односно 16 тетра, један пента и један хекса-нуклеотидни маркер који укључује и маркер за детерминацију пола. Осетљивост првог есеја је висока у смислу да је довољна количина ДНК за амплификацију испод 60 pg, што га чини есејом избора у случајевима очекиваног малог приноса ДНК молекула.

Поред маркера на нуклеарној ДНК, испитује се и могућност примене мтДНК паса, која је у биолошким траговима присутна у већој количини (22). Процењује се да број копија мтДНК по ћелији износи до 10.000. Међутим, показано је да је моћ дискриминације на основу типизације мтДНК мања од оне која се постиже типизацијом нуклеарних микросателитских локуса. У два хиперваријабилна региона мтДНК установљено је укупно 55 полиморфних локуса, али је само пет било високо полиморфно (22). Ипак, типизација мтДНК може бити корисна у ситуацијама у којима или нема довољно нуклеарне ДНК у биолошким траговима или је превише деградована. То је често ситуација са длакама паса и онда се препоручује типизација мтДНК као осетљивији метод. Проблем недовољне количине нуклеарне ДНК паса у биолошким траговима решава се и развојем нових и ефикаснијих техника екстракције ДНК које омогућавају већи принос (23).

Бројни су примери практичне примене типизације ДНК паса у форензички релевантним случајевима. Тако су, на пример, Пáдáр и сарадници (2002) објавили случај у којем је ДНК типизација омогућила идентификовање паса који су усмртили десетогодишњег дечака на терену спортског центра у Будимпешти. Аутопсијом су утврђене бројне уједне ране за које су осумњичени пас расе ротвајлер и пас расе немачки овчар који су били власништво чувара центра. Међутим, пси су у време доласка полиције на место злочина били затворени у боксу. Типизација микросателита у ДНК екстрахованој из длака и саливе ДНК нађене на јакни дечака јасно је показала да су једини могући починиоци осумњичени чувареви пси. Посебан интерес постоји за ситуације у којима пас има улогу "немог" сведока. Један од бројних примера је случај *Crown vs Daniel Mc Gowan* у Великој Британији. У питању је био случај убиства, а починиоци су оптужени на основу типизације девет микросателита у ДНК екстрахованој из длака паса нађених на одећи жртве, јер је показано да тај ДНК профил одговара ДНК профилу пса који је припадао једном од осумњичених (19). Сумирано, извесно је да се препознаје све већи број форензички релевантних случајева који укључују псе и да ДНК типизација, која омогућава поуздану генетичку индивидуалну идентификацију, постаје значајан и широко прихваћен метод у форензици.

Примена микросателита као генетичких маркера у контроли родитељства код паса

Када је у питању контрола родитељства у оквиру раса домаћег пса, ситуација је веома сложена јер одгајивачке праксе често подразумевају парење блиско повезаних јединки. У том смислу, неопходни су потпуно прецизни и веома осетљиви тестови за верификацију родитељства. Данас се за те потребе најчешће користе дефинисани панели полиморфних микросателитских маркера.

Први корак у поступку контроле родитељства код паса применом молекуларних генетичких маркера је избор и узимање узорак за екстракцију ДНК. Периферна крв је свакако добар узорак за екстракцију ДНК, али је узорковање технички захтевно, нарочито ако је потребно узимање узорак на терену. Принос ДНК из узорак крви директно зависи од броја ћелија беле крвне лозе. Показано је да се број ових ћелија значајно разликује између различитих раса паса, као и да је знатно мањи код старијих паса. Са друге стране, епителне ћелије букалне слузнице узете цитолошким брисем дају уједначено висок принос ДНК код различитих раса паса, метод узорковања није инвазиван и технички је веома једноставан (24). Показано је да се из ових узорак добија задовољавајућа количина ДНК и после више месеци стајања на собној температури, као и да је изолована ДНК стабилна и након више година чувања на -20°C (24). У просеку се по једном

брису добија количина ДНК која је довољна за најмање 200 ПЦР анализа. Имајући у виду наведене карактеристике, јасно је да је брис букалне слузнице данас широко прихваћен и најчешће коришћен узорак за екстракцију ДНК за потребе контроле родитељства. Могу се користити стерилни памучни брисеви којима се материјал узима енергичним ротационим покретима на површини букалне слузнице. Овакав начин узимања брисева омогућава узимање епителних ћелија и довољан принос ДНК. Брисеве треба узимати најмање 15 минута након уноса хране или воде. Екстракција ДНК изводи се у складу са неким од стандардних протокола за органску екстракцију молекула ДНК из еукариотских ћелија (25).

Када је у питању избор микросателитских маркера, високе вредности вероватноће искључења спорног родитељства постижу панели који обухватају већи број генетичких маркера одговарајућих карактеристика. Начелна препорука је да маркери који се користе за контролу родитељства треба да имају следеће карактеристике: вредност информативног садржаја полиморфизма (PIC - *Polymorphic Information Content*) $\geq 0,5$; могућност испитивања полиморфизма применом мултиплекс есеја, што анализу чини економичном и технички једноставнијом; и потврђена репродуцибилност добијених резултата. ПИЦ је параметар који представља квантитативну одредницу полиморфизма датог маркера односно указује на ниво информативности датог генетичког маркера. Алтет и сарадници (2001) испитивали су панел од 10 микросателита на узорку од 360 ротвајлера три различите генерације са високим коефицијентом инбридинга. Полиморфизам истих маркера испитиван је и у популацији расних паса који нису били међусобно повезани односно били су из различитих одгајивачница и нису имали сроднике најмање у другој генерацији. Показано је да је изабрани сет од 10 микросателитских локуса био довољан за верификацију свих случајева родитељства, чак и у оквиру популације високо сродних паса, и да је вероватноћа искључивања погрешног родитељства применом целог панела маркера била 95,6% (26). У студијској популацији која је обухватила 44 пса расе бигл и 22 пса расе лабрадор ретривер, испитивана је ефикасност сета од 20 аутозомалних микросателита у контроли родитељства (27). Иако је установљена одлична ефикасност испитиваног сета микросателитских маркера у контроли родитељства расних паса, остао је отворен проблем употребљивости и рационалности примене тако великог сета маркера за рутинску контролу родитељства. DeNise и сарадници (2004) су, под покровитељством америчког кинолошког клуба (АКС - *American Kennel Club*), у периоду од 1998. до 2001. године извели опсежно истраживање ефикасности 17 микросателитских локуса подељених у два панела од 10 и седам маркера за контролу родитељства и идентификацију јединки. Испитивањем су били обухваћени пси 108 различитих раса признатих од стране АКЦ, при чему је укупан број животиња укључених у ово испитивање био 9561. Показано је да панел од 10 изабраних микросателитских маркера достиже вероватноћу искључивања спорног родитељства од 99% код 61% од 108 испитиваних раса паса. На основу оваквих резултата, препорука ове студије је да изабрани панел од 10 маркера задовољава потребе АКЦ за рутинску контролу родитељства, а да у изузетним случајевима треба урадити и анализу полиморфизма додатних седам микросателитских маркера (28). Тај сет од 10 маркера постао је комерцијално доступан стандардизован сет под називом StockMarks® for Dogs Canine Genotyping Kit (Applied Biosystems). Микросателитски локуси укључени у овај панел су: ПЕ301 (ЦАТА₁), ПЕ303, ПЕ305, ПЕ306, ПЕ308, ПЕ312, ПЕ320, ФХЦ2010, ФХЦ2054 и ФХЦ2079. Амплификација свих 10 микросателитских локуса изводи се једном мултиплекс ПЦР реакцијом према протоколу препорученом од стране произвођача (Applied Biosystems, 2005). Анализа се заснива на примени прајмера обележених флуоресцентним бојама и детекцији у апарату за аутоматску капиларну електрофорезу, са ласерским системом за детекцију флуоресцентно обележених ДНК фрагмената. Сви добијени резултати директно се компјутерски меморишу, чиме је накнадна анализа података знатно олакшана. Völkel (2005) је на узорку од 14 раса паса испитивао могућност примене истих 10 маркера и вероватноћа искључења спорног родитељства износила је од 92% код расе немачки боксер до преко 99% код раса бордер коли, јоркширски теријер, оштроглаки јазавичар, аљаски маламут, сибирски хаски и лабрадор ретривер. Поред неколико комерцијално доступних китова намењених за контролу родитељства паса применом микросателитских маркера, још увек постоји научни интерес за откривање нових комбинација маркера који би омогућили ефикаснију и поузданију анализу родитељства. Тако су, на пример, Канг и сарадници (2009) испитивали сет од

10 микросателитских локуса на узорку од пет раса. Установили су вероватноћу искључивања спорног родитељства у опсегу од 0.9995 до 0.9999.

Завршни део испитивања везаних за контролу родитељства код паса применом молекуларно генетичких маркера јесте статистичка анализа добијених резултата. Један од софтверских пакета који се може користити за контролу родитељства, као и индивидуалну идентификацију је PowerStatsV12 (www.promega.com/geneticidtools/powerstats). Вероватноћа искључивања спорног родитељства је параметар који указује на вероватноћу искључивања случајно изабране јединке из популације као потенцијалног родитеља на основу генотипова једног родитеља и потомка. У конкретним појединачним случајевима спорног родитељства значајни параметри су индекс родитељства, комбиновани индекс родитељства и вероватноћа родитељства. Кључни параметар, на основу којег се израчунавају вредности остала два, је индекс родитељства. Овај параметар представља однос између вероватноће да се добије подударање алела ако су тестиране јединке у првом степену сродства и вероватноће да се исто такво подударање добије ако су ове две јединке несродне (29). У студији генетичке карактеризације расе југословенски овчарски пас шарпланинац (30), корићењем есеја StockMarks® for Dogs Canine Genotyping Kit (Applied Biosystems) вероватноћа искључења спорног родитељства код паса расе југословенски овчарски пас шарпланинац применом целог панела од 10 микросателитских маркера била је преко 99%.

Контрола родитељства код паса данас практично увек подразумева примену молекуларно генетичких маркера и у развијеним земљама овакав приступ је широко прихваћен. Поуздана контрола родитељства заснована на молекуларно генетичким маркерима један је од кључних елемената модерне кинологије и у великој мери утиче на одржавање и планирање одгајивачких стратегија за различите расе паса.

Литература

- 1.Wayne RK, Ostrander E, 1999, Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog, *BioEssays*, 21, 247-257.
- 2.Darwin C, 1871, *The descent of man and selection in relation to sex*, London: Murray.
- 3.Lorenz K, 1954, *Man meets dog*, London, Methuen.
- 4.Clutton-Brock J, 1995, *Origins of the dog: domestication and early history*. U: *The domestic dog, its evolution, behaviour and interactions with people*. Ured: Serpell J. Cambridge: Cambridge University Press, 7-20.
- 5.Savolainen P, Zhang Y, Luo J, 2002, Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs, *Science*, 298, 1610-1613.
- 6.Parker H, Kim V, Sutter N.B, 2004, Genetic structure of the purebred domestic dog, *Science*, 304, 1160-1164.
- 7.Botigué L R, Song S, Scheu A, 2017, Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic, *Nature Communications* 8.
- 8.Wang G, 2016, Out of southern East Asia: the natural history of domestic dogs across the world, *Cell Res.* 26, 21–33.
- 9.Vonholdt B M, 2010, Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication, *Nature* 464, 898–902.
- 10.Shannon LM, 2015, Genetic structure in village dogs reveals a Central Asian domestication origin, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, 13639–13644.
- 11.Juneja RK, Arnold ICJ, Gahne B, 1987, Parentage testing of dogs using variants of blood proteins: description of five new plasma protein polymorphisms, *Animal Genetics*, 18, 297-310.
- 12.Kashi Y, Soller M, 1999, Functional roles of microsatellites and minisatellites. U: *Microsatellites, Evolution and Applications*. Ured: Goldstein and Schlotterer, Oxford University Press.
- 13.Phillippe J, Lagoda PJ, 1996, Microsatellites, from molecules to populations and back, *Trends in Evolution and Ecology*, 11: 424-429.
- 14.Schlötterer C, 2000, Evolutionary dynamics of microsatellite DNA, *Chromosoma*, 109, 365-371.
- 15.Francisco LV, Langton AA, Mellersh CS, 1996, A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping, *Mammalian Genome*, 7, 359-362.
- 16.Bannasch DL, Bannasch MJ, Ryun JR, 2005, Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs, *Mammalian Genome*, 16, 273-280.
- 17.Eichmann C, Berger B, Parson W, 2004, A proposed nomenclature for 15 canine-specific polymorphic STR loci for forensic purposes, *International Journal of Legal Medicine*, 118, 249-266.
- 18.Hellmann AP, Rohleder U, Eichmann C, 2006, A proposal for standardization in forensic canine DNA typing: allele nomenclature of six canine-specific STR loci, *Journal of Forensic Science*, 51, 274-281.
- 19.Halverson J, Basten C, 2005, A PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs, *Journal of Forensic Science*, 50, 1-12.
- 20.Oliveira AC, Balsa F, Brito P, 2006, Preliminary studies of individual genetic identification of

domestic dogs (*Canis familiaris*), International Congress Series, 1288, 858-860. **21.**Pádár Z, 2006, Forensic genetic analysis of canine biological remains, Doktorska disertacija, Szent István University. **22.**Eichmann C, Parson W, 2007, Molecular characterization of the canine mitochondrial DNA control region for forensic applications, International Journal of Legal Medicine, 121, 411-416. **23.**Pfeiffer I, Völkel I, Täubert H, 2004, Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification, Forensic Science International, 141, 149-151. **24.**Oberbauer A, Grossman I, Irion D, 2003, The genetics of epilepsy in the Belgian terrier and sheepdog, Journal of Heredity, 94, 57-63. **25.**Budowle B, Garofano P, Hellman A, 2005, Recommendations for animal DNA forensic and identity testing, International Journal of Legal Medicine, 119, 295-302. **26.**Altet I, Francino O, Sánchez A, 2001, Microsatellite polymorphism in closely related dogs, The Journal of Heredity, 92, 276-279. **27.**Ichikawa Y, Takagi K, Tsumagari S, 2001, Canine parentage testing based on microsatellite polymorphisms, Journal of Veterinary Medical Science, 63, 1209-1213. **28.**DeNise S, Johnston E, Halverson J, 2004, Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers, Animal Genetics, 35, 14-17. **29.**Stojković O, Veselinović I, 2005, Standardi DNK analiza u veštačenju spornih srodničkih odnosa, Sekcija za sudsku medicinu Srpskog lekarskog društva. **30.**Dimitrijević V, 2008, Genotipizacija jugoslovenskog ovčarskog psa šarplaninca primenom mikrosatelitskih genetičkih markera, Doktorska disertacija.

ОСНОВНИ МОРФОМЕТРИЈСКИ ПАРАМЕТРИ ГЛАВЕ ТОРЊАКА

BASIC MORPHOMETRIC PARAMETERS OF TORNJAK HEAD

Дарко Дробњак, Миливоје Урошевић

Центар за очување аутохтоних раса, Београд, Србија

Кратак садржај

Босанско-херцеговачко-хрватски пастирски пас торњак припада великој групи пастирских паса распрострањених од централне Азије до Атлантика. Готово да нема земље у којој нема, мање или више специфичних, пастирских паса. Тип пастирских паса као торњак распрострањен је на територији целокупног Балканског полуострва. Међународна кинолошка федерација (FCI) сврстала је торњака у другу групу, другу секцију где су свстани молоси и планински пси. Признавање расе уследило је 1. јуна 2007. године, што значи да је ова раса до 2017. године била на листи условно признатих раса. Званично је раса призната од стране FCI у јулу 2017. године под бројем стандарда 355.

Овим истраживањем зоотехнички је обрађено 76 паса (40 мужјака и 36 женки). Мерено је шест екстеријерних параметара на глави (дужина главе, дужине лобање, дужина њушке, ширина лобање, ширина њушке и дубина њушке). Сви мерени пси су били у старости од 1 до 7 година. Мере су узете помћу пантљике и помичног мерила са нониусом. Подаци су статистички обрађени у програму GraphPad Prism 5. Применом т-теста израчуната је статистичка значајност разлике мерених параметра између мужјака и женки.

Дужина главе торњака, на укупном узорку износи 25,92 cm, а код мужјака је та вредност 26,41 cm, а код женки 25,38 cm. Математичком статистичком анализом утврђено је да разлика у дужини главе између мужјака и женке има велику статистичку значајност. Осим за дужину главе и код ширине лобање између мужјака и женки постоје статистичке значајне разлике. Код мужјака је ширина лобање 14,29 cm, уз коефицијент варијације од 9,07, а код женки 13,24 cm, уз коефицијент варијације од 10,20.

Кључне речи: торњак, екстеријер, глава

Увод

Босанско-херцеговачко-хрватски пастирски пас торњак припада великој групи пастирских паса распрострањених од централне Азије до Атлантика. Готово да нема земље у којој нема, мање или више специфичних, пастирских паса. Тип пастирских паса као торњак распрострањен је на територији целокупног Балканског полуострва (10).

Међународна кинолошка федерација (FCI) сврстала је торњака у другу групу, другу секцију где су свстани молоси и планински пси. Признавање расе уследило је 1. јуна 2007. године, што значи да је ова раса до 2017. године била на листи условно признатих раса. Званично је раса призната од стране FCI у јулу 2017. године.

По својим морфолошким карактеристикама торњак припада групи молосоидних паса. Званични стандард, кога је FCI заведе под бројем 355, од 2017. године прописује да дужина њушке и дужина лобање стоје у односу 1:1. Такође стандардом је предвиђено да краћа њушка може бити прихватљива. Други односи појединих вредности на глави нису дефинисани стандардом ове расе. У доступној литератури ретки су подаци о морфометријским параметрима главе торњака. Пошто торњак припада групи пастирских, молосоидних, раса паса онда се могу упоредити резултати добијени код других, фенотипских мање или више, сличних паса.

Истражујући екстеријер шарпланинца Урошевић и Латиновић (9) су утврдили да просечна дужина главе износи 27,1 cm. Утврђујући екстеријерне параметре турског пастирског пса кангала Урошевић и сар. (8) констатовали су да просечна дужина главе износи 28,79 cm, да је дужина лобање 12,34 cm, а дужина њушке 11,52 cm. Дужине лобање и дужине њушке стоје у односу 60:40. Истим истраживањем утврђено је да ширина лобање износи 16 cm, и да чини 25% дужине главе. Ширина њушке била је 8,35 cm, док је дубина њушке износила 10,37 cm. Потребно је истаћи да код кангала постоји врло значајна статистичка значајност разлика међу половима.

Последњим истраживањима морфометријских параметара шарпланинца установљена је просечна дужина главе мужјака од 29,03 cm, а женке 27,28 cm. Просечна дужина лобање мужјака је 17,32 cm, а код женки 16,69 cm. Лобања је код мушких јединки била у просеку широка 14,59 cm, а код женских 13,6 cm. Њушка је код мужјака дуга 11,78 cm, а код женки 10,59 cm. Ширина њушке мушких јединки је 8,49 cm, а женских 7,76 cm, док је дубина износила код мушких 10,73 cm, а код женских 10,09 cm (8).

Мирковић (4) је утврдио да дужина главе мужјака шарпланинца износи од 23 до 35 cm, а код женки од 23 до 29 cm. Станковић (7) саопштава да је дужина главе мужјака шарпланинца 25,02 cm, а женки 24,35 cm. Проучавајући екстеријер шарпланинца у Македонији Налетовски и Дроздовски (1984) су утврдили да је дужина главе мужјака једнака дужини главе женке и износи 25 cm. Салкић и сар. (6) саопштавају да је просечна дужина главе мужјака торњака 29,2 cm, уз коефицијент варијације од 5,63%. Дужина главе женке торњака износила је 26,75 cm уз коефицијент варијације од 3,58 %.

Материјал и метод рада

Зоотехнички је обрађено 76 паса (40 мужјака и 36 женки). Мерено је шест екстеријерних параметара на глави (дужина главе, дужине лобање, дужина њушке, ширина лобање, ширина њушке и дубина њушке). Сви мерени пси су били у старости од 1 до 7 година. Мере су узете помћу пантљике и помичног мерила са нониусом. Мерне тачке за параметре биле су следеће (1,2): дужина главе од врха носне печурке до потиљачне кврге, дужина лобање од потиљачне кврге до стопа, дужина њушке од стопа до врха носне печурке, ширина лобање на постраним странама чеоне кости непосредно испред ушију, ширина њушке на средини њушке, дубина њушке на средини њушке. На укупном узорку мерења је обавило једно лице, тако да је субјективна грешка иста и минимална.

Подаци су статистички обрађени у програму GraphPad Prism 5. Приказане су средње вредности мерених параметара и индекса, максимална и минимална вредност, као и дескриптивни статистички параметри стандардна девијација, стандардна грешка и коефицијент варијације. Применом т-теста израчуната је статистичка значајност разлике мерених параметра између мужјака и женки.

Израчунати су следеће параметре према формулама: Индекс лобање = дужина лобање/дужина главе x 100; Индекс њушке = дужина њушке/дужина главе x 100; индекс ширине лобање = ширина лобање/дужина главе x 100; индекс ширине њушке = ширина њушке/дужина главе x 100; индекс дубине њушке = дубина њушке/дужина главе x 100 (2).

Резултати и дискусија

Просечна вредност главе дужине главе мужјака торњака је 26,41 cm уз стандардну девијацију од 1,71. Женке су имале просечну дужину главе од 25,38 cm са интервалом варијације од 20 до 28 cm. Дужина лобање мужјака у просеку је износила 15,76 cm, а женки 15,15 cm. Интервал варирања дужине њушке код мужјака је од 8 до 15 cm, са просеком од 10,73 cm. Ширина лобање женки у просеку је 13,24 cm, са интервалом варијације од 10 до 16 cm. Ширина њушке мужјака у просеку је 9,46 cm, а дубина 10,29 cm.

У табели 1 приказане су вредности дескриптивних статистичких параметара за оба пола као и збирно за мужјаке и женке.

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

Табела 1. Вредности измерених параметра главе торњака

Параметар	Пол	N	Min	Max	CV	Sg	X ± SD	t
Дужина главе	М	40	22.00	31.00	6.50	0.27	26.41±1.71	2.73**
	Ж	36	20.00	28.00	6.26	0.26	25.38±1.57	
	Тотал	76	20.00	31.00	6.66	0.19	25.92±1.72	
Дужина лобање	М	40	13.00	19.00	8.61	0.21	15.76±1.35	1.18^{ns}
	Ж	36	10.00	17.50	10.19	0.26	15.15±1.54	
	Тотал	76	10.00	19.00	9.50	0.16	15.47±1.50	
Дужина њушке	М	40	8.00	15.00	12.17	0.20	10.73±1.30	1.66^{ns}
	Ж	36	7.50	12.00	9.97	0.17	10.28±1.02	
	Тотал	76	7.50	15.00	11.36	0.14	10.52±1.20	
Ширина лобање	М	40	12.00	18.00	9.07	0.20	14.29±1.30	3.45***
	Ж	36	10.00	16.00	10.20	0.22	13.24±1.35	
	Тотал	76	10.00	18.00	10.26	0.16	13.79±1.41	
Ширина њушке	М	40	7.00	13.00	17.48	0.26	9.46±1.65	0.93^{ns}
	Ж	36	6.50	11.00	11.06	0.17	9.16±1.01	
	Тотал	76	6.50	13.00	14.88	0.16	9.32±1.38	
Дубина њушке	М	40	7.00	14.00	15.64	0.25	10.29±1.60	0.87^{ns}
	Ж	36	7.00	11.00	10.37	0.17	10.01±1.03	
	Тотал	76	7.00	14.00	13.46	0.16	10.16±1.36	

^{ns} P>0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

У табели 2 приказани су вредности индекса са дескриптивним статистичким параметрима одвојено за мужјаке и женке и за оба пола заједно. Просечна вредност индекса лобање мужјака је 59,70 а за женке 59,61. Индекс њушке просечно је код мужјака 40,67, а код женки 40,61. Индекс ширине лобање код женки варира од 38,89 до 64. Индекс ширине њушке мужјака у просеку је 35,75, а дубине њушке 38,91. Ни код једног од параметара израчунатих индекса није утврђена статистичка значајност међу половима.

