

SRPSKO VETERINARSKO DRUŠTVO



33.

SAVETOVANJE
VETERINARA
SRBIJE

ZBORNİK RADOVA I
KRATKIH SADRŽAJA



www.svd.rs



SRPSKO VETERINARSKO
DRUŠTVO

08 - 11. septembra 2022. god.
Zlatibor

**SRPSKO VETERINARSKO DRUŠTVO
SERBIAN VETERINARY ASSOCIATION**



ZBORNİK RADOVA I KRATKIH SADRŽAJA

**33. SAVETOVANJE VETERINARA SRBIJE
33rd CONFERENCE OF SERBIAN VETERINARIANS**



Hotel Palisad – Zlatibor, 8–11. septembar 2022.
Hotel Palisad – Zlatibor, September 8–11. 2022.

33. SAVETOVANJE VETERINARA SRBIJE
Zlatibor, 08–11. septembar, 2022.

Organizator / Organizer:
SRPSKO VETERINARSKO DRUŠTVO

Suorganizatori / Co-organizer:
Fakultet veterinarske medicine – Univerzitet u Beogradu
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Departman za veterinarsku medicinu

Pokrovitelji / Patrons:
Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za veterinu
Veterinarska komora Srbije

Predsednik SVD-a / President of SVA: Prof. dr Milorad Mirilović, dekan FVM

Organizacioni odbor / Organizational board:
Predsednik / President: Milorad Mirilović
Potpredsednici / Vice-presidents: Stamen Radulović i Miodrag Rajković
Sekretar / Secretary: Jasna Stevanović
Tehnički sekretar / Technical secretary: Katarina Vulović, Maja Gabrić

Programski odbor / Programme committee:
Vladimir Dimitrijević (predsednik), Danijela Kirovski, Sonja Radojičić, Vanja Krstić, Bojan Toholj,
Slobodanka Vakanjac, Tamaš Petrović, Ivan Vujanac, Stamen Radulović, Milutin Đorđević,
Vesna Đorđević, Ivan Stančić, Drago Nedić

Počasni odbor / Honorary committee:
Branislav Nedimović, Emina Milakara, Nedeljko Tica, Jakov Nišavić, Dragana Oklješa, Mišo Kolarević,
Saša Bošković, Nenad Budimović, Velibor Kesić, Ranko Savić

Sekretarijat / Secretariat:
Slobodan Stanojević, Sava Lazić, Ivan Miloš, Miodrag Bošković, Katarina Nenadović, Milutin Simović,
Zoran Rašić, Milan Đorđević, Predrag Maslovarić, Zoran Jevtić, Zoran Knežević, Vojislav Arsenijević,
Ljubinko Šterić, Dragutin Smoljanović, Bojan Blond, Dobrila Jakić-Dimić, Miloš Petrović, Zorana
Kovačević, Milica Lazić, Laslo Matković, Darko Bošnjak, Petar Milović, Rade Došenović, Nikola
Milutinović, Mirjana Ludoški, Gordana Žugić, Željko Sladojević, Miodrag Milković

Izdavač:
Srpsko veterinarsko društvo, Beograd

Za izdavača:
Prof. dr Milorad Mirilović, predsednik SVD

Urednici:
Prof. dr Vladimir Dimitrijević i prof. dr Miodrag Lazarević

Stručna lektura i korektura: Prof. dr Miodrag Lazarević
Dizajn i tehnička izrada korica i kolora: Branislav Vajnović

Tehnička obrada: Gordana Lazarević

Štampa: Naučna KMD, Beograd, 2022

Tiraž: 500 primeraka

ISBN 978-86-83115-47-1

SADRŽAJ

TEMATSKO ZASEDANJE I / PLENARY SESSION I

JEDNO ZDRAVLJE / *One health*

- ◆ **Budimir Plavšić:**
Aktivnosti i odgovornosti veterinarskih službi i Svetske organizacije za zdravlje životinja na globalnom, evropskom i nacionalnom nivou za unapređenje koncepta Jednog zdravlja
Activities and responsibilities of veterinary services and the World organization for animal health at the global, european and national level to promote One Health concept 3
- ◆ **Slavica Maris:**
Koncept Jedne medicine – integracija humane i veterinarske medicine 6