Табела 2. Вредности индекса мерених параметара

Параметар	Пол	N	Min	Max	CV	Sg	X ± SD	t
Индекс лобање	М	40	46.43	66.67	6.72	0.63	59.70±4.01	0.07 ^{ns}
	Ж	36	38.46	72.50	9.87	0.98	59.61±5.88	
	Тотал	76	38.46	72.50	8.30	0.56	59.66±4.95	
Индекс њушке	М	40	32.14	53.57	11.19	0.71	40.67±4.55	0.07 ^{ns}
	Ж	36	30.00	55.00	10.97	0.74	40.61±4.45	
	Тотал	76	30.00	55.00	11.02	0.51	40.64±4.47	
Индекс ширине лобање	М	40	44.44	66.67	7.26	0.62	54.13±3.92	1.53 ^{ns}
	Ж	36	38.89	64.00	11.22	0.97	52.38±5.87	
	Тотал	76	38.89	66.67	9.37	0.57	53.30±4.99	
Индекс ширине њушке	М	40	26.92	50.00	14.77	0.83	35.75±5.27	0.44 ^{ns}
	Ж	36	27.08	55.00	13.72	0.82	36.28±4.97	
	Тотал	76	26.92	55.00	14.20	0.58	36.00±5.11	
Индекс дубине њушке	М	40	30.43	53.85	13.70	0.84	38.91±5.33	0.58 ^{ns}
	Ж	36	28.00	55.00	11.84	0.78	39.59±4.68	
	Тотал	76	28.00	55.00	12.78	0.57	39.23±5.01	

^{ns} P>0.05

Дужина главе торњака, на укупном узорку износи 25,92 cm., а код мужјака је та вредност 26,41 cm, а код женки 25,38 cm. Мужјаци имају, што је логично, дужу главу. Ово је у сагласности са резултатима истраживања код других раса. Тако је Мирковић (4) утврдио да дужина главе мужјака шарпланинца износи од 23-35 cm, а код женки од 23-29 cm. Станковић (7) саопштава да је дужина главе мужјака шарпланинца 25,02 cm, а женки 24,35 cm. Салкић и сар. (6) саопштавају да је просечна дужина главе мужјака торњака 29,2 cm, уз коефицијент варијације од 5,63%. Дужина главе женке торњака износила је 26,75 cm уз коефицијент варијације од 3,58%.

Математичко статистичком анализом утврђено је да разлика у дужини главе између мужјака и женке има велику статистичку значајност. Осим за дужину главе и код ширине лобање између мужјака и женки постоје статистичке значајне разлике. Код мужјака је ширина лобање 14,29 cm, уз коефицијент варијације од 9,07%, а код женки 13,24 cm. Уз коефицијент варијације од 10,20%. У укупно посматраној популацији коефицијент варијације, за ширину лобање, је 10,26%. Ове разлике имају врло велику статистичку значајност.

Закључак

У апсолутним вредностима утвђене су статистичке разлике у морфометријским параметрима главе торњака, између полова. Код индекса главе, међутим не постоје статистички значајне разлике по половима. На основу добијених резултата јасно се може закључити да је торњак молосоид и да дужина главе и дужина њушке не стоје у односу 1:1 као што је прописано важећим кинолошким стандардом. Прихватљивост краће њушке коју стандард дозвољава је апсолутно оправдано.

Литература

1. Atasoy, F., N. Ünal, O. Kanlı and A. Yakan, (2005). Damızlık Kangal köpeklerinde canlı ağırlık ve bazı vücut ölçüleri. Lalahan Hay. Arşt. Enst. Derg., 45(1): str. 33–39. 2. Drobnjak, D., V. Matić and D. Miljević, (2010). Eksterijer pasa osnove procene, autorsko izdanje, Beograd, Srbija. 3. Milivoje M. Urošević, Darko Drobnjak, Petar Stojić, Milan B. Urošević (2017.) Craniological Parameters of Yugoslav Shepherd Dog Sharplanina, Mediterranean Agricultural Sciences (2017) 30(3): 269-274. 4. Mirković S. (1991.): Le Sarplaninac Chien de Berger Yougoslave. These Docteur Veterinary, Univesite Claude Bernard de Lyon. 5. Naletovski A., Drozdovski I. (1984.): Standardni merki na jugoslovenskiot ovčarski pes šarplaninec što živee na podračjeto na SR Makedonija. Makedonski veterinarski pregled XIII (1), 67-76. 6. Salkić A., Urošević M., Stojić P., Šakić V. (2000.): Važniji pokazatelji porasta psa tornjaka. Stočarstvo, 54, 6, 427-433. 7. Stanković D. (1967.): Jugoslovenski ovčarski pas šarplaninac – Osobine i upotrebna vrednost. Vojnoveterinarski zbornik, 1, str. 60-71. 8. Urošević M. i sar. (2014.): Varijabilnost morfolometrijskih parametara glave turskog pastirskog psa kangala. Zbornik kratkih sadržaja, Savetovanje agronoma, Trebinje, str. 65-66. 9. Urošević M., Latinović D. (1987.): Fenotipska varijabilnost važnijih svojstava telesne građe šarplaninca. Zbornik kratkih sadržaja svetovanja o jugoslovenskom ovčarskom psu-šarplanincu. Zbornik kratkih sadržaja, str. 17, Popova šapka. 10. Urošević M., Turina P., Stanivuković G., Jovanović M. (2002.) Balkanski pastirski psi., autorsko izdanje, Zemun, Srbija.

ТРОВАЊА ПАСА КАРБОФУРАНОМ – ПРИКАЗ СЛУЧАЈА

CARBOFURAN POISONING OF DOGS - CASE REPORT

*Биљана Ђурђевић, Радомир Ратајац, Бранкица Карталовић, Милена Самојловић,
Марко Пајић, Милош Пелић, Слободан Кнежевић, Владимир Полачек*

Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад

У свету се бележи пораст случајева намерних, нелегалних тровања животиња високо токсичним пестицидима. Један од најчешће коришћених карбаматних пестицида у сврху тровања нециљних врста јесте карбофуран. Карбофуран (2,3-динитро-2,2-диметилбензофуран-7-бензофуранил метилкарбамат) делује као инхибитор ензима ацетилхолинестеразе и изразито је неуротоксичан. Коришћен је као системски инсектицид, нематоцид и акарицид. Због своје високе токсичности и могућих негативних последица на целокупан биодиверзитет, у Европској унији је забрањен за употребу од 2007. године док је забрана употребе у нашој земљи ступила на снагу 2014. године. Упркос забрани употребе, одређене количине овог пестицида и даље су доступне и могу се пронаћи на нелегалном тржишту.

У току 2017. године, на Научном институту за ветеринарство у Новом Саду укупно је обдуковано и патоморфолошки прегледано 23 пса. Сумња на тровање пестицидима постављена је код 5 клинички здравих паса на основу изненадног угинућа, појаве нервних симптома, као и због налаза суспектног мамца пребојеног интензивно ружичастом бојом у непосредној близини угуинулих паса. Код свих паса, угинуће је наступило у року од 15-30 минута од појаве првих симптома. Током обдукције, прикупљени су узорци паренхиматозних органа - јетра, бубрези, као и садржај желуца, ради хемијских (токсиколошких) анализа.

Методом гасно-масене хроматографије (GC-MS), присуство карбофурана потврђено је у садржају дигестивног тракта код 3 паса. Просечне вредности детектованог карбофурана у узоркованом материјалу кретале су се од 2.228,9 до 9.797,5 mg/kg. На основу анамнестичких података, клиничке слике, обдукционих налаза и резултата лабораторијских испитивања са великом сигурношћу може се рећи да су угинуле јединке конзумирале контаминирани мамац.

Токсико-епидемиолошки подаци из већине земаља света указују да су намерна тровања кућних љубимаца карбофураном веома чест и значајан ветеринарски проблем. Злоупотреба пестицида доводи до дуготрајних негативних ефеката у животној средини и представља значајну опасност по здравље људи и животиња.

Кључне речи: карбофуран, пси, тровање

Захвалница: Истраживања су реализована према пројектима технолошког развоја ТР31084 и ТР31011, финансираних од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ТЕМАТСКО ЗАСЕДАЊЕ V

***СЛОБОДНЕ ТЕМЕ И ПРИЛОЗИ
ИЗ ПРАКСЕ***

ЕЛЕКТРОРИБОЛОВ – ВЕТЕРИНАРСКО-МЕДИЦИНСКИ,
КРИВИЧНО-ПРАВНИ И ЕКОЛОШКИ АСПЕКТИ

*ELECTROFISHING - VETERINARY-MEDICAL,
CRIMINAL-LEGAL AND ECOLOGICAL ASPECTS*

*Јелена Алексић¹, Милан Милијашевић², Александра Алексић Агелидис¹,
Јелена Бабић³, Славољуб Јовић¹, Радослава Савић Радовановић¹*

¹Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду;

²Институт за хигијену и технологију меса, Београд;

³Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад

Кратак садржај

Рибарство је значајна привредна грана у нашој земљи, а риба незаменљива намирница животињског порекла. На основу Закона о заштити и одрживом коришћењу рибљег фонда разликује се више врста риболова: привредни, рекреативни, спортски, риболов у научно-истраживачке сврхе и електрориболов, као посебна врста риболова у циљу изловљавања рибе ради порибљавања, спашавања са поплављеног подручја и у научно-истраживачке сврхе.

Електрориболов је техника узорковања рибе помоћу електричне струје и дејства електричног поља у циљу контроле њиховог кретања и/или имобилизације како би се омогућио њихов излов. Примена ове технике дозвољена је само у циљу истраживања када се прати величина одређене популације риба и утврђују присутне врсте у заједници, односно добија поуздана процена броја, односа дужине и масе и прираста риба у одређеним водотоковима.

Последњих година све је учесталија појава незаконитог и неконтролисаног риболова различитим недозвољеним начинима, алатима и средствима што за последицу има негативан утицај на живи свет река. Злоупотреба електрориболова приликом извршавања ове криминалне радње за циљ има излов већих количина рибе у кратком временском периоду са циљем стицања материјалне користи. На основу расположивих статистичких података кривично дело незаконитог риболова је учестала појава у слатководним екосистемима и једно од често пријављиваних кривичних дела против животне средине у Републици Србији.

У раду указано на све већу учесталост ове појаве у слатководним екосистемима Републике Србије, на штетно дејство електричне струје на рибе односно карактеристичне механичке и термичке повреде и значај ветеринара форензичара у случајевима сумње на извршење овог кривичног дела дефинисаног чланом 277 Кривичног законика Републике Србије.

Кључне речи: незаконит риболов, ветеринар форензичар, механичке и термичке повреде, морталитет риба

Увод

Рибарство је значајна привредна грана у нашој земљи, а риба незаменљива намирница животињског порекла. На основу Закона о заштити и одрживом коришћењу рибљег фонда (1) разликује се више врста риболова: привредни, рекреативни, спортски, риболов у научно-истраживачке сврхе и електрориболов, као посебна врста риболова у циљу изловљавања рибе ради порибљавања, спашавања са поплављеног подручја и у научно-истраживачке сврхе.

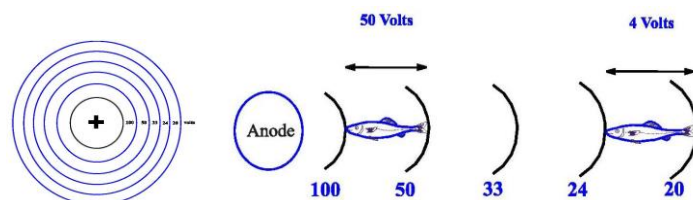
Електрориболов је техника узорковања рибе помоћу електричне струје и дејства електричног поља довољног интензитета да проузрокује јак неуролошки одговор (2) у циљу контроле кретања и/или имобилизације како би се омогућио њихов излов. Излов рибе дејством

електричне струје дозвољен је у циљу истраживања, односно мониторинга одређене популације риба и присутних врста у заједници када се добија поуздана процена њиховог броја, односа дужине и масе и прираста риба у одређеним водотоковима. Ова техника је данас широко распрострањена, ефикасна, лака за извођење и безбедна приликом правилне примене (3,4). Последњих година све је учесталија њена злоупотреба у циљу излова већих количина рибе у кратком временском периоду са циљем прибављања материјалне користи.

У периоду од 2016. до 2018. године на Катедру за судску ветеринарску медицину и законске прописе Факултета ветеринарске медицине у Београду по налогу Републичког ветеринарског инспектора достављено је више килограма рибе врста сом, смуђ, кечига, шаран, штука, амур, деверика, мрена и толстолобик, са сумњом да су изловљене употребом електричне струје.

Ефекти електричне струје на рибе

Основни принцип електрориболова је стварање електричног поља у води са циљем имобилизације риба, када плутају близу површине воде и могу мрежом лако да се уклоне из електричног поља. Већина риба се након излагања електричном пољу оријентише према аноди и са повећањем густине електричног поља оне јој се приближавају, а у непосредној близини аноде се имобилишу (5). Са повећањем удаљености од аноде изложене су мањој волтажи тако да ће на најудаљенију јединку деловати разлика потенцијала од 4 волта, а на најближу од 50 волти (Слика 1). Зона око аноде у којој је волтажа довољна да утиче на њих је тзв. ефективни распон електрориболова.



Слика 1. Шематски приказ деловања електричног поља на рибе (6)

Присилно кретање риба ка аноди као последица неконтролисаних и невољних конвулзија мишића назива се галванотакса и сматра се да је резултат директне стимулације централног и аутономног нервног система. Одговор риба на дејство електричног поља је сложен и варира у зависности од врсте примењене струје, њихове почетне оријентације у односу на електрично поље и густине поља (5).

У литератури су описане четири зоне утицаја електричног поља на рибе које се формирају у зависности од њихове удаљености од извора (7,8). Прва је зона индиферентности што је област у којој електрично поље не делује на рибе. Друга је зона репулзије или одбијања у којој осећају утицај поља које није довољног интензитета да би их привукло што резултира њиховим бекством или укопавањем по дну у зависности од врсте. Трећа је зона привлачења у којој се крећу ка електроди. У четвртој зони долази до појаве тетаничних грчева и/или наркозе када наступа њихова имобилизација. Када дође до појаве тетаније рибе су близу површине воде тако да могу лако да се уклоне из електричног поља. Период њихове омамљености и укочености траје 5 до 10 секунди. У овој фази јединке су имобилисане, мишићи ригидни, а респирација изостаје. Након имобилизације брзо се постављају у положај за кретање према напред и почињу нормално да пливају за 1 до 2 минута. За потпуни опоравак од деловања електричне струје потребно је 4 до 12 часова у зависности од количине лактата у крви и услова средине.

Повреде приликом електрориболова

Метода електрориболова се сматра релативно безбедном када се правилно примењује, али може да буде и извор настанка различитих врста повреда (9). Штетни ефекти уочени су код салмонидних врста крајем 1940-их година (10,11), а током касних 1980-их и 1990-их расте забринутост биолога по питању ефеката ове методе (12,13). Спроведена су бројна истраживања

углавном на салмонидама у којима је испитиван степен преживљавања, стопа раста, физиолошки ефекти, као и степен и врста повреда. *Sharber* и сар. (14) су претпоставили да је значајан фактор у настанку повреда кумулативно време излагања дејству струје и да контракције мишића које условљавају повреде кичме могу да настану у било које време након појаве електротаксе, односно да нису резултат интензитета поља или близине риба аноди, већ су у функцији времена њихове изложености деловању поља. Бројне студије су указале да поновљено излагање риба деловању електричног поља има негативне ефекте (15,16,17,18), при чему се са повећањем учесталости и броја излагања повећава и интензитет штетних дејстава (28).

На начин стимулације нервног система риба (19,20), појаву и тежину повреда, као и проценат морталитета (21,22,14,23) утиче и облик струјних таласа. Облик таласа наизменичне струје се сматра веома штетним и има ограничену употребу јер не изазива одговарајућу електротаксу неопходну за ефикасан електрориболов (10,24). Једносмерна струја је мање штетна и тренутни морталитет риба се ретко јавља (25). За електрориболов се препоручује примена континуиране и променљиве једносмерне струје ниске фреквенције 30 Hz (26,27,4,28) због ниже стопе повреда које настају дејством њихових таласа (4,28).

Повреде приликом излова рибе дејством струје огледају се у оштећењима кичменог стуба, мишића, нерава и ткива (29,30), промени боје коже (*branding*), интрамукуларним крвављењима у постраним мишићима, крвављењима у шкргама, урогениталном отвору, конгестији органа, физиолошким и бихевиоралним поремећајима (31,32). Повреде кичме настале дејством једносмерне струје обично се манифестују компресијом пршљенова, а дејство таласа наизменичне струје чешће условљава промену положаја пршљенова (34). Сматра се да фрактуре кичме могу да се избегну уколико уређај за електрориболов ради на довољно јаком напону да изазове наркозу, али и довољно слабом да се избегне тетанија (35,36,37). Међутим, студија *Sharber* и сар. (14) је указала да компресионе фрактуре кичме могу да настану у било које време по имобилизацији риба.

Физиолошки процес пливања риба представљен је контракцијом мишића једне стране, док су мишићи друге стране тела опуштени (38). Када се струјом истовремено стимулишу бели мишићи обе стране тела долази до њихове ексцитације, последичног увртања и компресије кичменог стуба, промене положаја или прелома пршљенова. *Lamarque* (19) је претпоставио да су повреде кичме последица јаких мишићних контракција насталих услед тетаније које условљавају повећану активност мишића и накупљање лактата у крви. Услед настале ацидозе, као последице кисеоничког дуга, може да уследи одложено угинуће уколико се довољном респирацијом лактат не уклони или уколико рибе не могу да се прилагоде његовим високим концентрацијама. По излагању електричном пољу ниво млечне киселине у крви риба се двоструко повећава, остаје висок током једног часа и враћа се на вредности пре излагања дејству струје за приближно 3 часа (39). Када концентрација лактата у крви достигне одређени ниво опоравак није могућ и угинуће наступа за 1 до 3 дана као последица респираторне инсуфицијенције (40,39,41).

Најчешћа локализација повреда кичме и последичних крвављења је у дорзално-антериорном делу грудне регије (12,26,23) због веће мишићне масе што је чини посебно осетљивом (19). Код салмонидних врста оштећења кичме су најчешће локализована на средини тела, између главе и репа (26,28). Ова врста повреда може да се установи патоморфолошким прегледом, палпацијом или рендгенском дијагностиком. У близини прелома могу да се уоче масивна интрамукуларна крвављења и бројна мања крвављења дуж тела риба. Обдукцијом и рендгенском дијагностиком електрориболовом изловљених пастрмки установљене су повреде кичме и са њима повезана крвављења код 44-67% риба (12). Засецањем постраних мишића уочено је растављено мишићно ткиво, а погођена област је сирове текстуре. Радиографски, повреде кичме су уочљиве и годину дана по електрориболову јер на местима повреде постоји значајна калцификација и привидна фузија пршљенова (25).

Већ споменута промена боје коже (*branding*) која може да се установи спољашњим прегледом (42) настаје као последица директног контакта тела рибе са електродама (19) или дилатацијом меланофора, пигментних ћелија, као резултат оштећења или стимулације нерава симпатикуса (26,20). Може да буде у вези са појавом и тежином повреда кичме (19,26), али изостанак промене боје коже не указује увек и на изостанак спиналних повреда (26,28). Облика је

обрнутог латиничног слова “V” и може да остане видљива кратак временски период, односно мање од недељу дана по електрориболову (26). На живим јединкама нестаје за 4 дана, а некада и раније (43). *Hudy* (44) је установио њихово постојање и 15 дана по излагању дејству електричне струје. Уколико је овим променама захваћена већа површина коже највероватније да постоји потпуна фрактура кичменог стуба (19). Модрице (*branding*) могу да представљају атриум за бактеријске и гљивичне инфекције и обично су у пределу дорзалног пераја где је највећа мишићна маса (45).

Крвављења у шкргама и урогениталном отвору код калифорнијске пастрмке први је описао *Nauck* (10). Код извесног броја риба уочени су и дилатирани крвни судови у близини урогениталног отвора, а код неких и протрузија црева. Прегледом унутрашњих органа уочава се изражена конгестија, накупљање крви око срца, као и бројни крвни угрушци или тромби. Физичка оштећења могу да буду очигледна, али акутни физиолошки поремећаји нису лако уочљиви и могу да имају штетне ефекте на живот и опстанак јединки дуго времена по излагању електрориболову (46). Неуроендокрине промене настале као резултат излагања дејству електричног поља доводе до промена у хематолошким и биохемијским параметрима (47) и огледају се у хипергликемији (48), повећаној концентрацији лактата у крви (49) и промени нивоа кортизола у плазми (50). Други параметри стреса укључују промене осмоларитета плазме, концентрације хлорида и протеина плазме, хематокрита, седиментације, леукоцитарне формуле и нивоа хемоглобина (51). Неки аутори су указали да је за потпуни физиолошки опоравак риба неопходно 24 часа (52), а други да опоравак од физиолошких и бихевиоралних ефеката електрориболова уследи после неколико сати или дана (53,17,54). Већина повреда се санира за 22 дана од излагања деловању струје, а за комплетан опоравак неопходно је 9 до 12 недеља (55). Настале повреде нису увек леталне, често се санирају, али имају потенцијал да утичу на понашање, здравље, раст, опстанак и размножавање (33), а на тај начин и на динамику популације риба.

На брзину настанка, степен тежине повреда, морталитет, као и ефикасност ове методе поред утицаја великог броја фактора значај имају и врста, величина, кондиција риба, услови окружења (проводљивост и дубина воде, температура, врста подлоге), тип електричног уређаја, интензитет примењене струје и интензитет поља, време излагања, оријентација риба у електричном пољу и карактеристике таласа (облик, фреквенција и висина импулса) и остали фактори.

Тежина и степен повреда и последични морталитет могу да буду специфични за врсту и да знатно варирају унутар и између врста (10,56) што се објашњава разликама у њиховој морфологији, физиологији, понашању и структури коштаног и мишићног система (23,42). Салмониде су подложније повредама и морталитету у односу на друге врсте риба (63,42). Посебно је осетљива калифорнијска пастрмка (*Oncorhynchus mykiss*) (44,57,58). У студијама спроведеним на калифорнијским пастрмкама изложеним дејству импулса једносмерне струје установљен је проценат морталитета од 78% (64), повреде кичме код 78% риба (64) и крвављења код 91% риба (26).

Рибе предаторе (нпр. *Salmonidae*, *Percidae*, *Centrarchidae*) је лакше ухватити у односу на биљоједу, а рибе дна и слабе пливаче релативно тешко. На дејство електричне струје отпорније су рибе са дебелим крљуштима (шаран) у односу на рибе са тањим, финим (пастрмка) или закржљалим крљуштима због малог отпора деловању електричне струје (59,60,42). Рибе које се мресте и територијалне рибе се мање плаше што омогућава несметано приближавање чамца за разлику од врста које функционишу у јату и лако се уплаше. Код неких врста може да се јави смањена издржљивост код пливања (54), летаргија и атипично понашање (61), смањена плодност (62) или поремећај у раду срца (30).

Једнократна изложеност деловању струје нема значајне ефекте на раст (65,66,67,18), али често понављано излагање може да га успори (15,16,18,28). Код поточне (*Salmo trutta*) и калифорнијске пастрмке (*Oncorhynchus mykiss*) смањена је стопа раста када су излагане дејству струје у интервалима од 2,5 месеца или краћим (15). Уколико су се опорављале у периоду од 3 месеца од последњег излагања дејству струје уочена је мала разлика или је није било због чега се не препоручује излагање пастрмки методи електрориболова у периоду краћем од 3 месеца (15).

Учесталост повреда и последични морталитет зависи и од величине риба односно разлика у мишићној маси и саставу мишића. Веће рибе имају развијенију мускулатуру односно тенденцију присуства већег процента белих мишићних влакана способних за јаче контракције што за последицу може да има повреде кичме и са њима повезана крвављења (19,68,23). Добри пливачи имају преко 50% мишићног ткива, а код салмонида мишићно ткиво чини приближно 60% укупне тежине (59). Повреде су учесталија појава код крупнијих јединки исте врсте (69, 28). *Fredenberg* (26) је указао да се повреде код мањих риба теже откривају, а *Henry* и *Grizzle* (70) су уочили фрактуре и код рибе млађи. Од величине риба зависи и неопходан праг за њихову имобилизацију (71,42). Веће рибе су лакше за улов јер се са порастом дужине јединки ствара већа разлика потенцијала што последично доводи до интензивнијих повреда и морталитета (59,63,42). Лабораторијски и теренски подаци указују на повећан морталитет риба са повећањем њихове величине само у случајевима дужег излагања дејству струје тако да је значај величине риба приликом електрориболова на настанак повреда и даље дискутабилан.

На степен повреда може да утиче и кондиција риба. Рибе боље кондиције су подложније настанку повреда услед јаких мишићних контракција у односу на јединке лошијег здравственог стања (69). *Stewart* (72) је указао да су значајни фактори за настанак повреда декалцификација изазвана мрестом и недостатак магнезијума и калцијума као последица лоше исхране.

Улога ветеринара форензичара

У случајевима сумње на незаконит риболов применом електричне струје када извршиоци овог кривичног дела најчешће користе импровизоване уређаје улога ветеринара форензичара је значајна у циљу препознавања извршења овог кривичног дела, правилне интерпретације доказа на суду и на тај начин санкционисања починилаца у сарадњи са полицијом и другим државним органима.

Када су у достављеним узорцима риба присутна незнатна крвављења, повреде кичме изостају и рендгенска дијагностика није неопходна. У супротном, када су присутна умерена и опсежна крвављења препоручује се рендгенска дијагностика (дорзална и латерална радиографска пројекција). У табели 1. приказани су критеријуми за процену крвављења и оштећења кичменог стуба риба изложених електрориболову.

Табела 1. Критеријуми за процену крвављења и оштећења кичменог стуба риба изложених електрориболову (45)

ПОВРЕДЕ	Градација степена повреда	КРИТЕРИЈУМИ
Унутрашња крвављења	0	Изостанак крвављења
	1	Незнатна крвављења у мишићима
	2	Умерена крвављења у мишићима дуж кичменог стуба и дужине један до два пршљена
	3	Опсежна крвављења у мишићима дуж кичменог стуба и дужине веће од два пршљена
Оштећења кичменог стуба	0	Изостанак оштећења кичме
	1	Компресија пршљенова
	2	Компресија и раздвајање пршљенова
	3	Фрактура једног пршљена или комплетна сепарација једног или два пршљена

Примарни узрок морталитета риба изловљених дејством струје је респираторна инсуфицијенција, крвављења, унутрашње повреде и трауме (10,19). Морталитет услед респираторне инсуфицијенције настаје неколико минута или неколико часова након

електрориболова (42). Тренутно угинуће риба може да буде последица тетаније у дужем периоду након прекида струје што спречава наставак дисања и доводи до угушења (23).

Електрориболов у Републици Србији

Незаконит риболов је санкциониран чланом 277 Кривичног законика РС који је сврстан у XXIV главу у оквиру кривичних дела против животине средине. Овим чланом је прописано да ко лови рибу или друге водене животиње на недозвољен начин односно недозвољеним средствима - експлозивом, електричном струјом, отровом, средствима за омамљивање или на начин штетан за размножавање тих животиња или којим се те животиње масовно уништавају казниће се затвором до 3 године. Казниће се и ко лови рибу или друге водене животиње веће биолошке вредности или у већој количини или при лову уништи већу количину риба или других водених птица. Улов и средства за риболов ће се одузети (73). Ово кривично дело може да буде учињено само са умишљајем као обликом кривице јер је умишљајем обухваћена свест о употребљеном средству као и начину на који се риба лови.

На основу Кривичног законика (73) и Закона о заштити и одрживом коришћењу рибљег фонда (1) лов рибе противно важећим прописима у Републици Србији у зависности од околности квалификује се као кривично дело или као прекршај. На рибарском подручју лов рибе је забрањен експлозивом и другим распрскавајућим средствима, харпуном, подводном пушком, струјом, хемијским и др. средствима која убијају, трују или омамљују рибу, као и држање алата и средстава за привредни и електрориболов од стране лица која нису овлашћена за њихово обављање. Риболов у научно-истраживачке сврхе могу да обављају организације регистроване за стручна и научна истраживања из области рибарства, ихтиологије или екологије копнених вода. Електрориболов у научно-истраживачке сврхе обавља се у присуству рибочувара на основу дозволе коју издаје министар, а на територији аутономне покрајине - надлежни покрајински орган (члан 49). Изузетно може да се обавља у случајевима изловљавања рибе ради порибљавања и њиховог спашавања са поплавленог подручја. Могу да га обављају само стручно оспособљена лица за ту врсту риболова са апаратом који треба да доведе до реверзибилне електронаркозе риба, а да не доведе до њиховог угинућа. Апарат могу да поседују само научно-истраживачке и стручне организације овлашћене од стране министра (1). У делу казних одредаби Закона о заштити и одрживом коришћењу рибљег фонда (1) за прекршај ће се казнити физичко лице новчаном казном од 5.000 до 150.000 динара ако користи или поседује апарат за електрориболов (члан 49).

Незаконит риболов је веома распрострањен у свету и представља глобални проблем са негативним економским, социјалним, еколошким и правним последицама. Последњих година уочен је пораст случајева сумње на извршење овог кривичног дела у слатководним екосистемима и у нашој земљи што за последицу има негативан утицај на живи свет река. На основу расположивих статистичких података кривично дело незаконитог риболова једно је од често пријављиваних кривичних дела против животне средине у Републици Србији чије последице погађају рибљи фонд, економски развој, али и безбедност хране и људи. На основу података рибочуварске службе ЈП "Војводинашуме" у периоду од 2014. године до маја 2018. године број поднетих пријава због употребе законом забрањених електро уређаја је тринаест. Тај број је многоструко већи јер су за подношење пријаве неопходни материјални докази односно опрема за излов струјом коју починиоци када увиде да ће бити ухваћени бацају у реку и на тај начин избегавају одговорност пред законом. У 2017. години корисници рибарских подручја поднели су 6 кривичних пријава од тога 3 пријаве од стране МУП-а Србије и до данас није окончан ниједан кривични поступак.

Закључак

У циљу спречавања деловања извршилаца овог кажњивог дела неопходна је системска координација надлежних државних органа. Поред сарадње рибочувара, републичких ветеринарских инспектора, полиције, тужиштва и судова за доношење осуђујуће одлуке окривљеном од великог значаја је резултат форензичке експертизе инкриминисане рибе.

Литература

1. Закон о заштити и одрживом коришћењу рибљег фонда, Службени гласник РС бр. 128 (2014). 2. Vibert R., 1967a. General report of the working party on the applications of electricity to inland fishery biology and management. Pages 3-51 in R. Vibert, editor. Fishing with electricity: its application to biology and management. Fishing News Books, Farnham. UK. 3. Bohlin T., Hamm S., Heggebert T.G., Rasmussen G., and Saltveit S.J., 1989. Electrofishing-theory and practice with special emphasis on salmonids. *Hydrobiologia* 173:9-43. 4. Dalbey S.R., McMahon T.E., and Fredenberg W., 1996. Effect of electrofishing pulse shape and electrofishing-induced spinal injury on long-term growth and survival of wild rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* 16:560-569. 5. Sharber, N. G., & Sharber Black, J. (1999). Epilepsy as a unifying principle in electrofishing theory: a proposal. *Transactions of the American Fisheries Society*, 128(4), 666-671. 6. www.wrwc.org/documents/electrofishing_manual.pdf (01.07.2018.). 7. Regis J., Pattee E., and Lebreton J.D., 1981. A New Method for Evaluating the Efficiency of Electric Fishing. *Archiv fur Hydrobiologie*. Stuttgart, 93, 1, 68-82. 8. Snyder D.E., 1992. Impacts of electrofishing on fish. Report of Colorado State University Larval Fish Laboratory to US Dept of Interior Bureau of Reclamation, Salt lake City, Utah, and Glen Canyon Environmental Studies Aquatic Coordination Team, Flagstaff, Arizona. 9. Bohl R.J., Henry T.B., and Strange R.J., 2010. Electroshock-induced mortality in freshwater fish embryos increases with embryo diameter: a model based on results from 10 species. *Journal of Fish Biology* 76:975-986. 10. Hauck F.R., 1949. Some harmful effects of the electric shocker on large rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 77:61-64. 11. Pratt V.S., 1955. Fish mortality caused by electrical shockers: *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 84 (1954), p. 93-96. 12. Sharber N.G., and Carothers S.W., 1988. Influence of electrofishing pulse shape on spinal injuries in adult Rainbow Trout. *North American Journal of Fisheries Management* 8:117-122. 13. Clement M., and Cunjak R.A., 2010. Physical injuries in juvenile Atlantic Salmon, Slimy Sculpin, and Blacknose Dace attributable to electrofishing. *North American Journal of Fisheries Management* 30:840-850. 14. Sharber N.G., Carothers S.W., Sharber J.P., de Vos J.C., Jr., and House D.A., 1994. Reducing electrofishing-induced injury of rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* 14:340-346. 15. Gatz A.J., Jr., Loar J.M., and Cada G.G., 1986. Effects of repeated electroshocking on instantaneous growth of trout: *North American Journal of Fisheries Management*, vol. 6, p. 176-182. 16. Gatz A.J., Jr., and Adams S.M., 1987. Effects of repeated electroshocking on growth of bluegill x green sunfish hybrids: *North American Journal of Fisheries Management*, vol. 7, p. 448-450. 17. Mesa M.G., and Schreck C.B., 1989. Electrofishing markrecapture and depletion methodologies evoke behavioral and physiological changes in cutthroat trout: *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 118, p. 644-658. 18. Schneider J.C., 1992. Field evaluations of 230-V AC electrofishing on mortality and growth of warmwater and coolwater fish: *North American Journal of Fisheries Management*, vol. 12, p. 253-256. 19. Lamarque P., 1990. Electrophysiology of fish in electric fields. Pages 4-33 in I. G. Cowx and P. Lamarque, editors. *Fishing with electricity, applications in freshwater fisheries management*. Fishing News Books, Oxford, UK. 20. Sharber N.G., and Black J.S., 1999. Epilepsy as a unifying principle in electrofishing theory: a proposal. *Transactions of the American Fisheries Society*. 128:666-671. 21. Sharber N.G., and Carothers S.W., 1988. Influence of electrofishing pulse shape on spinal injuries in adult rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* 8:117-122. 22. McMichael G.A., (1993). Examination of electrofishing injury and short-term mortality in hatchery rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* 13, 229-233. 23. Dolan C.R., and Miranda L.E., 2004. Injury and mortality of warmwater fishes immobilized by electrofishing. *North American Journal of Fisheries Management* 24:118-127. 24. Vibert R., 1963. Neurophysiology of electric fishing. *Transactions of the American Fisheries Society* 92:265-275. 25. Miranda L.E., and Dolan C.R., 2004. Electrofishing Power Requirements in Relation to Duty Cycle. *North American Journal of Fisheries Management* 24:55-62. 26. Fredenberg W., 1992. Evaluation of Electrofishing-Induced Spinal Injuries Resulting from Field Electrofishing Surveys in Montana. Helena, Montana, Montana Department of Fish, Wildlife and Parks. 27. Snyder D.E., 1995. Impacts of electrofishing on fish. *Fisheries* 20(1):26-27. 28. Ainslie B.J., Post J.R., and Paul A.J., 1998. Effects of pulsed and continuous DC electrofishing on juvenile rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* 18:905-918. 29. McMichael G.A., 1993. Examination of electrofishing injury and short-term mortality in hatchery rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* 13:229-233.

- 30.**Hollender B.A., and Carline R.F., (1994). Injury to wild brook trout by backpack electrofishing. North American Journal of Fisheries Management 14, 643–649. **31.**Cho G.K., Heath J.W., and Heath D.D., (2002). Electroshocking influences Chinook salmon egg survival and juvenile physiology and immunology. Transactions of the American Fisheries Society 131, 224–233. **32.**Schreer J.F., Cooke S.J., et Connors K.B., Electrofishing-induced cardiac disturbance and injury in rainbow trout, Journal of Fish Biology (2004) 64, 996–1014. **33.**Dolan C.R., Miranda L.E., and Henry T.B., 2002. Electrofishing for crappies: electrical settings influence immobilization efficiency, injury, and mortality. North American Journal of Fisheries Management 22:1442–1451. **34.**Stewart P.M., 1974. Recent developments in electrical fishing research. Scottish Fisheries Bulletin 40:9-12. **35.**Vibert R., editor. 1967b. Fishing with electricity: its application to biology and management. Fishing News Books, Farnham, England. **36.**Sternin V.G., Nikonorov I.V., and Bumeister Yu.K., 1972. Electrical fishing. Pishchevaya Promyshlennost', Moskva. Translated from Russian by E. Vilim, Israel Program for Scientific Translations, 1976, Jerusalem. **37.**Novotny D., and Priegel G.R., 1974. Electrofishing boats. Wisconsin Department of Natural Resources Technical Bulletin 73. **38.**Nursall J.R., 1956. The lateral musculature of swimming fish. Proceedings of the Zoological Society of London 126: 127-143. **39.**Schreck C.B., Whaley R.A., Bass M.L., Maughan O.E., and Solazzi M., 1976. Physiological responses of rainbow trout to electric shock. J. Fish. Res. Board Can. 33(1):76-84. **40.**Black E.C., 1958. Hyperactivity as a lethal factor in fish. J. Fish. Res. Board Can. 15(4):573-586. **41.**Emery L., 1984. The physiological effects of electrofishing. Cal-Nev Wildlife Transactions. **42.**Reynolds J.B., 1996. Electrofishing. Pages 221-253 in B.R. Murphy and D.W. Willis, editors. Fisheries techniques, 2nd edition. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. **43.**Holmes R., McBride D.N., Viavant T., and Reynolds J.B., 1990. Electrofishing induced mortality and injury to rainbow trout, Arctic grayling, humpback whitefish, least cisco, and northern pike: Alaska Department of Fish and Game, Division of Sport Fish, Fishery Manuscript, no. 9, Anchorage. **44.**Hudy M., 1985. Rainbow trout and brook trout mortality from high voltage AC electrofishing in a controlled environment. North American Journal of Fisheries Management 5:475-479. **45.**Panek F.M., and Christine D.L., 2011: Electrofishing and the Effects of Depletion Sampling on Fish Health: A Review And Recommendations For Additional Study. **46.**Barton B.A., and Dwyer W.P., 1997. Physiological stress effects of continuous- and pulsed-DC electroshock on juvenile bull trout: Journal of Fish Biology, vol. 51, p. 998–1008. (Erratum 1998: Journal of Fish Biology, vol. 52, p. 654.). **47.**Bracewell P., Cowx I.G., and Uglow R.F., 2004. Effects of handling and electrofishing on plasma glucose and whole blood lactate of *Leuciscus cephalus*. Journal of Fish Biology 64: 65-71. **48.**Specter, J. L. and C. B. Schreck. 1980. Stress responses to transportation and fitness for marine survival in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smolts. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 37:765-769. **49.**Driedziec W.R., and Kiceniuk J.W., 1976. Blood lactate levels in free-swimming rainbow trout (*Salmo gairdneri*) before and after strenuous exercise resulting in fatigue. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 33:173-176. **50.**Barton B.A., Schreck C.B., and Sigismondi L.A., 1986. Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile Chinook salmon. Transaction of the American Fisheries Society 115:245-251. **51.**Barton B.A., and Grosh R.S., 1996. Effect of AC electroshock on blood features in juvenile rainbow trout. Journal of Fish Biology 49:1330- 1334. **52.**Barton B.A., and Dwyer W.P., 1997. Physiological effects of continuous and pulsed DC electroshock on juvenile bull trout. Journal of Fish Biology 51:998-1008. **53.**Horak D.L., and Klein W.D., 1967. Influence of capture methods on fishing success, stamina, and mortality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Colorado: Transactions of the American Fisheries Society, vol. 96, p. 220–222. **54.**Mitton C.J.A., and McDonald D.G., 1994a. Consequences of pulsed DC electrofishing and air exposure to rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*): Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 51, p. 1791–1798. **55.**Schill D.J., Elle F.S., 2000. Healing of electroshock-induced hemorrhages in hatchery rainbow trout. North American Journal of Fisheries Management 20(3): 730-736. **56.**Pratt V.S., 1954. Fish mortality caused by electrical shockers. Transactions of the American Fisheries Society 84:93-96. **57.**Reynolds J.B., and Kolz A.L., 1988. Electrofishing injury to large rainbow trout. North American Journal of Fisheries Management 8:516-517. **58.**Snyder D.E., 1992. Impacts of electrofishing on fish. Report of Colorado State University, Larval Fish Laboratory to U.S. Bureau of Reclamation, Salt Lake City, Utah, and Glen Canyon Environmental Studies Team, Flagstaff, Arizona. **59.**Allen-Gil S., 2000. Discussion and summary. In: Allen-Gil S ed. New Perspectives in Electrofishing. Corvallis, Oregon, U.S.

Environmental Protection Agency, National Health Effects Research Laboratory. Pp. 47-54. **60.** Mahoney B.D., Inverson T.K., Mathews S.B., 1993. Synopsis and Annotated Bibliography on Electrofishing with Special Reference to Columbia River Squawfish. Seattle, WA, University of Washington. 58p. **61.** Sigismondi L.A., and Weber L.J., 1988. Changes in avoidance response time of juvenile Chinook salmon exposed to multiple acute handling stresses. Transactions of the American Fisheries Society 117:196-201. **62.** Muth R.T., and Ruppert J.B., 1996. Effects of two electrofishing currents on captive razorback suckers and subsequent egg-hatchery success. North American Journal of Fisheries Management 16:473-476. **63.** Brousseau C.M., Randall R.G., Clark M.G., 2005. Protocol for Boat Electrofishing in Nearshore Areas of the Lower Great Lakes: Transect and Point Survey Methods for Collecting Fish and Habitat Data, 1988 to 2002. Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences 2702. Burlington, Ontario, Great Lakes Laboratory for Fisheries and Aquatic Sciences. 106p. **64.** Meyer C., Miller D., 1995. Electrofishing: Theory and Application. Cheyenne, WY, Wyoming Game and Fish Department. **65.** Halsband E., 1967. Basic principles of electric fishing, in Vibert, R., ed., Fishing with electricity, its application to biology and management: London, Fishing News (Books) Ltd., p. 57-64. **66.** Maxfield G.H., Lander R.H., and Liscom K.L., 1971. Survival, growth, and fecundity of hatchery-reared rainbowtrout after exposure to pulsating direct current: Transactions of the American Fisheries Society, vol. 100, p. 546-552. **67.** Ellis J.E., 1974. Survival, growth, and feed conversion of channel catfish after electronarcosis: Proceedings of the Annual Conference Southeastern Association of Game and Fish Commissioners, vol. 27 (1973), p. 624-629. **68.** Helfman G.S., Collette B.B., and Facey D.E., 1997. The diversity of fishes, 3rd edition. Blackwell Scientific Publications, Malden, Massachusetts. **69.** Thompson K.G., Bergersen E.P., Nehring R.B., and Bowden D.C., 1997. Long-term effects of electrofishing on growth and body condition of brown and rainbow trout. North American Journal of Fisheries Management 17:154-159. **70.** Henry T.B., and Grizzle J.M., 2003. Electroshocking-induced injuries in newly transformed juvenile fish. Journal of Aquatic Animal Health 15:147-157. **71.** Zalewski M., and Cowx I.G., 1990. Factors affecting the efficiency of electric fishing, in Cowx, I.G., and Lamarque, P., eds., Fishing with electricity, applications in freshwater fisheries management: Oxford, England, Fishing News Books, Blackwell Scientific Publications, Ltd., p. 89-111. **72.** Stewart, L., 1967, An investigation into the effects of electric fishing equipment on salmon and sea-trout within the area of Lancashire River Board: Lancashire River Board Report, Lancaster, England. [This reference was cited by Lamarque (1990) but not included in the corresponding bibliography. According to I. Cowx, who provided this bibliographic data, the title is the same as for Stewart's 1962 publication which was included in the bibliography. **73.** Кривични законик РС, "Сл. гласник РС", бр. 85/2005, 88/2005 - испр., 107/2005 - испр., 72/2009, 111/2009, 121/2012, 104/2013, 108/2014 и 94/2016.

УПОТРЕБА ЛЕКОВА У ПЧЕЛАРСТВУ СРБИЈЕ

USE OF MEDICINAL PRODUCTS IN THE SERBIAN BEEKEEPING

Снежана Милосављевић, Иван Милош

Пољопривредна школа са домом ученика "Соња Маринковић", Пожаревац

Увод

Пчеларство Републике Србије је врло специфично по многим факторима, јер док се с једне стране итекако прате европски и светски трендови, употреба лекова, као можда један од најзначајнијих аспеката у квалитетном менаџменту, остаје велика непознаница пчеларима, а колегама који пружају услуге пчеларима проблем при проналажењу квалитетне алтернативе за велики број нерегистрованих лекова и суплемената који су у понуди на тржишту Србије.

Кључне речи: лек, суплемент, ноземоза, вароза, органско пчеларење.

Најважнији појмови

Употреба лекова и медицинских средстава у Србији регулисана је законом објављеним у Службеном гласнику РС 30/2010. Закон о лековима и медицинским средствима члан 14 овог закона дефинише лек. Ветеринарски лек је такође дефинисан и у члану 23. овог закона и члану 32. И посебно интересантан члан је о забрани промета 134, став 8, ветеринарског медицинског производа који се производи од супстанци које се не могу користити за производњу овог лека.

Тема

Пошто сви лекови морају бити регистровани у Агенцији за лекове, у складу са важећим законом, такође то морају бити и лекови који се користе у пчеларству. Лекови које користимо у пчеларству делимо на:

- регистроване за употребу у пчеларству,
- регистроване за ветеринарску употребу, а не у пчеларству (нпр. амитраз је ектоантипаразитик за животиње, али не и за ектопаразите на инсектима односно пчелама),
- нерегистроване и
- забрањене.

Избор лека би увек требало да буде заснован на тачно постављеној дијагнози. Нажалост пчелари, махом лековима набављеним без рецепта и уз употребу нерегистрованих лекова или суплемената, третирају пчелиње заједнице стихијски, неплански, нестручно и безмало по правилу без постављене дијагнозе.

Правилна дијагноза се састоји у следећем: неопходно је узети одговарајући узорак пчела (30 до 50 пчела када се сумња на болест или 300 до 500 пчела када нема идеје о врсти болести) или 10x10 цм легала и послати у референтну лабораторију, а све по препорукама из програма мера Министарства пољопривреде, Управе за ветерину.

Регистрована средства у Р. Србији за употребу у пчеларству су: Bee Vital Hive Clean, Apilivevar, Apigard, Varotom, Furmitom, CheckMite, оксална киселина и мравља киселина за употребу против варозе. Против ноземозе је регистрован само Nozevit, а Mucostop против кречног легла.

Прегледом списка регистрованих средстава за употребу у пчеларству за борбу против варозе јасно видимо да нема најчешће и упадљиво највише коришћеног лека међу пчеларима – амитраза. Његова употреба јесте дозвољена у неким земљама ЕУ, али у Србији није регистрован,

те није ни дозвољен. Са великим жаљењем можемо и морамо да констатујемо да недостатак регистрације овог средства не значи да се он не употребљава, већ да је његов промет у нелегалним токовима што је проблем не само са финансијске стране (гледајући интерес државе), већ много више што апсолутно нико не врши његову контролу или надзор током паковања, транспорта, чувања и продаје на мало. Не треба наглашавати да оваква средства у промету немају никакву декларацију или је она лоше написана, без јасно написаних мера опреза при коришћењу, знакова тровања, указивања прве помоћи при тровању, а о каренци да не говоримо.

Савремено пчеларство ЕУ, а у складу са тим и у Србији, базира се на употреби органских средстава који у себи садрже тимол, у разним формулацијама, оксалну и мрављу киселину, а тек неко средство које је регистровано као лек, који су искључиво летвице које се постављају у пчелиње заједнице са одређеним временом које проводе у њима.

Борба против вароозе органским средствима даје врло ограничен резултат ако се користи самостално, те је поред коришћења ових средстава неопходно водити посебан менаџмент на пчелињаку који се пре свега своди на обавезну употребу антиварозних подњача и што бржу замену саћа – не дужу од три године.

Лечење ноземозе представља по себи посебан изазов из два разлога – биолошке карактеристике узročника, те недостатка ефикасног средства којим се не би финансијски угрозио сам пчелињак. У Србији се на тржишту налази само једно средство за употребу током лечења ноземозе, али и његова употреба даје ограничен ефекат ако се не спроводи истовремено са побољшаним хигијенским условима на пчелињаку, као и са престанком апитехничких грешака које се дешавају и које су или окидач за настанак болести или омогућавају задржавање узročника на пчелињаку у дугом временском периоду.

Закључак

Данас у Србији је поремећен однос броја регистрованих средстава за борбу против најзначајнијих паразитских и заразних болести и оних који нису регистровани, нажалост у корист нерегистрованих. Оно што је најжалосније јесте да пчелари преко 80% користе управо ова нерегистрована средства (лекове и суплементе). Током ове кратке, али врло озбиљне и циљане едукације колегама се јасно скреће пажња која средства су регистрована, који су правилни начини употребе, са свим позитивним и негативним аспектима за свако средство појединачно, као и којим средствима се могу постићи исти или бољи резултати у односу на оне који нису регистровани, а које пчелари по навици користе. На основу овога, колеге ће моћи да пруже квалитетну алтернативу у понуди средстава за борбу против најзначајних болести и подизањем нивоа знања, свести и савести пчеларима да помогну да дођу до већег профита, а са ветеринарског аспекта да се омогући квалитетна борба у превенцији и куративи болести пчела и болести легла.

Литература

1. Закон о лековима и медицинским средствима ("Службени гласник РС", бр. 30/2010).
2. Закон о ветеринарству ("Сл. гласник РС", бр. 91/2005 и 30/2010).
3. Правилник о условима за промет на велико лекова и медицинских средстава, подацима који се уписују у Регистар издатих дозвола за промет на велико лекова и медицинских средстава, као и начину уписа ("Службени гласник РС", бр. бр. 10/2012).
4. Правилник о садржају захтева и документације, као и начину добијања дозволе за стављање лека у промет ("Службени гласник РС", бр. 30/2012).
5. Правилник о начину оглашавања лека, односно медицинског средстава (Сл.гласник РС.бр.79/2010).
6. Правилник о садржају и начину обележавања спољњег и унутрашњег паковања лека, додатном обележавању, као и садржају упутства за лек ("Службени гласник РС", бр. 41/2011).
7. Правилник о начину пријављивања, прикупљања и праћења нежељених реакција на лекове ("Службени гласник РС", бр. 64/2011).
8. Правилник о условима, садржају документације и начину одобрења измене или допуне дозволе за стављање лека у промет ("Службени гласник РС", бр. 30/2012).
9. Правилник о условима за производњу лекова, садржају обрасца, дозволе за производњу лека и Регистру издатих дозвола за производњу лекова ("Службени гласник РС", бр. 18/2012).
10. Директива комисије 2001/82/ЕЦ, од 6.11.2001. о прописима Заједнице који се односе на ветеринарске лекове.
11. Директива комисије 2009/9/ЕЦ, од 10. фебруара 2009., која допуњује

29. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ

Директиву 2001/82/ЕЦ Европског парламента и Савета о декларацији Европске заједнице која се односи на лекове за употребу у ветеринарској медицини. **12.**Смернице добре произвођачке праксе ("Сл. гласник РС" бр. 28/2008).

ОПСЕРВАЦИЈА ЛЕЗИЈА НА ПАПИЛАМА КРАВА

OBSERVATIONS ON TEAT LESIONS IN COWS

*Ивана Давидов, Миодраг Радиновић, Иван Галић, Михајло Ердељан,
Зорана Ковачевић, Аннамариа Галфи*

Департаман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду

Кратак садржај

Када је врх папиле (сисе) у добром стању, а кожа папиле мека и гипка, тада је папила у најбољој позицији да обезбеди природну баријеру од инвазије микроорганизама који доводе до упалних процеса у вимену. Истраживање је спроведено на четири газдинства у Војводини. Краве су биле холштајн-фризијске и сименталске расе. Насумично је одабрано 108 крара, односно прегледано је 432 папиле (n=432) вимена крара. Од укупно 432 папиле са сва четири газдинства, без видљивих лезија било је 183 односно 42,36% свих папила. Лезије које су уочене јавиле су се на 249 папила, односно 57,64% свих папила. Највећи број лезија јавио се на предњој десној и предњој левој папили вимена крара.

Кључне речи: папила, лезија, виме, крара

Увод

Запаљење вимена крара и даље представља једну од најактуелних тема данашњице. Промене које се јављају на папилама доприносе развоју упалних процеса у вимену крара (1). Изглед врха папиле уврштен је међу кључне факторе одбране вимена крара од узрочника који доводе до запаљења. Два су важна разлога што су обољења вимена честа код високомлечних крара: стална наизменична смена деловања хормона и сам анатомско-топографски положај и грађа вимена (2). Искуство у пракси упућује на то да су дуже и дебље папиле знатно осетљивије на неповољне спољашње утицаје као што су повреде односно лезије (3). Краве са дужином папила већом од 4,5 cm и ширином од 3 cm (или већом) имају много више упалних процеса вимена (4). Док је ризик од нове интрамамарне инфекције већи код крара са кратким папилама, а код крара са дужим или просечним овај ризик је мањи (5). Код тањих папила ниво соматских ћелија по четврти вимена је нижи, док дебље папиле имају већи ниво (6). Промене спољашњег изгледа папиле након машинске муже последица су апарата за мужу, средстава за дезинфекцију папила, смртотине у зимским месецима и повреде (7). Појава фистула на папилама ствара погодну подлогу за настанак инфекција (3). Праве фистуле, резултат перфорирајуће лезије, као и псеудомлечне фистуле (урођене) могу довести до поремећаја дотока млека, односно тешкоћа приликом муже (8). Нагази, одеротине, плиће или дубље ране, расцепи, откидање сегмената папиле и стенозе, лезије су које треба што пре санирати јер доводе до инфекција и пропадања ткива ако се запусте (3). Лезије папила представљају механички изазвана отворена или затворена раздвајања ткива папиле, различитог степена растезања. Оне се јављају у зависности од начина држања животиња и осталих фактора који поспешују њихов настанак, а могу да захвате 3-6% крара у запату. Код држања у стајама, велики број лезија папила, узрокован је ударима папака, које животиње саме себи нанесу или их добију од суседне животиње. Запуштени, предугачки оштри папци изазивају тешке лезије код великих, ниско постављених, едематозних вимена и великих папила. Код држања везаних животиња много чешће долази до лезија него код слободних животиња у стајама. Прекратко везивање, сувише згуснуте животиње, глатке површине за лежање, оштре ивице решетке знатно

доприносе повећању броја лезија, нарочито онда када високе ограде на јаслама или поводац око врата отежавају устајање животиње која лежи или ако су краве немирне. Парцијално или потпуно откидање папиле, нагњечена велике површине или кидана ткива представљају најкомпликованије лезије, како по питању прогнозе, тако и по питању терапије (8). Циљ овог рад је да се након опсервације папила вимена крава у шталским условима утврди степен оштећења папила која су прва одбрана вимена од утицаја штетних агенаса.

Материјал и методе

Истраживање је спроведено на четири газдинства високомлечних крава у Војводини. Сва четири газдинства се налазе на територији севернобачког округа и то: два газдинства у Новом Жеднику, једно у Бачком Душанову и једно у Ђурђину. Краве су биле црно-беле и црвено-беле холштајн-фризијске и сименталске расе. Краве су се разликовале у старости, количини произведеног млека, а приближно су биле исте телесне масе. Све карави су биле држане везане у шталским условима, у којима су били задовољавајући зоохигијенски услови. На све четири фарме једном годишње се вршила контрола исправности апарата за мужа. Мужа се на свим газдинствима спроводила машински и радници су испуњавали хигијенске прописе муже. Насумично са сва четири газдинства је укупно одабрано 108 крава, односно је прегледано 432 папиле (n=432) вимена крава. Свака прегледана папила је измерена лењиром и процењен је степен лезија на папили и њеном врху. Сви добијени резултати су обрађени стандардним статистичким методама применом програма Microsoft Office Excel 2007.

Резултати

Укупно са сва четири газдинства прегледано је 108 крава, односно 432 папиле (n=432). Након мерења дужине вимена свих 108 крава добијене су средње вредности њихових дужина, које се налазе у табели I.

Табела 1. Просечна дужина папила вимена крава са сва четири газдинства

Број прегледаних папила крава	Просечна дужина предње леве папиле (cm)	Просечна дужина задње леве папиле (cm)	Просечна дужина предње десне папиле (cm)	Просечна дужина задње десне папиле (cm)
432	6,67	6,19	6,72	6,06

Након анализе добијених дужина папила вимена крава датих у табели I, уочава се да је просечно најдужа папила била предња десна са 6,72 cm, затим предња лева са 6,67 cm, па задња лева 6,19 cm и најкраћа је била задња десна са просечном дужином од 6,06 cm.

Прегледом свих 432 папиле вимена крава са сва четири газдинства, уочено је да су без видљивих лезија биле 183 папиле, што представља 42,36% свих прегледаних папила вимена. Лезије које су уочене јавиле су се на 249 папила, односно 57,64% свих прегледаних папила вимена крава (табела II).

Табела 2. Преглед папила вимена крава са и без видљивих лезија, са сва четири газдинства

Папиле	Број прегледаних папила	Без видљивих лезија	Са видљивим лезијама
Укупно	432	183	249
% папила	100	42,36%	57,64%

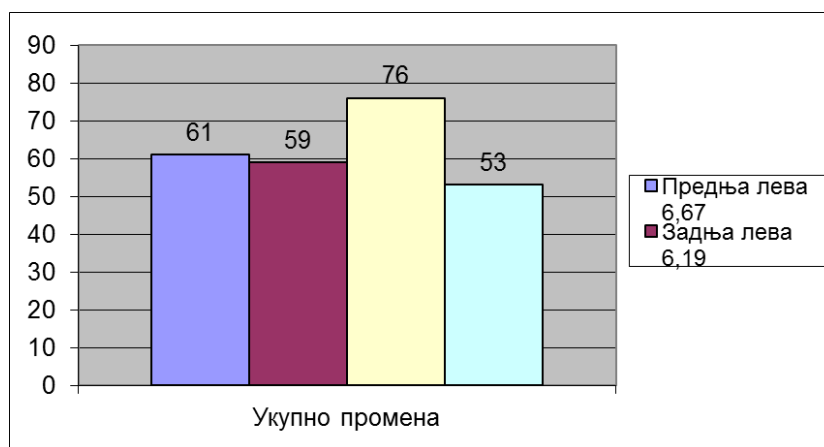
У табела III су дати збирни резултати лезија на папилама вимена крава у односу на просечну дужину папиле са сва четири газдинства.

Табела 3. Укупан број лезија на папилама у односу на просечну дужину папиле

Папила	Предња лева	Задња лева	Предња десна	Задња десна
Просечна дужина (cm)	6,67	6,19	6,72	6,06
Укупно лезија	61	59	76	53

На основу резултата у табели III, највећи број лезија на папилама јавио се на предњој десној и предњој левој, које су уједно и дуже од остале две папиле вимена крава.

Однос промена и дужине папиле по четвртима вимена са сва четири газдинства приказан је на графикану 1.



Графикон 1. Однос лезија на папилама и дужине папиле вимена крава

Дискусија

Оцена стања сисног ткива и врха сисе може бити коришћена за оцену квалитета муже, опреме за мужу, стања добробити животиња, менаџмента на фармама и ризика од настајања нових инфекција. Већи део проблема који утиче на здравствено стање вимена може се избећи правилном и на време обављеном мужом, одржавањем хигијене амбијента, прибора, крава и музача, контролом рада музача пре и после муже, провера исправности апарата, редовном дезинфекцијом, измучивање вимена до краја без резидуалног млека и остатка млека око сисног отвора (добра подлога за почетак упалног процеса) и здравственом заштитом и правовременом применом третмана у циљу спречавања инфекција крава и радника (3). Још 1986. године у свом истраживању (9) су приметили да се највећи проценат лезија јавља на задњим левим папилама, док је у овом истраживању уочено да се највећи број лезија јавља и на задњој левој (31,03%), али и на предњој десној (31,03%). Због различите старосне категорије крава у оквиру овог истраживања, примећено је да се већи број промена јавља код старијих крава, што се може приписати машинској мужи.

Закључак

На основу добијених резултата истраживања може се закључити да се највећи број лезија јавио на предњој десној и предњој левој папили вимена крава и да поред добре неге и бриге о вимену крава, правилне дезинфекције пре и након муже, као и редовном контролом апарата за мужу, долази до појаве лезија на папилама вимена крава, које могу и које представљају улазна врата за насељавање патогних микроорганизама у виме крава.

Литература

1. Давидов И, Радиновић М, Бобош С, Машић З, Лалошевић Д, 2011, Однос различитих дебљина кератинског слоја ductus papillaris-а и инфилтрата леукоцита у паренхиму вимена крава, Ветеринарски гласник, 65(5-6), 359-366. 2. Миљковић В, 2006, Порођиљство. Завод за уџбенике и наставна средства, Београд, 127-144. 3. Јаковљевић Д, 2011, Утицај морфолошких и функционалних особина сиса на пражњење вимена (први део), Билтен, Пољопривредна саветодавна и стручна служба Јагодина, 2, 3-4. 4. Singh RS, Bansal BK., Gupta DK, 2014, Udder health in relation to udder and teat morphometry Holstein Friesian × Sahiwal crossbred dairy cows, Trop Anim Health Prod, 46(1), 93-8. 5. Robert A, Roussel P, Bareille N, Ribaud D, Sérieys F, Heuchel V, Seegers H, 2008, Risk factors for new intramammary infections during the dry period in untreated dairy cows from herds using selective dry cow therapy, Animal, 2(2), 247-54. 6. Zwertvaegher I, De Vliegher S, Verbist B, Van Nuffel A, Baert J, Van Weyenberg S, 2013, Short communication: Associations between teat dimensions and milking-induced changes in teat dimensions and quarter milk somatic cell counts in dairy cows, J. Dairy Sci., 96(2), 1075-80. 7. Timms L, Faust M, Ackermann M, Kehrli M, 1998, A year in the life of a teat end, National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings, 74-75. 8. Бобош С, Видић Б, 2005, Млечна жлезда преживара. Научни институт за ветеринарство, Нови Сад. 9. Agger JF, Hesselholt M, 1986, Epidemiology of teat lesions in a dairy herd. I: Description of the incidence, location and clinical appearance, Nord Vet Med, 38(4), 209-19.

ЕМИСИЈА ШТЕТНИХ ГАСОВА НА ФАРМАМА ГОВЕДА*

GREENHOUSE GASSES EMISSION IN DAIRY FARMS

*Мира Мајкић, Миодраг Радиновић, Марко Цинцковић,
Бранислава Белић, Ивана Лакић, Нада Плавица*

Департаман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду
*Овај резултат је део пројекта TP31062

Кратак садржај

Амонијак представља основну компоненту штетних гасова који узрокују тзв. ефекат стаклене баште, а млечне краве се сматрају највећим емитерима. Европа и САД представљају највеће изворе емисије амонијака. Сматра се да 70-80% од укупне емисије потиче из сточарске производње. У објектима за смештај животиња, код којих се вентилација решава природним путем, очекује се највећа концентрација амонијака, па превентиву у емисији треба усмерити у овакве објекте. Фактори који утичу на емисију амонијака у објектима за смештај животиња су температура, релативна влажност ваздуха, рН вредност стајњака, састав пода, степен вентилације и годишња доба. Мере у циљу редукције штетних гасова првенствено амонијака као потенцијално најопаснијег, подразумевају: редукцију концентрације уреје у урину корекцијом оброка, одабир адекватног материјала за изградњу пода који онемогућава испаравање урина, успоравање хидролизе уреје у излученом урину, контролу рН стајњака, као и оптималну измену ваздуха унутар објекта.

Кључне речи: Емисија штетних гасова, млечне краве, мере за редукцију,

Увод

Током последњих неколико деценија интензивна сточарска производња је довела до веће потрошње хемијских ђубрива. Рораст потрошње је настао због већег броја стоке која се користи у производне сврхе. Уз већ присутну повећану потрошњу хемијског ђубрива додатни проблем представља коришћење високопротеинских хранива у исхрани млечних говеда, а све у циљу повећане производње хране анималног порекла. Као последица свега наведеног уз, неадекватно складиштење стајњака и коришћење пашњака за исхрану животиња, долази до повећане емисије штетних гасова у атмосферу. Неконтролисана емисија штетних гасова првенствено емисија амонијака, доводи до еутрофизације и закишељавања земљишта (1,2). Европа и САД представљају највеће изворе емисије амонијака. Сматра се да 70-80% укупне емисије потиче из сточарске производње, а такође се сматра да су млечне краве највећи загађивачи (3,4,5). Просечна годишња емисија амонијака у атмосферу износи између 1,5 до 55,5 кг/говечету (6). У објектима за смештај животиња, код којих се вентилација решава природним путем, очекује се највећа концентрација амонијака, па превентиву у емисији треба усмерити у овакве објекте.

Извори и особине амонијака у сточарској производњи

Када се амонијак нађе у атмосферском ваздуху он заједно са азотном киселином прелази у форму амонијум-нитрата који се у атмосферском ваздуху налази у облику аеросола. Амонијум-нитрат заједно са осталим честицама из ваздуха негативно утиче на здравље људи и животиња. Уколико се амонијак депонује у очуваним екосистемима може довести до њихове деградације као и до деградације земљишта (7). Ослобођени амонијак има релативно кратак животни век - од

неколико сати до пар дана. Дужина распада зависи од тога да ли је ослобођени амонијак у форми гаса или у облику честица. Сматра се да амонијак који се налази у облику аеросола доводи до еутрофикације земљишта. Штетни ефекти амонијака могу бити примећени и на удаљености од 100 Km од извора емисије (8). Агенција за заштиту животне средине (3) сматра да амонијак представља основни контаминант ваздуха. Формиране честице амонијум-нитрата у атмосферском ваздуху су прекурзори за формирање тзв. PM_{2.5} честица (*Particular matter* - честица дијаметра 2.5 микрона), које могу узроковати респираторне проблеме. Преживари представљају специфичну врсту животиња када се посматра метаболизам протеина и искоришћавање азота из хранива. Протеини из хране се у бурагу разлажу до аминокиселина, под утицајем буражне микрофлоре. Приликом катаболизма протеина ослобађа се и амонијак. Један део амонијака користе микроорганизми за своје потребе, а део амонијака који не искористе микроорганизми бурага ресорбује се и доспева до јетре. У јетри се врши конверзија амонијака до урее. Формирана уреа се затим ресорбује у системску циркулацију, одакле један део одлази до млечне жлезде, а један део се излучује урином. Количина урее која се налази у излученом урину зависи количине унетог Na и K, односно зависи од запремине излученог урина, а 60-80% азота који потиче из урина се налази у облику урее. Садржај азота који се налази у облику урее зависи и од састава оброка и износи 59-89% за животиње хранене силажом, уз додавање и протеинских суплемената (9). Степен разградње протеина хране у бурагу креће се од 40-50%. Са порастом концентрације разградивог протеина у исхрани повећава се концентрација излученог азота. Концентрација излученог азота се код млечних крава креће 2-20 g/l⁻¹. Феџесом и урином се излучује 25-35%, 19% се излучује млеком, док се око 2% депонује у телесне резерве. Азот који потиче из стајског ђубрива се лако може конвертовати у амонијак, посредством бактеријске активности. Посредством ензима уреазе микроорганизми из феџеса реагују са уреом која потиче из урина и конвертују је у амонијак врло брзо након излучивања. Сматра се да је хидролиза урее комплетна два сата након уринирања при оптималној температури од 10 °C (8).

Фактори који утичу на емисију штетних гасова у објекту

Фактори који утичу на емисију амонијака у објектима за смештај животиња су температура, релативна влажност ваздуха, рН вредност стајњака, састав пода, степен вентилације. Висока температура и висока релативна влажност ваздуха, олакшава емисију амонијака. Температура утиче на биотичку разградњу и испаравање посредством активности бактерија (8). Студија (10) је показала да је емисија амонијака већа у летњим месецима. Разлог за овакав резултат може бити објашњен вишом температуром која стимулише микробиолошку активност у феџесу и урину, што као крајњи резултат има повећану концентрацију амонијака у ваздуху услед испаравања. У студији (11) је испитан квалитет ваздуха у фармама затвореног типа током сва четири годишња доба. Капацитет фарме је био 675 говеда. Дужина објекта је 122 m док је висина износила 33 m. Резултати су показали да је најнижа концентрација амонијака измерена током марта месеца, повећавала се током маја, а највећа концентрација забележена је у јуну. Током најтоплијег дела године концентрација штетних гасова је била нижа. Разлог за овакав резултат може бити објашњен употребом вентилатора у току јула и августа. Већи проток ваздуха смањује концентрацију ослобођеног амонијака. Резултати (12) показују да се концентрација амонијака у летњим месецима креће између 36,4-23,3 ppm/дану/говечету. Оглед је рађен у затвореним објектима са капацитетом од 2.100 млечних крава. Истраживачи (13) су навели да је просечна концентрација амонијака на фарми са 550 говеда током зиме износила 240 ppm, а током лета се повећала на 1140 ppm. Фарме су биле затвореног типа. Висока рН вредност стајњака повећава концентрацију излученог амонијака у атмосферском ваздуху. Повећање рН утиче на тзв. биотички индуковану емисију, и сматра се да рН вредност 7-8 олакшава дифузију излученог амонијака (8). На концентрацију амонијака у ваздуху утиче и тип пода. Фарме у којима се одваја феџес од излученог урина у значајној мери редукују испаравање ослобођеног амонијака. На емисију амонијака утиче и степен вентилације у објекту, а истраживања (14,15,16) су показала да постоји позитивна веза између концентрације емитованог амонијака и степена вентилације у објекту. Уколико проблем вентилације у објекту није решен на адекватан начин, количина емитованог амонијака може бити повећана за 50% (17). На емисију амонијака велики утицај има и састав

оброка. У студији (9) је примећено да се концентрација излученог амонијака повећава за 15% уколико се количина кабасте хране у оброку повећа са 50% на 70%. У огледу (18) је нађено да однос кабасте и концентроване хране у оброку у сразмери 48:52 не утиче значајно на емисију амонијака. Водоник-сулфид је токсичан гас који може довести до леталног исхода уколико се нађе у високим концентрацијама у ваздуху. Резултати (18) показују емисију водоник-сулфида у концентрацији од 0,02-5,7 ppm у објектима затвореног типа. Резултати (19) показују да се концентрације водоник-сулфида крећу у концентрацији од 0-2 ppm зими и од 0-15 ppm лети на фарми са 550 говеда у затвореном систему држања. У неким земљама (Минесота) препоручена концентрација водоник-сулфида се креће 30 ppm (20). Студија (20) је испитала концентрацију угљен-диоксида и водоник-сулфида током године. Резултати су показали да не постоје значајна одступања током године. Нешто веће концентрације измерене су током августа месеца. Слични резултати су приказани и у истраживањима (6). Истраживања (Плавша и сар., 2017. необјављени резултати) рађена на две фарме капацитета 44 (Фарма Б) и 20 говеда (Фарма А) сименталске расе нису показали повећане вредности амонијака, угљен-диоксида и водоник-сулфида у односу на препоручене вредности (табела 1). Оглед је рађен током августа 2017. године. Индекс термалног комфора (ТНІ) крава био је изнад оптималних вредности. Разлог за наведене резултате може бити објашњен добро регулисаним микроклиматским условима, као и редовним изјубравањем објекта.

Табела 1. Измерене и препоручене концентрације штетних гасова изражене у ppm

Измерене вредности (ppm)			Препоручене вредности (ppm)
	Фарма А	Фарма Б	
ТНІ	>70	>70	
NH ₃	10	13	20
CO ₂	2,5	3,5	10
H ₂ S	300	100	3.000

Мере за редукацију штетних гасова

Мере у циљу редукације штетних гасова првенствено амонијака као потенцијално најопаснијег подразумевају: редукацију концентрације урее у урину корекцијом оброка, одабир адекватног материјала за изградњу пода који онемогућава испаравање урина, успоравање хидролизе урее у излученом урину, контролу рН стајњака, оптималну измену ваздуха унутар објекта. Корекција исхране подразумева коришћење хранива са ниским садржајем азота. Коришћењем оваквих хранива концентрација излученог амонијака може се смањити за 40%. Смањење концентрације амонијака у објектима могуће је постићи испирањем површине пода стаје. Препорука је да се површина пода испира са 50 l воде/дану/животињи, на сваких два стата. Оваквим протоколом могуће је смањити концентрацију излученог амонијака за 34%. Скраћење фреквенце испирања подова (један сат након уринирања) не би имало значаја на смањење концентрације, с обзиром да хидролиза урее настаје у просеку два сата након уринирања. Недостаци оваквог начина редукације огедају се у томе да би се морала пратити фреквенца уринирања животиње, што са практичног аспекта није функционално (20). Успоравање процеса хидролизе урее могуће је постићи инхибицијом ензима уреазе. Као најбољи показатељ инхибитора уреазе показао се раствор формалдехида. Испирањем површина пода раствором формалдехида, постигнута је редукација амонијака за 50% код објеката са равним подовима и 87% код подова у облику сова V. Препоручене количине формалдехида су 34 l воденог раствора. Као успешни инхибитор активности уреазе наводи се и раствор хлороводоничне киселине. Ниска вредност рН површине пода уз додатак водених раствора киселина се показало као ефикасан метод редукације амонијака. Сматра се да вредност рН 4-4,5 може редуковати концентрацију амонијака за 37%. Додатном ацидификацијом је могуће постићи редукацију за 60%. Као корективна мера наводи се и редовно изјубравање објеката уз адекватни ситем вентилације. Оваквим начином организације рада у објекту, могуће је смањити концентрацију емитованог монијака за 10-20%. Ефикасан

систем измене ваздуха је један од значајних фактора којим се између осталог регулише и концентрација емитованих штетних гасова. Препоручује је се да брзина вентилације по крави телесне масе 450 kg у зимском периоду износи 2,8 m³/минути, односно да у летњем периоду износи 5,7 m³/мин. Оптимална брзина струјања ваздуха би требало да износи од 0,1-0,3 m/s. Одржавањем оптималних микроклиматских услова у објектима могуће је постићи редукацију штетних гасова за 40% (20).

Закључак

Амонијак представља главну компоненту штетних гасова одговорних за тзв. ефекат стаклене баште. Млечне краве се сматрају највећим емитерима амонијака у атмосферу. Фактори који утичу на емисију амонијака су температура, релативна влажност ваздуха, рН вредност стајњака, састав пода и многи други. Сматра се да је највећа емисија амонијака присутна у објектима са лошим микроклиматом (неадекватна температура, повећана релативна влажност ваздуха, лоша вентилација). Као мере за редукацију емисије амонијака наводе се редукација концентрације урее у урину корекцијом оброка, одабир адекватног материјала за изградњу пода који онемогућава испаравање урина, успоравање хидролизе урее у излученом урину, контролу рН стајњака, и оптималну измену ваздуха унутар објекта.

Литература

1. Monteny G.J, Schulte D.R, Elzing A. E, Lamaker J.J, 1998, A conceptual mechanistic model for the ammonia emission from cubicle dairy cow houses, Transactions of the ASAE 41, 193–201.
2. Erisman J.W, A Bleeker, 1997, Emission concentration and deposition of acidifying substances. In: G.J. Hey, J.W. Erisman (Eds.) Studies in Environmental Research 69, Elsevier, Amsterdam, p. 21–82.
3. USEPA, 2000. USEPA, National Air Pollution Trends. 1990–1998, USEPA.
4. Pain B.F, Van der Weerden T.J, Chambers B.J, Phillips V.R, Jarvis S.C, 1998, A new inventory for ammonia emissions from UK agriculture, Atmospheric Environment, 32, 309-313.
5. Hutchings N.J, Sommer S.G, Andersen J.M, Asman WA, 2001, A detailed ammonia emission inventory for Denmark, Atmospheric Environment, 35, 1959-1968.
6. Mukhtar S, Mutlu A, Lacey R. E, Parnell J, Seasonal ammonia emissions from a free-stall dairy in central Texas, Journal of the Air and Waste Management Association, 59, 613-618.
7. Pinder R.W, Pekney N.J, Davidson C.I, Adams P.J, 2004, A process-based model of ammonia emissions from dairy cows: improved temporal and spatial resolution, Atmospheric Environment, 38, 1357-1365.
8. Ishler V, 2004, Nitrogen, ammonia emissions and the dairy cow, Nutrient Management College of Agricultural Sciences, Pennsylvania State University, 04-87.
9. Burgos S.A, Fadel J.G, DePeters E.J, 2007, Prediction of ammonia emission from dairy cattle manure based on milk urea nitrogen: Relation of milk urea nitrogen to urine urea nitrogen excretion, Journal of dairy science, 90, 5499-5508.
10. Hristov A. N, Hanigan M, Cole A, Todd R, McAllister TA, Ndegwa P.M, Rotz A, 2001, Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots, Canadian journal of animal science, 91, 1-35.
11. Zhao L.Y, Brugger M.F, Manuzon R.B, Arnold G, Imerman E, 2007, Variations in air quality of new Ohio dairy facilities with natural ventilation systems, Applied engineering in agriculture, 23, 339-346.
12. Mutlu, A, Mukhtar S, Capareda S.C, Boriack C.N, Lacey R.E, Shaw B.W, Parnell C.B, 2004, A process-based approach for ammonia emission measurements at a free-stall dairy. In 2004 ASAE Annual Meeting (p. 1), American Society of Agricultural and Biological Engineers.
13. Schmidt D. R, Jacobson L. D, Janni K. A, 2002, Continuous monitoring of ammonia, hydrogen sulfide and dust emissions from swine, dairy and poultry barns. In 2002 ASAE Annual Meeting (p. 1), American Society of Agricultural and Biological Engineers.
14. Maximov N.V, 2000, Character of ammonia formation and emission in piggeries. "Ecology and Agricultural Machinery". V 2, Ecological aspects of plant and livestock production technologies. [In Russian], SZNIIMESH publisher, St. Petersburg, 243-247.
15. Gustafsson G, K-H Jeppsson, J Hultgren, J.O Sannö, 2003, Techniques to Reduce the Ammonia Release from a Cowshed with Tied Dairy Cattle, In: Proceedings of the international symposium on "Gaseous and Odour Emissions from Animal Production Facilities, Horsen 1-4 June 2003. 239-248; <http://www.agrisci.dk/jbt/spe>.
16. Jeppsson K-H, 2003, Diurnal variation in ammonia, carbon dioxide and water vapour emission from a deep litter house for fattening pigs. In: Proceedings of the international

symposium on "Gaseous and Odour Emissions from Animal Production Facilities, Horsens 1-4 June 2003. 131-139. <http://www.agrisci.dk/jbt/spe>. **17.** Gallmann E, E Hartung, T Jungbluth, 2003, Long-term study regarding the emission rates of ammonia and greenhouse gases from different housing systems for fattening pigs – final results. In: Proceedings of the international symposium on "Gaseous and Odour Emissions from Animal Production Facilities, Horsens 1-4 June 2003, 122-130 <http://www.agrisci.dk/jbt/spe>. **18.** Agle M, Hristov A. N, Zaman S, Schneider C, Ndegwa P, Vaddella V. K, 2010, The effects of ruminally degraded protein on rumen fermentation and ammonia losses from manure in dairy cows, Journal of dairy science, 93, 1625-1637. **19.** Battye W, Aneja VP, Roelle PA, 2003, Evaluation and improvement of ammonia emissions inventories, Atmospheric Environment, 37, 3873-3883. **20.** Wood S, D Schmidt, K Janni, L Jacobson, C Clanton, S Weisburg, 2001, Odor and air emissions from animal production systems. ASAE Paper No. 014043. St. Joseph, Mich.: ASAE.

МИКРОБИОЛОШКА ИСПРАВНОСТ ВОДЕ У ПРИМАРНОЈ ПРОИЗВОДЊИ

MICROBIOLOGICAL SAFETY OF WATER IN PRIMARY PRODUCTION

Весна Калаба, Бојан Голић, Тања Илић

ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“ Бања Лука, Република Српска

Кратак садржај

Здравствено безбједна вода представља основу здравог живљења и један је од приоритета у примарној здравственој заштити. Безбједност подразумева микробиолошки, физичкохемијски и радиолошки исправну воду, довољне количине воде и њену континуирану испоруку. Због великог епидемиолошког значаја воде, чији је утицај непосредан и путем које се могу добити разне заразне болести, или унијети штетне и опасне хемијске материје, неопходно је, у циљу заштите здравља људи, контролисати здравствену исправност воде за пиће.

Циљ истраживања је утврђивање микробиолошке исправности воде која се користи за пиће, али и за потребе прехранбене индустрије, као и за напајање животиња.

Резултати истраживања су показали да је у периоду 2015 - 2017. године микробиолошки прегледано 584 узорка воде, од чега је 26,20% узорака било незадовољавајуће.

Кључне ријечи: водоснабдијевање, микробиолошка исправност

БЕСПИЛОТНЕ ЛЕТЕЛИЦЕ (ДРОНОВИ) У ЗАШТИТИ И СПАСАВАЊУ
ЖИВОТИЊА У ВАНРЕДНИМ СИТУАЦИЈАМА

*DRONES IN PROTECTING AND RESCUING ANIMALS IN EMERGENCY
SITUATIONS*

Драган Живанов¹, Михајло Вићентијевић², Славољуб Јовић¹, Драган Баџић¹

¹Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду;

²Научни институт за ветеринарство Србије, Београд

Кратак садржај

Технички напредак у развоју беспилотних летелица (дронова) последњих година све је евидентнији, како квантитативно, тако и квалитативно. О могућностима употребе наведених средстава у заштити и спасавању животиња увелико се и озбиљно размишља, а део тога се у пракси већ и спроводи. Употреба беспилотних летелица (дронова) далеко је јефтинија и често практичнија од коришћења авиона и хеликоптера, јер се могу лако транспортовати и не захтевају велика новчана средства за одржавање, транспорт, складиштење и чување. Данас у свету постоји велики број произвођача беспилотних летелица (дронова) различите врсте, величине, облика и намене - од минијатурних, до средњих или већих, односно за професионалну или аматерску употребу. С тим у вези и Србија настоји да у складу са својим потребама и могућностима одржи корак са развијеним светом. Беспилотне летелице (дронове) могу се користити у рату, у ванредним ситуацијама и ванредним догађајима у миру. Опремају се камерама, различитим врстама сензора и другом опремом, што зависи од задатка који треба да се обави. Командант штаба за ванредне ситуације може наредити употребу наведених средстава за извиђање терена из ваздуха приликом елементарних (временских) непогода ради прикупљања основних података за процену ситуације/угрожености људи и материјалних добара, сточног фонда и др. (код поплава, бујица, суша, земљотреса, лавина, дуготрајних изразито ниских температура, одрона, клизишта, олујног невремена, града, пожара, РБХ акцидената), као и за праћење спровођења плана заштите и спасавања животиња односно за друге задатке. Употреба беспилотних летелица (дронова) све више ће се рефлектовати на многим пољима људске делатности (посебно у пољопривреди). Надамо се да ће то бити пре свега на добробит човека. Међутим, могућа је и њихова злоупотреба. У том смислу неопходно је такве активности правовремено зауставити или онемогућити у самом зачетку.

Циљ овог рада јесте да укаже на нове могућности заштите и спасавања животиња уз помоћ савремених техничких средстава која су до скоро била само у домену научне фантастике. У раду је коришћена дескриптивна метода, односно резултати истраживања објављени у научним и стручним часописима и другим релевантним публикацијама (метода анализе садржаја). Такође су коришћени и подаци доступни са интернет страница неких компанија која производе ова средства односно испитују могућности њихове употребе, или већ пружају одређене услуге у наведеној области.

Кључне речи: беспилотне летелице (дронове), ванредне ситуације, животиње, заштита и спасавање

Увод

Беспилотна летелица (БПЛ) је ваздухоплов којим се управља даљинским преносом сигнала са земље или који лети самостално по унапред задатим параметрима. Беспилотне летелице су возила у стручној литератури дефинисане као даљински управљане летелице или летелице без пилота са роботским системом управљања. У основном значењу реч је о уређају који омогућује да навигатор или пилот-оператер даљински контролише беспилотну летелицу или обезбеђује да она лети самостално по унапред програмираној путањи, као самоусмеравани ентитет и разликују се од самоуправљивих или даљински навођених ракета (1). Највише се примењују у војсци и полицији. Беспилотна летелица се још дефинише и као ваздушно возило које не носи људског оператера, користи погон и аеродинамичке силе да обезбеди подизање возила, може аутономно да лети или се даљински усмерава, може бити потрошна или јој је употреба вишекратна, а може да носи и смртоносни или несмртоносни терет (1). Крстареће ракете се не сматрају беспилотним летелицама, јер попут многих других вођених ракета, само возило је оружје које се не може поново користити, иако је и беспилотно и у неким случајевима даљински вођено (1).

Реч - дрон (енгл. трут), на српски језик се преводи као пчела, обад или зујалица. Строго технички гледано, то су теле- и радио управљиви или аутономни роботски системи на разним возилима. Могу бити уграђени у ваздухопловне системе и беспилотне летелице, користе се као мете за увежбавање гађања у ваздуху, могу се користити под водом помоћу даљинског управљања (каблом, радио или неким другим системом), а могу бити и обична теренска возила без возача. Конструисани су и нано- и мини дронови, микроскопске величине или величине неколико центиметара. Најчешће такви дронови имају облик неке летеће животиње: слепи миш, колибри, лептир, стршљен и слично (1). Без обзира на међусобне разлике, беспилотне летелице или дронови већ су нашли многобројне начине примене у различитим пољима људске делатности - науци, војсци, полицији, цивилној заштити, инспекцији, привреди (рударству, пољопривреди, туризму, грађевинарству), спорту, архитектури, уметности, медијима, подводној археологији и многим другим. Њима се може даљински управљати и помоћу мобилног телефона и таблета, а мањи дронови без проблема могу да лете и у затвореном простору.

Употреба беспилотних летелица или дренова далеко је јефтинија и често практичнија од коришћења авиона и хеликоптера у рату односно ванредним ситуацијама у миру, могу се лако транспортовати и не захтевају велика новчана средства када су у питању њихово одржавање, транспорт, складиштење и чување. Данас у свету постоји велики број произвођача беспилотних летелица (дренова) различите врсте, величине, облика и намене, од минијатурних до средњих или већих односно за професионалну или аматерску употребу. Могу да лете краће или дуже време (до 7 часова) зависно од капацитета батерија односно врсте погона, домета до 150 км, а у висину до 6 км (видети Orbiter, Aeronautics, Израел). Њихове летне и друге карактеристике ће се временом још више побољшавати. Поред основних делова за погон и лет, опремају се уређајима и сензорима који им омогућавају да лете и ноћу (нпр. кроз шуму уз помоћ ултразвука попут слепих мишева) а неки уз то, могу да плутају на води, да се крећу под водом, изроне и поново полете у ваздух. Србија је такође на листи произвођача беспилотних летелица (Пегаз, Врабац, Стршљен) за војне и полицијске потребе, али и потребе цивилне заштите за извиђање терена на коме је проглашена ванредна ситуација услед елементарних (временских) непогода, техничко-технолошких акцидентата и катастрофа, и посебно у случају РБХ контаминације са трансграничним преносом, на или преко наше територије, односно ако је у питању ратни сукоб у суседним земљама или ширих размера. На Другом ваздухопловном самиту југоисточне Европе 2018. год. у Београду, представљене су три нове беспилотне летелице које тренутно развија Српски композитни технолошки тим (Serbian Composite Technology Team-СТТ) и то: ХАПС Пупин, Никола Тесла 155 и Никола Тесла 161 (видети: Матуновић Петар, Southeast Europe Aviation Summit, Belgrade, 2018).

Могућности употребе беспилотних летелица (дренова) у заштити и спасавању животиња

За адекватну процену угрожености животиња на подручју на коме је проглашена ванредна ситуација и с тим у вези ажурирања акционог плана заштите и спасавања истих, важно је што пре утврдити стварно стање на терену. Дакле, шта се у реалном времену дешава са домаћим

и/или дивљим животињама од значаја за људски опстанак и живот. То је у надлежности штаба за ванредне ситуације територијално-политичке заједнице, прецизније: помоћника команданта штаба за заштиту и спасавање животиња - војног или цивилног доктора ветеринарске медицине (ДВМ), који је на челу тимова или екипа од 3 до 5 људи (опремљених заштитном одећом и обућом, средствима потребним за лечење и збрињавање животиња, средствима за ДДД, возилима, чамцима и другим средствима по потреби). Уколико нема ДВМ на располагању, може га заменити агроном-сточар као вођа тима или екипе за заштиту и спасавање животиња. Тимови остварују задатке самостално и у сарадњи са власницима или држаоцима животиња на погођеној/угроженој територији.

Командант штаба за ванредне ситуације може наредити употребу беспилотне летелице (дрона) у горе наведеном смислу, са циљем реализације ближих задатака:

- извиђање терена из ваздуха приликом елементарних (временских) непогода ради увида односно прикупљања основних података и процене ситуације код поплава, бујица, олујног невремена, земљотреса, вулканске активности, одрона и клизишта, суша, пожара, експлозија, РБХ акцидента на нуклеарним, хемијским и другим индустријским постројењима, односно ако су у питању транспорт и акциденти с тим у вези, тег и друге опасности по људе и животиње (криминал у вези са животињама, биотероризам);

- праћење спровођења плана акције заштите и спасавања животиња, контрола и евентуална корекција свих непходних радњи, мера и поступака с тим у вези;

- проналажење животиња уз помоћ опто-електронских средстава (сензори, камере) уграђених на беспилотним летелицама (дроновима) дању, у отежаним условима видљивости или ноћу, и у свим годишњим добима;

- праћење кретања и понашања животиња у природи на отвореном, односно тренутни увид у бројност и опште стање животиња;

- надзор и чување животиња и хране за животиње од крађе, паљења и других незаконитих радњи;

- маркирање односно обележавање животиња ради праћења њиховог кретања, врсте и степена угрожености;

- узимање узорака ткива животиња (нпр. за ДНК анализу);

- праћење кретања и понашања животиња у затвореном простору тј. у објектима за смештај и држање (шталама, оборима, (изложбеним) халама);

- праћење здравственог стања животиња дроном (преко уграђених сензора) у објектима за сталан или привремени смештај животиња;

- утврђивање и праћење безбедности (стања) самих објеката за смештај и чување животиња;

- успављивање животиња пушком (пиштољем) за успављивање која је монтирана на дрону;

- хватање животиња мрежом коју дрон избацује из ваздуха на отвореном простору;

- евакуација мањих животиња дроном са угроженог подручја (до 10 кг тежине);

- достављање мање, основне количине лекова, средстава и опреме ветеринарским екипама или тимовима ДВМ, који учествују у заштити и спасавању животиња на (неприступачном или опасном) терену;

- достава хране за животиње (бале сена) или воде, у мањем обиму, неопходне за преживљавање животиња;

- достављање узетих узорака (делова тела и сл.) сумњивих животиња ради дијагностичких испитивања у одговарајуће ветеринарско-медицинске установе и лабораторије;

- проналажење лешева уинутих домаћих и дивљих животиња и нешкодљиво уклањање лешева мањих животиња (дивљачи, нпр. дивљих свиња, јелена и др.);

- откривање насуканих морских сисара и других морских животиња или њихових лешева дуж обале;

- праћење стања мора и морске обале ако је у питању постојање или сумња на РБХ контаминацију (изливена нафта, отпад од пластике, отрови у мору и сл.), односно контрола заштићеног еколошко-риболовног појаса (на мору, рекама и језерима);

- праћење здравственог стања морских животиња, морских корала и коралних гребена уз помоћ подводних дрона и узимање потребних узорака за лабораторijske анализе;
- транспорт мањих (излечених) животиња на сигурнија места, у прихватилишта, зоо-вртове или поновно пуштање у природну средину на копну или у води;
- спровођење мера ДДД распршивањем одговарајућих средстава дроном из ваздуха;
- за ликвидацију изузетно опасних, оболелих, сумњивих и агресивних животиња (које нападају или би представљале реалну опасност по живот за спасилачке тимове или екипе, укључујући и екипе ДВМ), ватреним оружјем уграђеним на дрон;
- достављање противотрова у случају уједа отровних животиња, екипама хитне медицинске помоћи на терену;
- откривање и детекција РБХ контаминације терена, ваздуха и воде, као и самих животиња помоћу дрона са уграђеним одговарајућим уређајима у затвореним објектима или на отвореном простору (на испаша) и
- обављање других задатака по потреби, зависно од ситуације на терену.

Употреба беспилотних летелица и дрона у пољопривреди

Без намере да шире улазимо у ову проблематику, наводимо само основну примену:

- агродроновима (са ГПС навигацијом, камерама, разноврсним сензорима и сл.) могуће је брзо снимање и праћење стања пре свега пољопривредног земљишта, и с тим у вези утицаја времена и елементарних (временских) непогода на пољопривредне културе, посебно када су у питању суше, пожари, поплаве, одрони и клизишта, (еолске) ерозије тла, град и олујно невреме, дуготрајне изразито ниске температуре-мраз и друго;
- откривање присуства великог броја глодара и других штеточина на пољопривредним површинама, баштама и мањим усевама, односно местима где се складишти сточна храна (силоси и сл.), као и увид у стање објеката за складиштење хране за животиње;
- откривање биљних болести, биљних и других штеточина на пољопривредним површинама, у шумама, баштама и виноградима, те праћење њиховог стања у циљу сузбијања и спречавања штете;
- запрашивање усева из ваздуха са релативно ниске висине, односно рационална и прецизна употреба пестицида, хербицида и минералних ђубрива;
- откривање пластичног и другог отпада односно загађивача животне средине, на или у близини засада и усева односно (речних) рибњака;
- праћење подводним дроновима стања и евентуалног загађења акваторије, посебно мора и морских животиња и животиња у узгоју на отвореном (аквакултура);
- праћење стања земљишта (нпр. влаге и других значајних параметара);
- праћење система за наводњавање и одводњавање и бројних других параметара који су значајни за несметан раст и развој пољопривредних култура. Тако нпр. дрон опремљен одговарајућим сензорима у само једном дану може да информативно обради и пошаље потребне податке (светски лидер у производњи софтвера за навигацију и обраду снимака је фирма Drone Deploy) за површину и до 200 хектара (видети Биосенс, Нови Сад и Ољача М, Могућности употребе беспилотних летелица у пољопривреди, Пољопривредни факултет, Београд).

Друге могућности употребе беспилотних летелица (дрона)

Временом се отварају и друге, бројне могућности употребе беспилотних летелица или дрона. Конструисани су дрони по облику, величини и боји идентични појединим врстама птица грабљивица (соко, јастреб, орао) који се могу употребити за растеривање јата других птица које наносе штету пољопривредним усевама или растеривање птица у околини великих аеродрома како не би ометале полетање и слетање авиона.

У ловству и ловном туризму, употребом дрона се може сагледати какво је стварно стање у ловишту, кроз бројно стање животиња, тренутну локализацију, активност и понашање, да ли им прети опасност по живот и здравље (откривање и праћење криволоваца, криминал и друге незаконите радње), појава већег броја предатора, да ли има угинулих животиња, као и стање ограда, хранилишта и појилишта... Могуће је организовати и фото-лов помоћу дрона (Foto

shooting) како би се остварили приходи без класичног одстрела. Хватање животиња мрежом коју дрон избацује из ваздуха више необична појава, али има и обрнутих случајева када се птице грабљивице, било да су дресиране (за потребе војске и полиције, па и криминалаца) или не, устремљују на дрон у лету, оборе га на земљу или га једноставно однесу. Развијени су и дрoнови за хватање и уништавање других дрoнова, а војска и полиција, између осталог, користе посебно конструисана средства (пушке и сл.) за ометање и обарање дрoнова у лету, односно за упад у систем контроле и управљања дрoном тј. преумеравање његовог лета или спуштање по жељи.

Верује се да ће беспилотне летелице и дрoнови у релативно кратком времену постати део стандардне опреме за пољопривреду (Израел, САД, западноевропске земље, Кина, Јапан, Јужна Кореја). Већ сада постоји изванредан број предузећа за пружање различитих услуга дрoном у пољопривреди, између осталог и у Србији. За набавку дрoнова у пољопривреди постоји све већи интерес, како код појединаца, фармера и пољопривредника, тако и код великих пољопривредних комбината, земљорадничких задруга и других заинтересованих пољопривредних субјеката широм света.

Могућности злоупотребе беспилотних летелица (дрoнова)

Могућности употребе беспилотних летелица (дрoнова) за добробит људи и животиња све више ће се повећавати. Али, истовремено расту и могућности њихове злоупотребе. С једне стране, могу се употребити за борбу против штеточина (најезде скакаваца, запрашивање усева против корова, штетних инсеката и др., а са друге стране њима се могу преносити (намерно) заражене живе животиње или њихови лешеве на другу територију у циљу изазивања и ширења заразних болести код људи (зоонозе), животиња и биљака (криминал, рат, биотероризам). Примера ради, могу се распршивати РБХ контаминанти по њивама, пашњацима, шумама и баштама ради изазивања економске штете по државу (изазивања глади код становништва због масовног угињања сточног фонда, уништавања биљних култура односно услед недостатка сточне хране, житарица и сл.) и с тим у вези политичких немира, сукоба или великих миграција. Лажне, опасне пропагандне поруке окачене на дрон су такође део злоупотребе. Наглашавамо да је посебна опасност од злоупотребе беспилотних летелица (дрoнова) у рату и терористичким акцијама. О томе се мора правовремено и одговорно размишљати у циљу спречавања и сузбијања штете по сточни фонд и биљну производњу, између осталог.

Закључак

Развој савремених техничких средстава попут беспилотних летелица (дрoнова) имаће свој одраз на проблематику заштите и спасавања животиња у рату и миру, односно у ванредним догађајима и ванредним ситуацијама. Овај рад указује на значај, улогу и одређене могућности беспилотних летелица (дрoнова) као средстава за заштиту и спасавање животиња, између осталог. Аутори се искрено надају да ће се наведена техничка средства (која ће тек доћи до пуног изражаја захваљујући вештачкој интелигенцији) користити на добробит човечанства. Уједно, желимо да опоменемо и укажемо на примарни значај правовременог спречавања могуће злоупотребе беспилотних летелица (дрoнова) с обзиром на огромне економске и друге штете које на такав начин (злоупотребом) могу настати. С тим у вези је између осталог и значај прецизнијег упознавања доктора ветеринарске медицине са наведеном проблематиком.

Литература

1. Ostojić N, (2017), Dron, Vojnotehnički Glasnik, 65, 1, VINC, Beograd.
2. Internet:poslovnih.hr/Hina.
3. <https://itrendovi.hr/gadeti/najbolji-dronovi-u-2017/>
4. <https://www.comtradeshop.com/dji-dron-phantom-4-pro-1.html>
5. <https://www.nitroplanes.com.html>
6. <https://www.yuneec.com/>

ПРЕВАЛЕНЦИЈА САЛМОНЕЛА КАТЕГОРИЈЕ 1 НА ФАРМАМА КОКА
НОСИЉА У ЈУЖНОБАЧКОМ И СРЕМСКОМ ОКРУГУ

PREVALENCE OF SALMONELLA CATEGORY 1 ON LAYING HENS FARMS
IN SOUTH BAČKA AND SREM REGION

Марко Пајић, Слободан Кнежевић, Далибор Тодоровић, Биљана Ђурђевић,
Милена Самојловић, Милош Пелић, Владимир Полачек

Научни институт за ветеринарство “Нови Сад”

Кратак садржај

Салмонелоза је једно од најзаступљенијих обољења људи које се преноси храном. Према законским прописима у Републици Србији је обавезна контрола присуства салмонеле на фармама кока носиља на почетку и на крају одгоја, као и на сваке четири недеље у току производног циклуса. Салмонела је глобално распрострањен патоген који у ланац исхране људи најчешће улази преко контаминираним меса и јаја пореклом од живине. Према Правилнику о утврђивању мера за рано откривање, дијагностику, спречавање ширења, сузбијање и искорењивање инфекција живине одређеним серотиповима салмонела код кока носиља врше се испитивања на салмонелу (категорија 1: *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium).

Ово истраживање је спроведено у периоду од 2014. до 2018. године на територији јужнобачког и сремског округа, са циљем да се установи преваленција салмонеле категорије 1 на фармама кока носиља у току одгоја и производног циклуса. Присуство салмонеле испитивано је из узорака фецеса, транспортних пелена и унутрашњих органа. У току 2014. године укупно је испитано 627 узорака, а преваленција је износила 3,67%. У 2015. години укупно је испитано 549 узорака, а 6,19% узорака је било позитивно на салмонеле категорије 1. У 2016. години преваленција је износила 3,26%, а испитано је 643 узорка. У току 2017. преваленција је била 8,54%, од укупно 585 испитаних узорака. У првих шест месеци 2018. године испитано је 334 узорка, а 5,68% узорака су били позитивни. Доминантан серовар је био *Salmonella* Enteritidis. *Salmonella* Typhimurium је изолована код 1 узорка у 2014. и код 2 узорка у 2016. години.

Анализом добијених резултата може се закључити да су салмонеле присутне на фармама кока носиља и да преваленција варира из године у годину. Примећује се пораст позитивних случајева у последње две године и поред свих мера превенције које се на фармама спроводе. Како би се преваленција салмонеле смањила потребно је одржавати висок ниво биосигурносних мера на фармама, увести адекватну вакцинацију као меру превенције и спроводити квалитетан менаџмент.

Кључне речи: салмонела, коке носиље, фецес, фарма, биосигурносне мере.

Захвалница: Истраживања су реализована према пројекту технолошког развоја ТР 31071 финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

ЗНАЧАЈ И КОНТРОЛА ЦРВЕНЕ КОКОШИЈЕ ГРИЊЕ (*Dermanyssus gallinae*)

IMPORTANCE AND CONTROL OF THE POULTRY RED MITE (*Dermanyssus gallinae*)

*Слободан Кнежевић, Марко Пајић, Сузана Видаковић, Јелена Бабић,
Милена Самојловић, Биљана Бурђевић, Милош Пелић, Владимир Полачек*

Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, Нови Сад

Кратак садржај

Деценијама је црвена кокошија гриња (*Dermanyssus gallinae*) својим негативним утицајем на добробит и здравље кокоши носиља, описивана као претња у производњи конзумних јаја. Висок морталитет, поремећаји у понашању јединки (чешање и чупање перја), смањена носивост и квалитет јаја су само неки од симптома које овај ектопаразит проузрокује. Литературни подаци све чешће описују црвену кокошију грињу као потенцијалног преносиоца вирусних и бактеријских узрочника значајних у живинарској индустрији.

Висока преваленција, која у многим случајевима достиже и до 90%, указује на добру способност преживљавања овог паразита у екстремним условима.

Наиме, прелазак из конвенционалног у алтернативни систем држања кокоши носиља отежава контролу и ерадикацију црвене кокошије гриње. Иако контрола најчешће подразумева употребу синтетских акарицида све је чешћа појава резистенције и неуспешне терапије. Ово води окретању ка алтернативним путевима контроле, који су све присутнији у пракси, и подразумевају употребу светла, мириса, али и предаторских паразита, гљивица и вакцинацију. Ипак, најзначајнију улогу у контроли црвене кокошије гриње свакако игра добар менаџмент фарме.

Праћењем стања малих фарми кокоши носиља на територији јужнобачког и сремског округа уочава се висока преваленција црвене кокошије гриње. Док је појава нових случајева везана за веома лоше биосигурносне мере, као и покушаје контроле и ерадикације црвене кокошије гриње са средствима која нису препоручена у пракси.

Упркос напорима у циљу контроле црвене кокошије гриње преваленција је и даље на незавидно високом нивоу, како у земљама у развоју, тако и у развијенијим земљама, што показује важност будућег истраживања и разумевања овог ектопаразита.

Кључне речи: преваленција, економски губици, алтернативни путеви контроле

Захвалница: Истраживања су реализована према пројекту технолошког развоја ТР 31084 и ТР 31071 финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

НАЈЗНАЧАЈНИЈЕ РЕСПИРАТОРНЕ БОЛЕСТИ КОД
КОПИТАРА ИЗАЗВАНЕ ВИРУСИМА

*THE MOST IMPORTANT RESPIRATORY DISEASES
IN EQUIDS DETROVED BY VIRUSES*

*Михајло Ердeљан, Ивана Давидов, Миодраг Радиновић,
Зорана Ковачевић, Бојана Видовић*

Департаман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду,
Србија

Кратак садржај

Вирусне респираторне инфекције су свакако један од најчешћих здравствених проблема код копитара широм света. Ова обољења најчешће су везана за спортске коње, у ергелама и на хиподромима, у првом реду због честих путовања и мешања са болесним и зараженим коњима. Код индивидуалних одгајивача, оваква обољења се јављају у мањем обиму. Углавном се ради о ензоотском појављивању, везаном за одређене хиподроме или ергеле, са ретким епизоотијама, углавном инфлуенце. У нашим условима вероватно највећи проблем представља инфлуенца, а за њом следи ринопнеумонитис, као и вирусни артеритис, који је тек недавно добио на значају.

Кључне речи: коњи, магарци, инфлуенца, херпес, артеритис

Увод

Неколико епизотиолошких студија је показало су да вирус инфлуенце коња (ЕИВ) и коњски херпес вирус типа 4 (ЕХВ-4) и даље превалентни вирусни респираторни патогени широм Европе (1,2). Тако поједини аутори (3) наводе да је 52% коња увежено у САД у периоду од 2014. до 2016. године било позитивно на неки од ЕХВ. Ти високо заразни и вирулентни респираторни вируси имају најзначајнији финансијски утицај на индустрију коњичког спорта и коњарство уопште (4,5). Ове инфекције су често само-ограничавајуће и нису опасне по живот, осим у екстремним случајевима. Превоз коња на велике удаљености може да доведе до значајног оптерећења и промене у имунолошкој функцији, укључујући и одговор акутне фазе, што резултира смањењем ћелијски посредованог имунитета и може довести до клиничких манифестација болести (6, 7).

Инфлуенца

Инфлуенца је код копитара забележена у литератури вероватно још у Античкој Грчкој. Поуздани записи потичу из 1874. године (8). То је озбиљно, акутно, високо контагиозно, респираторно обољење копитара са карактеристичном клиничком сликом (9). Ово обољење изазивају два субтипа инфлуенца А вируса (ЕИВ – еквини инфлуенца вирус) – H7N7 (раније познат као тип 1) и H3N8 (раније познат као тип 2) из фамилије *Orthomyxoviridae*, са назнаком да H7N7 вирус није изолован код копитара већ дуже време (10). Последња потврђена епидемија суптипа H7N7 је била 1979. године, и овај субтип се сада сматра или искорењеним или слабо активим и то у малом броју ограничених географских области (11). Међутим, H7N7 је серолошки доказан и код вакцинисаних и код невакцинисаних коња у Турској (10), Бразилу (12, 13), Нигерији (14) Израелу (15) и Србији (16).

Име инфлуенца потиче од старе латинске речи, која означава болести које се појављују изненада код људи а које су се интерпретирале као резултат астролошких утицаја звезда и мистичних сила судбине. Клинички знаци болести су слични, како код магарца, тако и код коња, а то су: пирексија, диспноа, кашаљ, исцедак из носа, анорексија, депресија и инапетенца. Инфлуенца А вирус је високо инфективни респираторни патоген за копитаре (17, 18) и најчешће се брзо шири у запатима имуно некомпетентних копитара. Еквини инфлуенца А вирус се сматра најважнијим изазивачем респираторних обољења код коња, магарца и мула (19). Морбидитет износи 10-100% а морталитет 0,5-10% (20). Међутим, у великом броју експерименталних испитивања као и у природним епидемијама (21, 22, 23, 24) показало се да је смртност већа а клинички знаци израженији код магарца у односу на коње. Утврђено је такође, да заражени магарци имају веће склоности ка развијању секундарних бактеријских бронхопнеумонија. Стога је неопходна употреба антибиотске и антиинфламаторне терапије код магарца (25). Други аутори пак наводе постојање удружене инфекције са плућним влашцима (24). Због већег морбидитета и морталитета упутно је примењивати ефикасну вакцинацију против инфлуенце, а приликом лечења користи и третман против плућних влашака, уз терапију антибиотцима у циљу сузбијања секундарне бактеријске бронхопнеумоније (26). Ово обољење је веома контагиозно и преноси се најчешће у директном контакту. Код коња обично пролази без значајних последица али може довести до губитка радне способности па чак и до угинућа. Избијање инфлуенце копитара забележено је у целом свету осим на малом броју острва и на Новом Зеланду и Исланду (27). Истраживање у суседној Бугарској обухватило је испитивање антитела у серумима применом инхибиције хемаглутинације где је од укупно 192 узорка позитивних било 126 (65.6%) (28). У нашој земљи забележено је 2004. године обољевање великог броја коња (380) са скоро 100% серопреваленцом (29). Од инфлуенце су два угинула коња, а велики број коња је повучен из тренинга (30). Једно од скорашњих истраживања на магарцима открило је присуство специфичних антитела код 26.5% животиња и то против суптипова H5N1 и H7N2 (31). Треба истаћи да су обимна истраживања вршена у свету на серопреваленци еквине инфлуенце код копитара. Последњих година друге врсте копитара, као што су магарци муле и пони коњи, су испитивани. Тако је забележено да је преваленца инфлуенце код копитара у Пакистану око 12% (32), док је у Турској око 9.4% (10). Истраживање на дивљим магарцима у Монголији је показало постојање антитела против великог броја хемаглутинаина (H) H1, H3, H5, H7, H8 и H10 инфлуенца А вируса, што доводи до могућег закључка да су управо овакве групе животиња резервоари нових вируса за домаће копитаре (33). У рутинској лабораторијској дијагностици најчешће се користи серолошки тест инхибиције хемаглутинације. Сада постоје комерцијални брзи тестови, као што је Directigen FLU-A тест, који се, иако је осмишљен за дијагностику хумане инфлуенце, може користити за детекцију инфлуенце копитара (34). Узорак се узима брисом из носа или дубљих партија респираторног тракта и захтева само 15 минута за добијање резултата. Детекција вируса се може спровести изолацијом вируса из назо-лабијаног бриса преко кокошијих јаја или културе ћелија, односно серолошки преко теста инхибиције хемаглутинације и то у парним серумима (35). У последње време се препоручује PCR метода као бржа и специфичнија метода у односу на вирусну изолацију (36).

Ринопнеумонитис

Коњски херпес вирус (EHV) је веома заразан и представља значајан ризик за популацију коња широм света, нарочито код ждребних кобила. Еквини херпес вирус тип 1 (EHV-1) и тип 4 (EHV-4) изазивају респираторно обољење – ринопнеумонитис код коња. Ова два типа су ендемични у популацијама домаћих коња широм света (37) и сматра се да имају широк опсег домаћина, као што су коњи, магарци и муле (38). EHV-1 и EHV-4 узрокују обољења горњих респираторних путева. Такође, EHV-1 је повезан са абортусом, перинаталним морталитетом или паралитичким неуролошким болестима у копитарима, а EHV-4 је такође спорадично повезан са абортусом и неонаталном инфекцијом у коња (39). Штавише, инфекције EHV-1 и EHV-4 утичу на добробит погођених коња, што у неким случајевима доводи до угинућа код радних животиња (40). Абортус може настати још од четвртог месеца гравидитета, а вирус може изазвати и респираторне болести нарочито код ждребади, годишњака и старијих коња (41). Девет

херпесвируса идентификовано је у породици еквида, која укључује коње, поније, магарце и зебре. Сматра се да је коњ природни домаћин пет од ових девет вируса (еквини херпесвирус (EHV) - EHV-1, EHV-2, EHV-3, EHV-4 и EHV-5), а да су магарци природни домаћини три (EHV-6, EHV-7 и EHV-8, последњи раније познат као магарећи херпесвирус 3 (АНV-3)) (42, 43). Било је предложено да се за природног домаћина за девети вирус (EHV-9), који је изворно изолован код газеле (44), прогласи зебра, али серолошка преваленција указује на афричке носороге као најмање додатне потенцијалне природне домаћине (45). Коњски херпес вируси припадају роду *Varicellovirus*, подфамилији *Alphaherpesvirinae* и фамилији *Herpesviridae* (46). Алфхерпесвируси се карактеришу латентним инфекцијама, а могу успоставити и доживотну латентну инфекцију која може бити прекинута периодичном реактивацијом (47). Серопреваленца у одређеним популацијама може бити и преко 95% а зависи од старости животиње и виша је док старијих грла (48). EHV-1 је глобално присутан, и сматра се за економски значајан EHV јер је повезан са абортусом и неуролошким болестима, укључујући и миелоенцефалопатију (49). АНV-3 је први пут изолован 1987. године из носне шупље магарца у Аустралији после експерименталне примене високих доза кортикостероида (50). На основу анализе секвенци гена ОРФ70 (кодирање гликопротеина Г) и серолошке унакрсне реактивности антитела АНV-3 са EHV-1 и EHV-4 гликопротеинима, АНV-3 је категорисан као Алпххерпесвирус (51), а касније је означен као EHV-8 (46, 52). Године 2010. извршено је потпуно секвенционирање генома EHV-8 сој Wh, који је изолован од коња у Кини (53). EHV-8 осим респираторних проблема изазива абортусе код коња и нервне симптоме код магарца (54).

Артеритис

Вирусни артеритис коња (EAV) представља респираторно, вирусно, контагиозно обољење еквида (55). EAV је вирус из фамилије *Arteriviridae* (род *Equartevirus*) из реда *Nidovirales*. У овој фамилији се такође налазе и лактат дехидрогеназа вирус (LDV) који се јавља код мишева, вирус хеморагичне грознице мајмуна (SHV) и вирус свињског репродуктивног и респираторног синдрома (PRRSV) (56). Узрочник је вирус из фамилије *Arteriviridae*, род *Arterivirus* (EVA). Овакав назив обољењу је дат због карактеристичних лезија у малим крвним судовима, посебно артериолама које изазива овај вирус (57, 58). У нашој земљи присуство вируса је доказано серолошки (59) али и уз помоћ RT-PCR технике и изолатије вируса (60). Обољење најчешће протиче субклинички или акутно. EAV инфекција може изазвати симптоме сличне грипу односно респираторне симптоме болести и то код одраслих коња, абортус код gravidних кобила, интерстицијалну пнеумонију код младих ждребади и перзистентну инфекцију код пастува (61, 55; 62). До сада је познато да је инфекција могућа само код животиња из породице еквида (55). EAV се преноси хоризонтално, било путем аеросола односно респираторне инфекције пријемчивих коња или приликом природног односно вештачког осемењавања кобила перзистентно заражених пастува (61, 62). Управо ти пастуви представљају резервоар инфекције зато што, после инфекције, 70% пастува постаје перзистентно инфицирано (55). Перзистентно инфицирани пастуви континуално избацују вирус искључно путем семена без показивања било каквих клиничких симптома или показивања лошијег фертилитета (63). Стање носиоца зависи од тестостерона и може трајати од неколико недеља или месеци до више година или чак доживотно упркос развијању јаких неутрализујућих антитела у серуму (64). Узрочник је RNK вирус са једноланчаном позитивно орјентисаном RNK. Теренски изолати EAV значајно варирају у својој вирулентности, док инфекције одраслих коња са неким сојевима EAV резултирају у болестима различите тежине, већина вирусних сојева узрокују само субклиничку или асимптоматску инфекцију (65, 66, 55). Вирус артеритиса коња оштећује ендотелне ћелије артериола, јер макрофаге имају слабу фагоцитну функцију, те клиничке манифестације одражавају слику васкуларних оштећења (67). Озбиљнији облици обољења се карактеришу панваскулитисом са некрозама и леукоцитном инфилтрацијом средњих и малих мишићних артерија (68, 69, 70). Такође, показано је да карактеристике раста различитих сојева EAV у културама коњских ендотелних ћелија одражавају њихову вирулентност на коњима (71). Иако је директан утицај вируса на ендотелне ћелије вероватно одговоран за многе клиничке манифестације вирусног артеритиса, овај вирус има и јак тропизам ка макрофагима (65, 70, 72). Управо су макрофаги примарно место за репликацију

вируса из фамилије Артеривириде (55, 61, 65, 72, 73). Треба нагласити да су алвеоларни макрофаги прва линија одбране против вирусних инфекција доњег респираторног тракта, као и цитокини, које они производе, као што су интерлеукин (IL-1 β) и ткивни некрозис фактор (TNF- α), који могу да допринесу патогенези септичног шока и последичном акутном оштећењу плућа (74, 75). Доказано је да EAV индукује два типа антитела и то специфична комплемент везујућа (CF) и вирус неутрализујућа (VN) антитела после инфекције, она даје дуготрајни имунитет и заштиту против реинфекције са већином ако не и против свих вирусних сојева (76). Од клиничких симптома могу се издвојити повишена телесна температура, едеми на екстремитетима, коњуктивитис, фотофобија, поремећаји у раду дигестивног и респираторног система, анорексија, леукопенија, абортуси и фаталне пнеумоније или пнеумоентеритиси код млађих категорија. Код женских животиња су могући абортуси (77, 78), али не у свим случајевима појаве болести (55). Код мушких животиња вирус се настањује у аксесорним полним жлездама и излучују се при сваком припусту (62). После експерименталне инфекције пастуви су развили умерену до озбиљну клиничку слику која је просечно трајала 20 дана, без знакова поремећаја у раду репродуктивног тракта, а излучивање вируса је почело између трећег и петог дана после инфекције и код различитих животиња је различито трајало или око пет месеци или преко две године (79). Код магарца су рађена истраживања у циљу одређивања могућег резервоара инфекције са различитим често супротним и неодређеним резултатима (80, 81, 82, 83). EAV се тешко може клинички разликовати од сличних респираторних и системских болести. Према OIE (84), дијагноза EAV заснива се на изолацији вируса, детекције вирусне нуклеинске киселине или антигена, или детекције специфичних антитела. Вирусна изолација се ради на културама ћелија зеца, коња или мајмуна. Идентитет изолата EAV треба да се потврди помоћу RT-PCR теста или имуноцитохемијском методом. У дијагностици се могу користити и методе хистолошких испитивања јер у озбиљним случајевима постоји панваскулитис који је посебно изражен у малим артеријама. У случајевима абортуса вирусни антигени могу бити детектовани имунохистохемијским методама прегледом постелице или феталних ткива. Од серолошких тестова развијени су вирус неутрализациони тест (VN), индиректна имунофлуоресценција, агар гел имунодифузија и ELISA тест, а тренутно су најчешће у употреби VN тест и ELISA (55, 84).

Дискусија и закључак

Вируси који изазивају респираторна обољења су веома важни зато што праве директне и индиректне штете у виду трошкова лечења, вакцинације, карантина, одустајања са спортских такмичења, немогућности припуста, а могу у одређеним условима довести и до смрти животиње. Понекада је веома тешко клинички разликовати ове вирусе јер практично сви дају клиничку слику у типу респираторног синдрома па је потребна лабораторијска дијагностика заједно са прегледно прибављеним епизоотиолошким подацима. Осим респираторних проблема ови вируси су често повезани и са поремећајима репродуктивног тракта, нарочито херпес вирус и артеритис. С тога је важно да се одржава мониторинг за ове вирусе и да се спроводе превентивне мере како би се ублажиле и умањиле последице њиховог утицаја, како на коње, тако и на магарце, било да су они резервоари инфекције или коначни домаћини.

Литература

1. Pusterla N, Kass PH, Mapes S, 2011, Surveillance programme for important equine infectious respiratory pathogens in the USA. *Vet Rec.* 169:12. 2. Legrand LJ, Pitel PH, Marcillaud-Pitel CJ, 2013, Surveillance of equine influenza viruses through the RESPE network in France from November 2005 to October 2010. *Equine Vet J.* 2013;45:776–783. 3. Smith FL, Watson JL, Spier SJ, 2018, Frequency of shedding of respiratory pathogens in horses recently imported to the United States. *J Vet Intern Med.* 00:1–6. <https://doi.org/10.1111/jvim.15145> 4. Smyth GB, Dagley K, 2011, Internet-based survey of horse owners for mortality and morbidity related to equine influenza in the 2007 Australian epidemic. *Aust Vet J.* ;89:23–25. 5. Smyth GB, Dagley K, Tainsh J, 2011, Insights into the economic consequences of the 2007 equine influenza outbreak in Australia. *Aust Vet J.* ;89 Suppl 1:151–158. 6. Padalino B, Raidal SL, Carter N, 2017, Immunological, clinical, haematological and oxidative responses to long distance transportation in horses. *Res Vet Sci.* 115:78–87. 7. Stull CL, Spier SJ,

- Aldridge BM, Blanchard M, Stott JL, 2004, Immunological response to long-term transport stress in mature horses and effects of adaptogenic dietary supplementation as an immunomodulator. *Equine Vet J*. 36:583–589. **8.**Thiemann AK, Bell NJ, 2001, The peculiarities of donkey respiratory disease, equine respiratory diseases, P. Lekeux (Ed.), Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. **9.**Bountouri M, Fragkiadaki E, Ntafis V, Xylouri E, 2011, Equine influenza. *Journal Of The Hellenic Veterinary Medical Society* 62(2): 161-171. **10.**Ataseven V.S., Daly J.M.: Seroepidemiology of Equine Influenza Virus Infection in Turkey, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 31(3):199-202, 2007. **11.**Van Maanen C., Cullinane A.: Equine influenza virus infections: an up - date. *Vet Q* 24:79-94, 2002. **12.**Heinemann M.B., Cortez A., Lara M.C., Cunha E.M., Nassar A.F., Villalobos E.M., Ferreira N.J., Homem V.S., Ferreira F.: Soroprevalencia do virus da influenza equina no Municipio de Uruara, PA, Brasil, Amazonia oriental. *Arq. Inst. Biol.*, Sao Paulo, v.76, n.4, p.697-699, 2009. **13.**Mancini D.A., Pereira A.S., Mendonça R.M., Kawamoto A.H., Alves R.C., Pinto J.R., Mori E., Richtzenhain L.J., Mancini-Filho J.: Presence of respiratory viruses in equines in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56(3):191-195, 2014. **14.**Olusa T.A., Adegunwa A.K., Aderonmu A.A., Adeyefa C.A.: Serologic evidence of equine H7 influenza virus in polo horses in Nigeria. *Science world journal* 5: 2, 2010. **15.**Aharonson-Raz K, Davidson I, Porat Y, Altory A, Klement E, Steinman A: Seroprevalence and rate of infection of equine influenza virus (H3N8 and H7N7) and equine herpesvirus (1 and 4) in the horse population in Israel. *Journal of Equine Veterinary Science* 34: 823-832, 2014. **16.**Erdeljan M, Davidov I, Cutuk R, Rogan D, Potkonjak A, 2016, Analysis of Different Diagnostis Methods of Influenza in Horses. *Acta Scientiae Veterinariae*. 44. 1. **17.**Hannant D, Mumford JA, 1996, Equine influenza, In: Studdert M.J., Horzinek M.C. (Ed). *Virus Infections of Equines*. 3rd. ed. Amsterdam: Elsevier Science, pp285-293. **18.**Palese P, Shaw ML, 2007, Orthomyxoviridae: the virus and their replication. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Ed). *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp.1647-1689. **19.**Laabassi F, Mamache B, 2014, Virus de la grippe equine: epidemiologie, diagnostic et vaccination. *Revue Med. Vet.*, 165: 1-2, 31-43. **20.**Trailović DR, 2000, Respiratorne bolesti konja. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. **21.**Abdalla MA, Taleb ZA, Ebid MH, 1993, Characterization of serum lysosomal enzymatic activities. III. Effect of infectious influenza in Egyptian equines. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 100(4):147-148. **22.**Chenchev I, Dumanova L, Kotseva R, 1992, Equine influenza outbreak in Bulgaria in 1989. In: *Proceedings of the Sixth International Conference*, 306. **23.**Holland RE Jr, Tudor LR, Timoney JR, 1999, Equine Influenza disease in Donkeys: severe bronchopneumonia due to clonal invasion by streptococcus zooepidemicus. In: *Proceedings of the 8th Int Conf*. **24.**Rose MA, Round MC, Beveridge WB, 1970, Influenza in horses and donkeys in Britain. *Vet Rec*, 86:768-769. **25.**Thiemann AK, 2012, Respiratory disease in the donkey. *Equine veterinary education* 24(9) 469-478. **26.**Caerwell J, Newton R, Wood J, 2000, Equine Influenza in donkeys in the New Forest. *Vet Rec*, 147;10. **27.**Cullinane A, Newton JR, 2013, Equine influenza – A global perspective. *Veterinary Microbiology* 167: 205-214. **28.**Chenchev I, Rusenova N, Sandev N, 2011, Seroepidemiological studies of donkeys' blood for detection of some virus infections on ungulates *Trakia Journal of Sciences*, Vol. 9, No2, pp 82-86. **29.**Šekler M, Ašanin R, Krnjajić D, Palić T, Milić N, Jovanović T, Kovačević D, Plavšić B, Stojanović D, Vidanović D, Ašanin D, 2009, Examination of presence of specific antibodies against avian Influenza virus in some species of wiels birds. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 59(4): 381-403. **30.**Čilerdžić M, Marković M, Petrović N, Stančetić S, Tikvicki G, Trailović DR, 2005, Influenca konja u Srbiji 2004. godine: uzroci i posledice. *Stočarstvo, veterinarstvo i agroekonomija u tranzicionim procesima; Herceg Novi*. **31.**Vasković N, Šekler M, Vidanović D, Polaček V, Kukolj V, Matović K, Jovanović M, 2011, Pathomorphological lesions and distributions of viral antigens in birds infected with the pathogenic strain of H5N1 avian influenza virus. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 61(5-6): 591-598. **32.**Sajid M, Ahmad MD, Khan MA, Anjum MA, Mushtaq MH, 2012, Investigation of equine influenza virus in two geographical regions of Pakistan. *Tropical Animal Health and Production*. 45(2): 693-4. **33.**Soilemetzidou E, de Bruin E, Gábor Á, Bayarbaatar B, Petra K, Koopmans M, Walzer C, Greenwood A, 2018, Bearing the brunt: Mongolian khulan (*Equus hemionus hemionus*) are exposed to multiple influenza A strains. *bioRxiv*, doi: <http://dx.doi.org/10.1101/357905>. **34.**Chambers T.M., Shortridge K.F., Li P.H., Powel D.G., Watkins K.L., 1994, Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen™ Flu-A enzyme immunoassay. *Vet Rec*, 135:275-279. **35.**OIE: *Terrestrial Manual*, Chapter 2.5.7., 2015. **36.**Quinlivan M., Cullinane A., Nelly M., 2004, Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen

detection and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus. *J Clin Microbiol*, 42:759-763. **37.**Ataseven, V.S., Dagalp, S.B., Guzel, M., Basaran, Z., Tan, M.T. and Geraghty, B., 2009. Prevalence of equine herpesvirus-1 and equine herpesvirus-4 infections in equidae species in Turkey as determined by ELISA and multiplex nested PCR. *Res. Vet. Sci.*, 86, 339–344. **38.**Roizman, B., 1996. Herpesviridae. In: Field, B.N., Knipe, D.M, Howley, P.M, Channock, R.M. and Melnick, J.L, et al. (Eds.), *Virology*, 3rd edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, NY. **39.**Tekelioglu, B.K., Matsumura, T., Tsujimura, K., Turan, N., Ekici, H. and Yilmaz, H., 2005. Detection of equine herpesvirus type 1 (EHV-1) in DNA organs of neonatal dead foals in Turkey. *J. Equi. Sci.*, 17, 23-26. **40.**López, F.C., 2014. Seroprevalence of Equine Infectious Anemia, Equine Viral Arteritis and Equine Herpesvirus-1/-4 in the Spanish Purebred horse population in central Spain: Risk factors and association with reproductive problems. PHD Thesis. Facultad De Veterinaria. Universidad Complutense De Madrid, Madrid. **41.**King K, 2018, Controlling and containing equine herpes virus when it finds its way into your clinic, *Veterinary Nursing Journal*, 33:3, 79-82, DOI: 10.1080/17415349.2017.1414400. **42.**Patel JR, Heldens J, 2005, Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review. *Vet J.* 170: 14±23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.04.018> PMID: 15993786. **43.**Browning GF, Ficorilli N, Studdert MJ, 1988, Asinine herpesvirus genomes: comparison with those of the equine herpesviruses. *Arch Virol.* 101: 183±190. PMID: 2845891. **44.**Fukushi H, Tomita T, Taniguchi A, Ochiai Y, Kirisawa R, Matsumura T, 1997, Gazelle herpesvirus 1: a new neurotropic herpesvirus immunologically related to equine herpesvirus 1. *Virology.*; 227: 34±44. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8296> PMID: 9015181. **45.**Abdelgawad A, Damiani A, Ho SYW, Strauss G, Szentiks CA, East ML, 2016, Zebra Alphaherpesviruses (EHV-1 and EHV-9): Genetic Diversity, Latency and Co-Infections. *Viruses.*; 8: 262. <https://doi.org/10.3390/v8090262> PMID: 27657113. **46.**Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, 2009, The order Herpesvirales. *Arch Virol.*; 154: 171±177. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4> PMID: 19066710. **47.**Bloom DC, 2016, Alphaherpesvirus Latency: A Dynamic State of Transcription and Reactivation. *Adv Virus Res.*; 94: 53±80. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.10.001> PMID: 26997590. **48.**Mekonnen A., Eshetu A., Gizaw D, 2017, Equine herpesvirus 1 and/or 4 in working equids: seroprevalence and risk factors in North Shewa Zone, Ethiopia. *Ethiop. Vet. J.*, 21 (2), 28-39 Ethiop. **49.**Lunn DP, Davis-Poynter N, Flaminio MJ, Horohov DW, Osterrieder K, Pusterla N, 2009, Equine herpesvirus-1 consensus statement. *J Vet Intern Med.* 23: 450±461. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0304.x> PMID: 19645832. **50.**Crabb BS, Studdert MJ, 1990, Comparative studies of the proteins of equine herpesviruses 4 and 1 and asinine herpesvirus 3: antibody response of the natural hosts. *J Gen Virol.* 71: 2033±2041. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-9-2033> PMID: 217057 **51.**Ficorilli N, Studdert MJ, Crabb BS. The nucleotide sequence of asinine herpesvirus 3 glycoprotein G indicates that the donkey virus is closely related to equine herpesvirus 1. *Arch Virol.* 1995; 140: 1653±1662. PMID: 7487497 **52.**Virus taxonomy, 1995, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol Suppl.* 10: 1±586. PMID: 7742649. **53.**Liu C, Guo W, Lu G, Xiang W, Wang X. Complete genomic sequence of an equine herpesvirus type 8 Wh strain isolated from China. *J Virol.* 2012; 86: 5407. <https://doi.org/10.1128/JVI.00445-12> PMID:22492929 **54.**Garvey M, Suañez NM, Kerr K, Hector R, Moloney-Quinn L, Arkins S, 2018, Equid herpesvirus 8: Complete genome sequence and association with abortion in mares. *PLoS ONE* 13(2): e0192301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192301> **55.**Timoney PJ, McCollum WH, 1993, Equine viral arteritis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 9: 295-309. **56.**Cavanagh D, 1997, Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 1997; 142: 629-633. **57.**Doll ER, Bryans JT, McCollum WH, 1957, Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet*; 47: 3-40. **58.**Jones, T.C., Doll, E.R., Bryans, J.T., 1957. The lesions of equine viral arteritis. *Cornell Vet.* 47, 52–68. **59.**Erdeljan M, Davidov I, Radinović M, Stančić I, Iduški M, 2012, Nalaz antitela protiv virusnog arteritisa kod kobila u pripustu Letopis naučnih radova, Godina 36, Broj 1, strana 133-139. **60.**Lazić S, Lupulović D, Gaudaire D, Petrovic T, Lazić G, Aymeric H, 2017, Serological evidence of equine arteritis virus infection and phylogenetic analysis of viral isolates in semen of stallions from Serbia *BMC Veterinary Research* 13:316 DOI 10.1186/s12917-017-1226-x **61.**Glaser, A.L., Rottier, P.J.M., Horzinek, M.C., Colenbrander, B., 1996, Equine arteritis virus: a review of clinical features and management aspects. *Vet.Q.* 18, 95–99. **62.**Timoney PJ, McCollum WH, Murphy TW, et al. The carrier

state in equine arteritis virus infection in the stallion with specific emphasis on the venereal mode of virus transmission. *J Reprod Fertility* 1987; 35: 95-102. **63.** Balasuriya UB, Go YY, MacLachlan NJ, 2013, Equine arteritis virus. *Vet Microbiol* 167:93 -122. **64.** Balasuriya UBR, Sarkar S, Carossino M, Go YY, Chelvarajan L, Cook RF, Loynachan AT, Timoney PJ, Bailey E, 2016, Host factors that contribute to equine arteritis virus persistence in the stallion: an update. *J Equine Vet Sci* 43:S11 -S17. **65.** McCollum, W.H., Timoney, P.J., 1999. Experimental observation on the virulence of isolates of equine arteritis virus, in: Wernery, U., Wade, J.F., **66.** Patton, J.F., Balasuriya, U.B.R., Hedges, J.F., Schweidler, T.M., Hullinger, P.J., MacLachlan, N.J., 1999, Phylogenetic characterization of a highly attenuated strain of equine arteritis virus from the semen of a persistently infected standardbred stallion. *Arch. Virol.* 144, 817–827. **67.** Moore Brian D., Balasuriya Udeni B.R., Watson Johanna L., Bosio Catharine M., MacKay Robert J., and MacLachlana N. James: Virulent and avirulent strains of equine arteritis virus induce different quantities of TNF- and other proinflammatory cytokines in alveolar and blood-derived equine macrophages, *Virology* 314 (2003) 662–670. **68.** Crawford, T.B., Henson, J.B., 1973. Immunofluorescent, light-microscopic and immunologic studies of equine viral arteritis. In: Bryans, J.T., Gerber, H. (Eds.), *Proceedings of the 3rd International Conference on Equine Infectious Diseases*, Paris. Karger, Basel, pp. 282–302. **69.** Estes, P.C., Cheville, N.F., 1970. The ultrastructure of vascular lesions in equine viral arteritis. *Am. J. Pathol.* 58, 235–25. **70.** MacLachlan, N.J., Balasuriya, U.B.R., Rossitto, P.V., Hullinger, P.J., Patton, J.F., Wilson, W.D., 1996. Fatal experimental equine arteritis virus infection of a pregnant mare: immunohistochemical staining of viral antigens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 367–374. **71.** Moore, B.D., Balasuriya, U.B.R., Hedges, J.F., MacLachlan, N.J., 2002, Growth characteristics of a highly virulent, a moderately virulent, and an avirulent strain of equine arteritis virus in primary equine endothelial cells are predictive of their virulence to horses. *Virology* 298, 39–44. **72.** Snijder, E.J., Meulenbergh, J.J.M., 2001, Arteriviruses, in: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1205–1220. **73.** Murphy, F. A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J., 1999, in: Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J. (Eds.), *Veterinary Virology*, 3rd ed., Academic Press, San Diego, pp. 509–515. **74.** Kraal, G., Broug, E., Van Iwaarden, J.F., Persoons, J.H., 1997. The role of alveolar macrophages in pulmonary immune function, in: Lipscomb, M.F., Russell, S.W. (Eds.), *Lung Macrophages and Dendritic Cells in Health and Disease*, M. Dekker, New York, pp. 203–220. **75.** Kobzik, L., 1999. The lung, in: Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. (Eds.), *Pathologic Basis of Disease*, 6th ed, W.B. Saunders, Philadelphia, pp.697–755. **76.** McCollum WH, Timoney PJ, Tengelsen LA. 1995. Clinical, virological and 838 serological responses of donkeys to intranasal inoculation with the KY -84 strain 839 of equine arteritis virus. *J Comp Pathol* 112:207 -211. **77.** McCollum WH and Timoney PJ. The pathogenic qualities of the 1984 strain of equine arteritis virus. In: *Proceedings of the Grayson Found Int Conf Thoroughbred Breeders Org*, 1984; 34-47. **78.** Golnik W, 1992, Viruses isolated from aborted fetuses and stillborn foals.; 314. **79.** Carossino M, Wagner B, Loynachan A, Cook R, Canisso I, Chelvarajan L, Edwards C, Nam Bo, Timoney J, Timoney P, Balasuriya U, 2017, Equine arteritis virus elicits a mucosal antibody response in the 2 reproductive tract of persistently infected stallions. *Clin. Vaccine Immunol.* doi:10.1128/CVI.00215-17. **80.** Arab A. Equine serological survey 1995/1996, 1997, United Arab Emirates Ministry of Agriculture and Fisheries. **81.** Paweska JT and Barnard BJH, 1993, Serological evidence of equine arteritis virus in donkeys in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res*, 60: 155-158. **82.** Paweska JT. 1996, Is the South African asinine strain of equine arteritis virus a threat to local horses? *Tydskr S Afr Vet Ver*; 67: 102-103. **83.** Paweska JT, Binns MM, Woods PSA, et al. A survey for antibodies to equine arteritis virus in donkeys, mules and zebra using virus neutralisation (VN) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Equine Vet J* 1997; 29: 40-43. **84.** OIE – Terrestrial Manual, Chapter 2. 5. 10., 2015. (www.oie.int)

ПАТОФИЗИОЛОШКИ ЗНАЧАЈ ЕНДОТОКСИНА У КРВИ ЖИВОТИЊА*

PATHOPHYSIOLOGY IMPORTANCE OF BLOOD ENDOTOXINS IN ANIMALS

*Ивана Лакић, Марко Р. Цинцовић, Бранислава Белић,
Мира Мајкић, Данијел Ковачевић, Вања Ковачевић*

Департаман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду
*Овај рад је резултат пројекта TR31062

Кратак садржај

Ендотоксемија представља продирање и нагомилавање липополисахарида пореклом из ћелијске мембране грам-негативних „мртвих“ бактерија у крвотоку. Ендотоксични шок настаје при нарушавању хомеостазе и баланса про- и антиинфламаторних цитокина. Да би дошло до инфламаторне реакције и последично ендотоксемије и шока, организам прво мора препознати ендотоксин као страну материју. Дакле, инфламаторна реакција започиње оног тренутка кад PRRs (*pattern recognition receptors*) препозна ендотоксин, односно PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). У овом раду описане су карактеристике ендотоксемије и његове повезаности са инфективним болестима (код паса на моделу парвовирозе), метаболичких болести (код постојања гојазности и инсулинске резистенције), а посебно је описан и значај ендотоксина код млечних крвава.

Кључне речи: ендотоксемија, угљени хидрати, липиди, протеин, пси, краве

Увод

Ендотоксемија представља продирање и нагомилавање липополисахарида (LPS) пореклом из ћелијске мембране Грам негативних (G⁻) „мртвих“ бактерија у крвотоку (1). Поред LPS-а (G⁻) бактерија, могућност изазивања ендотоксемије, сепсе и на крају ендотоксичног, односно септичног шока, имају и Грам позитивне (G⁺) бактерије. Оне не производе ендотоксине, али је њихов пептидогликан (уграђен у ћелијску мембрану) и егзотоксини које неке бактерије лучше имају способност изазивања ефекта сличног као ендотоксин, доводећи до нарушавања регулаторних механизма, као и код ендотоксемије. Истраживања су показала да су егзотоксини и пептидогликани подједнако потентни да изазову ендотоксични шок. Гљивице, такође, могу да доведу до оваквих промена (1,2). Ови организми имају потенцију изазивања поремећаја у регулацији цитокина, као и у функцији осовине хипоталамус-хипофиза-цитокини.

Дефиниција ендотоксичног шока

Ендотоксични шок настаје при нарушавању хомеостазе и баланса про- и антиинфламаторних цитокина. Да би дошло до инфламаторне реакције и последично ендотоксемије и шока, организам прво мора препознати ендотоксин као страну материју. За то мора постојати интеракција између рецептора и стране материје, у овом случају ендотоксина. На макрофагима, неутрофилима, лимфоцитима, али и епителним ћелијама постоје тзв. *pattern recognition receptors* (PRRs) који препознају антиген, тачније један његов део који је означен као *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Они нису у стању да препознају коменсале, као ни делове мембрана ћелија домаћина. Само патогени и страни организми могу испољавати PAMPs и везивати се за PRRs. PAMPs су углавном витални делови микроорганизма или одређене структуре које су од значаја за њихов опстанак и патогено деловање. Ту спада и липополисахариди, односно,

ендотоксин грам-негативних бактерија. Дакле, инфламаторна реакција започиње оног тренутка кад PRRs препозна ендотоксин, односно PAMPs (1).

Цитокини у ендотоксичном шоку

Цитокини су медијатори у ендотоксичном шоку, а главну улогу имају: фактор некрозе тумора (TNF- α), интерлеукин-1 (IL-1), интерлеукин-6 (IL-6). Сви они припадају неспецифичној имуности и основни су иницијатори и регулатори запаљенске реакције и реакције акутне фазе, поготово када се ради о инфекцијама G-бактеријама и њиховим LPS-ом (3).

TNF- α (називан још и кахектин): најпознатији је од представника TNF фамилије и први је од цитокина који се лучи из мононуклеара при додиру са LPS-ом. Занимљиво је запажање у хуманој медицини да се високим дозама глукозе (дате интравенски) може изазвати стање хипергликемије и инсулиске резистенције које подстиче појачано лучење TNF- α и IL-6 које даље доводи до оксидативног стреса. Деловање овог цитокина зависи од његове концентрације, па тако ниске концентрације делују паракрино и аутокрينو, док у високим концентрацијама (које се јављају код сепсе и ендотоксичног шока) делује као хормон. При високим концентрацијама понаша се као ендогени пироген, подстичући ћелије хипоталамуса на продукцију простагландина и тиме узрокујући стање грознице. Аспирин и остали инхибитори синтезе простагландина делују као антагонисти TNF- α и IL-1 (који има исто пирогено дејство) (3). Доводи до експресије адхезивних молекула на ендотелу као што су E - селектини и васкуларни ћелијски адхезиони молекули, што доводи до појачане стимулације и адхезије леукоцита. Подстиче мононуклеаре и друге леукоците на лучење IL-1 и IL-6 (1,4). Поред тога што стимулише циклооксигеназу и продукцију цитокина, доводи до продукције iNO (индуцибилни азот-оксид) који изазива вазодилатацију и успоравање тока крви. Битно је напоменути да је у хуманом моделу запажено да концентрација TNF- α знатно корелира са стопом смртности у стањима сепсе (5,6). Слични су резултати запажени и у ветеринарској медицини, али није примењиво на све врсте животиња. Код паса је праћење концентрације TNF- α веома битно за прогнозу болести (нпр. код ендотоксемије и сепсе настале као последица парвовирусне инфекције), док код мачака концентрација овог цитокина не корелира са озбиљношћу стања и није прогностички критеријум (6). Поред пораста концентрације овог цитокина у крви, запажено је да код септичних и ендотоксемичних животиња, расте концентрација TNF- α , IL-6 и ендотоксина у перитонеалној течности (1). Поред регулације и експресије гена за продукцију циклооксигеназе, iNO и адхезивних молекула делује и на експресију прокоагулантних протеина, као што је ткивни фактор (TF). Супротно томе инхибира дејство антикоагулантних фактора. Ово резултира настајањем дисеминоване интраваскуларне коагулопатије (DIC) у стањима ендотоксемије и септичног шока (1,7). IL-1 представља фамилију од 11 цитокина од којих су највише проучени IL-1 α и IL-1 β . IL-1 луче макрофаги, моноцити, дендритичне ћелије, фибробласти. Доводи до анорексије директним дејством на хипоталамус (при високим концентрацијама има способност проласка хемато-енцефалне баријере). Централно деловање је изазвано деловањем циклооксигеназе, iNO и простагландина, али и липооксигеназе заједно са IL-6 или CRH (кортикотропни релизинг хормон). Ово дејство укључује и комплексан механизам глукозе и инсулина (3). IL-6 је фамилија цитокина који имају заједнички трансмембрански GP130 протеин. Луче га Т-лимфоцити и макрофаги, као и остеобласти и ендотелне ћелије, у циљу поспешивања имуног одговора (проинфламатор), као и инфламаторне реакције (синергистички делује са претходна два цитокина). Међутим, у новијим истраживањима је показано да, поред проинфламаторних ефеката, IL-6 има и значајне антиинфламаторне и регенеративне функције (3). IL-6 расте након првог таласа TNF- α . Такође делује као пироген, започиње одговор акутне фазе и доводи до појачане синтезе протеина акутне фазе у јетри. Концентрација IL-6 у крвном серуму може послужити као прогностички знак код ендотоксичног шока и сепсе, примећено је да његова концентрација у крви и перитонеалној течности позитивно корелира са стопом смртности, као што је примећено за TNF и IL-1 (1). IL-10 је антиинфламаторни цитокин. Насупрот до сада поменутих цитокина, IL-10 има првенствено улогу у супримирању инфламаторне реакције и инхибицији имуног одговора. Луче га Т- хелпер лимфоцити, макрофаги, неке активисане В- ћелије, маст ћелије. Он супримира лучење цитокина као што су TNF- α , IL-1 и IL-6 (3,1,5). (6) су показали да животиње код којих је индукован ендотоксични шок имају

статистички значајно мање концентрације овог цитокина, него контролна група. У експериментима са интравенским убризгавањем (8) LPS-а је показано да концентрација овог цитокина достиже максималну концентрацију један час након убризгавања ендотоксина.

Ендотоксини и модел парвовирозе паса

Како је ендотоксемија веома честа код парвовирусних инфекција код паса, велики број експеримената је рађен баш на овом моделу. Рађене су како експерименталне, клиничке, али и ретроспективне студије. Изучавано је постојање ендотоксемије и активност TNF-а код паса са природном инфекцијом парвовирусом (9). Наиме, код 90% паса који болују од парвовирусне инфекције јавља се ендотоксемија узрокована *E. coli*. Како парвовирус доводи до десквамације епитела цревних ресица и огољавања крвних и лимфних путева ламине проприје, олакшава пролазак бактеријске флоре, као и њихових продуката у крвоток. Тиме настаје системска инфламаторна реакција, ендотоксемија и септикемија. И поред овога, терапија антибиотцима код ове инфекције доводи до контроверзе и сукоба мишљења, али свакако је јасно да ендотоксин и TNF имају већу улогу у изазивању шока него сам ендотоксин. У овом истраживању пси (оболели од парвовирозе) су подељени на групу која је прво примала течност, па након тога антибиотике (течност група) и групу која је добијала антибиотике и течност (течност и аб група) истовремено. Код 14 од 17 паса је доказано присуство ендотоксина у крви, а код 10 од 17 је ендотоксин био активан. 5/15 паса је имало активан TNF у моменту када су примљени у станицу, 7/17 је имало активан TNF једном или више пута током студије. 5 паса је имало повећану активност TNF-а током лечења (4 из течност групе и 1 из течност и аб групе). 3/5 паса је умрло. Статистички је доказана знатна повезаност између концентрације TNF-а и смртности. Сличне резултате су добили и (7) који су се, такође, бавили ендотоксемијом код парвовирусне инфекције паса. Они су, као и претходно поменути научници, показали да је присуство ендотоксина у крви паса оболелих од CPV (*Canine Parvovirus*) значајно повећано и да је он главни покретач каскаде реакција, при којој се први активира TNF. Показано је још (анализом фецеса) да је промењена и микрофлора црева паса који болују од CPV инфекције

Ендотоксини, гојазност и инсулинска резистенција

Резултати истраживања (4) су показали да се у стадијуму сепсе и септичног шока јавља инсулинска резистенција. У шоку се прво јавља хипергликемија, затим хипогликемија и у овом стању је степен искориштавања глукозе веома ограничен у односу на здраве животиње. Инсулинска резистенција се највероватније јавља као последица повећања проинфламаторних цитокина TNF-а, IL-1 и IL-6. Код пацијената у шоку повећава се ниво лактата, глукозе, слободних масних киселина, глицерола, триглицерида, VLDL и LDL липопротеина, док се смањује ниво HDL-а. Ово указује да је метаболизам угљених хидрата и масти који је под утицајем инсулина знатно поремећен у септичним стањима. Ови параметри се могу користити као прогностичке вредности у сепси. Ово је последица стварања аутоантитела на инсулинске рецепторе, инсулину сличном деловању ендотоксина, као и променама у ендогеној секрецији инсулина. У сепси, дакле, налазимо смањене концентрације инсулина услед његове повећане елиминације. Овај поремећај се може контролисати континуираним интравенским давањем инфузије инсулина. Ове инфузије могу да послеше преузимање глукозе од стране ћелија, супримирају продукцију лактата, нивое слободних масних киселина, глицерола и надвладавају инсулинску резистенцију насталу последицом повећаним концентрацијама кортикостероида.

LPS и инфламација се, поред тога што доводе до инсулинске резистенције, сматрају и факторима који предиспонирају индивидуу настанку гојазности. Храњење високоенергетским (масним) оброцима доводи до повећања LPS-а за 2-3 пута, па ово стање већ може бити названо метаболичком ендотоксемијом. Исхрана богата липидима доводи до повећања Грам негативне микрофлоре у цревима. У моделима где је исхрана послужила као „окидач“ гојазности, потврђено је да у масном ткиву расту експресија и концентрација проинфламаторних цитокина (TNF, IL-1 и IL-6), а познато је да они изазивају инсулинску резистенцију која даље води у хепатичну липидозу. Примећено је још да масне киселине доводе до експресије TLR-4 рецептора на макрофагима, али и адипоцитима, што иде у прилог повећаној експресији TLR-4 mRNA током

сазревања и диференцијације адипоцита. Постоји и претпоставка да људи склони гојазности имају знатно другачију микрофлору црева (ону која изазива метаболичке поремећаје, а то су претежно G⁻ бактерије), која је битан фактор у настанку гојазности. Дакле, ендогени LPS који се континуирано ствара у цревима бива транспортован у интестиналне капиларе преко TLR-4 зависног механизма. Преносе се у одређеним транспортним облицима (највероватније хиломикронима) по целом организму до таргет ткива. У њима доводе до секреције проинфламаторних цитокина. Тако можемо закључити да је блага ендотоксемија која се јавља код исхране богате мастима или поремећене микрофлоре црева покретач настанка гојазности. У овом истраживању је први пут потврђено да исхрана богата мастима утиче на ове механизме развоја ендотоксемијом покренуте гојазности.

Ендотоксини и метаболизам млечних крва

Ендотоксини код млечних крва представљају све значајнији механизам којим се објашњава развој различитих поремећаја здравља. Неизбалансирана храна уз настанак субакутне ацидизе бурага, повећан унос концентрованог дела оброка, липомобилизација која настаје као последица негативног енергетског биланса и последичне промене у јетри могу довести до повећане продукције ендотоксина и њиховог повећаног транспорта у јетри. Поцећана продукција инфламаторних цитокина у утерус, вимену и дигестивним организма могу оштетити природне баријере и омогућити продор ендотоксина.

Доказан је утицај акутног инфламаторног одговора на метаболичке промене код крва под дејством ендотоксин. Међутим, остало је нејасно да ли је ендотоксин или медијатори инфламације одговоран за ове метаболичке промене код говеда. Цитокини промовишу разградњу масног ткива, нарушавају инсулинску осетљивост и директно стимулишу липолизу (11,12). Прецизније, метаболички ефекти ендотоксина око повраћања укључују већу мобилизацију масног ткива, разградњу гликогена јетре и акумулацију триглицерида у јетри која доводи до масне јетре (13). Уз благи акутни одговор, повећана је употреба глукозе од стране целија имуног система, заједно са повећаном производњом глукозе, што доводи до повећања нивоа глукозе у плазми. Међутим, са јачим одговором акутне фазе, постоји значајно повећање периферног узимања глукозе, што може довести до смањења концентрације глукозе у плазми (14). Показано је да инфламација индукована ендотоксином негативно корелира са Са, Fe и холестеролом у крви, а позитивно са концентрацијом лактата (15,16).

Давање инсулина и глукозе проводира инфламаторни статус након 48-часовне инфузије (у вези са падом негативних протеина акутне фазе) и индукује бржи одговор акутне фазе (пораст TNF-а, IL-6) након интраамарне апликације ендотоксина (LPS). Ови подаци указују на то да истовремена висока доступност глукозе и инсулина на нивоу ткива чини краве више подложним инфламаторним процесима. Насупрот томе, апликација инсулина са смањењем гликемије изгледа да ослаби инфламаторни одговор (17).

Литература

1. Lewis D.H. i sar.: The Immunopathology of Sepsis: Pathogen Recognition, Systemic Inflammation, the Compensatory Anti-Inflammatory Response, and Regulatory T Cells. *J Vet Intern Med* 26: 457-482, 2012.
2. Natanson C i sar.: Role of Endotoxemia in Cardiovascular Dysfunction and Mortality. *The Journal of Clinical Investigation, Inc.*, Vol. 83, January 1989.
3. Ćirić O., Budeč M. i Leposavić G: Neuro-Endokrino-Imunologija. (Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2000.
4. Das U. N.: Insulin in Sepsis and Septic Shock (JAPI; Vol. 51, 2003).
5. Do-Hyeon i sar.: Pathophysiologic and Immunologic Changes in a Canine Endotoxemia over a Period of 24 Hours. *J. Vet. Med. Sci.* 74(5): 537-544, 2012.
6. DeClue A. E. i sar.: Plasma Inflammatory Mediator Concentrations at ICU Admission in Dogs with Naturally Developing Sepsis. *J Vet Intern Med* 26:624-630, 2012.
7. Isogai E. i sar.: Escherichia Coli Associated Endotoxemia in Dogs with Parvovirus Infection. *Jpn. J. Vet. Sci.* 51(3): 597-606, 1989.
8. Chensue S. W. i sar.: In Vivo Biologic and Immunohistochemical Analysis of Interleukine-1 Alpha, Beta and Tumor Necrosis Factor during Experimental Endotoxemia. *American Journal of Pathology*, Vol. 138 No. 2 February, 1991.
9. Otto C. M. i sar.: Endotoxemia and Tumor

Necrosis Factor Activity in Dogs with Naturally Occuring Parvoviral Enteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, Vol. 11 No. 2, 1997. **10.** Cani P. D. i sar.: Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *DIABETES*, Vol. 56, July 2007. **11.** Ametaj, B.N.; Bradford, B.J.; Bobe, G. et al. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, v.85, n.2, p.165-175, 2005. **12.** Bradford, B.J.; Mamedova, L.K.; Minton, J.E. Daily injection of tumor necrosis factor-alpha increases hepatic triglycerides and alters transcript abundance of metabolic genes in lactating dairy cattle. *Journal of Nutrition*, v.139, n.12, p.1451-1456, 2009. **13.** Ametaj, B.N. A new understanding of the causes of fatty liver in dairy cows. *Advances in Dairy Technology*, v.17, p.97-112, 2005. **14.** Elsasser, T.H.; Caperna, T.J.; Li, C.J. Critical control points in the impact of the proinflammatory immune response on growth and metabolism. *Journal of Animal Science*, v.86, E-Supplement, p.E105-E125, 2008. **15.** Emmanuel, D.G.V.; Dunn, S.M.; Ametaj, B.N. Feeding high proportions of barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.91, n.2, p.606-614, 2008. **16.** Zebeli, Q.; Dunn, S.M.; Ametaj, B.N. Strong associations among rumen endotoxin and acute phase proteins with plasma minerals in lactating cows fed graded amounts of concentrate. *Journal of Animal Science*, doi:10.2527/jas.2009-2203, 2010. **17.** De Matteis, L., Bertoni, G., Lombardelli, et al., 2017. Acute phase response in lactating dairy cows during hyperinsulinemic hypoglycaemic and hyperinsulinemic euglycaemic clamps and after intramammary LPS challenge. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 101(3), 511-520.

ИНДЕКС АУТОРА

- Aleksić Agelidis Aleksandra: 305
Aleksić Jelena: 305
Aničić Milan: 261
Atanasov Branko: 179
Babić Jelena: 305, 333
Bacić Dragan: 327
Baltić M. Branislav: 15
Baltić Ž. Milan: 15, 125
Bečkei Žolt: 288
Belić Branislava: 172, 238, 252, 321, 341
Bojanić Janja: 42
Bošković Tamara: 265
Božić Biljana: 231
Brkić Zoran: 42
Brozić Diana: 143
Bugarski Dejan: 231
Ciglenečak Jamnikar Urška: 222
Cincović R. Marko: 172, 238, 247, 252, 321, 341
Crnogorac Milica: 243
Cvetnić Željko: 35
Cvjetković Hrnjaković Ivana: 54
Čojo Radmila: 42
Čirić S. Jelena: 15
Čirković Miroslav: 78
Darko Marinković: 261
Davidov Ivana: 243, 317, 334
Debeljak Zoran: 70
Dimitrijević Mirjana: 265
Dimitrijević Vladimir: 288
Dovenski Toni: 179
Drobnjak Darko: 296
Džigurski Ljubica: 77
Đokić Slaviša: 252
Đoković Radojica: 238
Đurđević Biljana: 77, 301, 332, 333
Đurić Boban: 33
Đurić Miloje: 259
Erdeljan Mihajlo: 243, 317, 334
Esmerov Igor: 179
Galfi Annamaria: 243, 317
Galić Ivan: 247, 317
Golić Bojan: 42, 326
Hristovska Talija: 172
Ignjatović Čupina Aleksandra: 54
Ilić Tanja: 326
Janjić M. Jelena: 15
Jarić Đurić Martina: 143
Jašari Besir: 179
Jean-Michel Mainguet: 267
Jevtić Ivan: 263
Jovanović Ljubomir: 215
Jović Slavoljub: 305, 327
Kalaba Vesna: 326
Karabasil Neđeljko: 265
Kartalović Brankica: 301
Kasagić Dragan: 42
Katoch Shivani: 151
Kirovski Danijela: 9, 215
Kirovski Marko: 231
Knežević Slobodan: 301, 332, 333
Kovačević Danijel: 341
Kovačević Vanja: 341
Kovačević Zorana: 243, 317, 334
Kreszinger Mario: 274, 281
Kreszinger Mario: 281
Krnjajić Dejan: 85
Krstić Vanja: 263
Labus Tatjana: 267
Labus Tatjana: 85
Lakić Ivana: 172, 238, 247, 252, 321, 341
Lazić Gospava: 54, 77
Lazić Sava: 54, 77, 78
Lupulović Diana: 54, 77
Magaš Vladimir: 259
Majkić Mira: 172, 321, 341
Maletić Milan: 179, 259
Marić Jelena: 42
Marković V. Radmila: 15, 125, 134
Mekić Cvijan: 125
Mikulec Željko: 143
Milakara Emina: 7, 33
Milanov Dubravka: 231
Miličević Vesna: 65
Milijašević Milan: 305
Milosavljević Snežana: 314
Miloš Ivan: 314
Milošević Vesna: 54
Milovanović Aleksandar: 231
Milovanović Milovan: 65, 70
Mišić Dušan: 267
Mrkun Janko: 188, 200
Nedić Drago: 42
-

- Nedić Sreten: 215
Nikolić Sandra: 252
Nikolić Sonja: 42
Novakov Nikolina: 78
Njegovec Peter: 222
Ostojić Saša: 33
Pajić Marko: 77, 301, 332, 333
Pećin Marko: 281
Pelić Miloš: 78, 301, 332, 333
Perić Boris: 263
Petrić Dušan: 54
Petrović Miloš: 238
Petrović Tamaš: 33, 54, 77
Pipan Zakošek Maja: 188, 200
Plavša Nada: 321
Plavšić Budimir: 7, 9, 33, 65
Plut Jan: 222
Polaček Vladimir: 77, 231, 301, 332, 333
Popović B. Milka: 15
Popović Nikola: 271
Potkonjak Aleksandar: 54
Prodanović Radiša: 215
Radinović Miodrag: 243, 317, 321, 334
Radojičić Sonja: 65, 70
Radovanović Savić Radoslava: 305
Radulović Stamen: 125, 134
Ratajac Radomir: 301
Robertson P. Alan: 98
Rogan Dragan: 78
Samardžija Marko: 143
Samojlović Milena: 77, 301, 332, 333
Santrač Violeta: 42
Savić Mila: 288
Sladojević Željko: 42
Smolec Ozren: 274, 281
Stančić Ivan: 247
Starčević P. Marija: 15
Stejskal Marko: 279, 281
Stevanović Oliver: 42
Stević Nataša: 65, 70
Stojanac Nenad: 78
Stojanov Boris: 179
Šefer Dragan: 125, 134, 151
Šekler Milanko: 54
Šević Kristina: 42
Šterbenc Nataša: 188
Štukelj Marina: 222
- Tarić Elmin: 288
Todorović Dalibor: 231, 332
Todorović Zoran: 106, 110
Toholj Bojan: 247, 274, 281
Trailović M. Saša: 110
Trailović Ružica: 288
Urošević Milivoje: 296
Uzelac Jelica: 33
Valčić Miroslav: 65, 70
Valpotić Hrvoje: 143
Vasilev Dragan: 265
Vasiljević Maja: 263
Vićentijević Mihajlo: 327
Vidaković Suzana: 333
Vidanović Dejan: 54
Vidović Bojana: 78, 334
Vince Silvijo: 143
Vladimir Nešić: 261
Vujanac Ivan: 215
Zahirović Nedim: 247
Zrimšek Petra: 200
Živanov Dragan: 327
Živojinović Milena: 65
Žugić Gordana: 85