TEMATSKO ZASEDANJE II / PLENARY SESSION II

AKTUELNA EPIZOOTIOLOŠKA SITUACIJA U REPUBLICI SRBIJI I ZEMLJAMA IZ OKRUŽENJA /

Current epizootiological situation in the Republic of Serbia and neighbouring countries

- ◆ **Jelica Uzelac, Boban Đurić, Saša Ostojić, Tatjana Labus, Aleksandra Nikolić, Jelena Ćuk, Dragana Živanović:**
Epizootiolška situacija u Srbiji 2021. godine
Epizootiological situation in Serbia in 2021 9
- ◆ **Zoran Debeljak, Milena Živojinović, Ljubiša Veljović, Boban Đurić, Olivera Vukelić, Jelica Uzelac, Slobodan Maksimović, Miroljub Dačić, Dejan Bugarski:**
Artritis encefalitis koza – karakteristike bolesti,
epizootiolška situacija i mere kontrole 11
- ◆ **Vesna Milićević, Branislav Kureljušić, Dimitrije Glišić, Nemanja Jezdimirović, Jelena Maletić, Ljubiša Veljović:**
Besnilo – epizootiolška situacija u Evropi i kod nas
Rabies – epizootiological situation in Europe and in our country 26
- ◆ **Nataša Stević, Elena Kosović, Tamara Radovanović, Zorana Zurovac Sapundžić, Dragan Bacić, Sonja Radojičić:**
Brucelozna i koncept „Jedno zdravlje“ 30
- ◆ **Dragan Bacić, Elena Kosović, Tamara Radovanović, Nataša Stević:**
„Majmunske boginje“ – uloga veterinara u sprečavanju širenja bolesti 40
- ◆ **Dimitrije Glišić, Milan Đorđević, Milan Ninković, Zorana Zurovac Sapundžić, Bojan Milovanović, Branislav Kureljušić, Vesna Milićević:**
Maligna kataralna groznica – prikaz slučaja 48
- ◆ **Zorana Zurovac Sapundžić, Nataša Stević, Vesna Milićević, Aleksandar Živulj, Milijana Nešković, Marina Radojičić, Jadranka Žutić:**
Brucelozna kod divljih svinja i njihov epizootiolški značaj
Brucellosis in wild boars and their epizootiological importance 50
- ◆ **Milan Ninković, Ljubiša Veljović, Dimitrije Glišić, Zorana Zurovac Sapundžić, Jadranka Žutić, Branislav Kureljušić, Vesna Milićević:**
Goveđi respiratorni sincicijalni virus uzročnik pneumonija kod goveda – prikazi slučajeva
Bovine respiratory syncytial virus causing pneumonia in cattle – case reports 57

- ◆ **Slobodan Knežević, Marko Pajić, Suzana Vidaković Knežević, Biljana Đurđević, Zoran Ružić, Diana Lupulović:**
Avijarni metapneumovirus na roditeljskim farmama i farmama koka nosilja 61
- ◆ **Jelena Maletić, Ljiljana Spalević, Branislav Kureljušić, Ljubiša Veljović, Nemanja Zdravković, Bojan Milovanović, Vesna Milićević:**
Uticaj adenovirusne infekcije pilića na imunološki odgovor nakon vakcinacije protiv atipične kuge peradi
Fowl adenovirus infection influence on the immunological response of broilers after vaccination against Newcastle disease 63

TEMATSKO ZASEĐANJE III / PLENARY SESSION III

REPRODUKCIJA I ZDRAVSTVENA ZAŠTITA DOMAĆIH ŽIVOTINJA /

Reproduction and health care of domestic animals

- ◆ **Branislav Kureljušić, Nemanja Jezdimirović, Bojan Milovanović, Vesna Milićević, Jelena Maksimović Zorić, Jelena Maletić, Božidar Savić:**
Diferencijalna dijagnostika bolesti debelog creva kod svinja – patološki aspekt 67
- ◆ **Milan Maletić, Branislav Kureljušić, Vesna Milićević, Nemanja Zdravković, Predrag Ivančev, Slobodanka Vakanjac, Bojan Milovanović:**
Supklinički endometritis krava – izazov u dijagnostici 74
- ◆ **Marko Ristanić, Minja Zorc, Uroš Glavinić, Jovan Blagojević, Milan Maletić, Peter Dovč, Zoran Stanimirović:**
Identifikacija potpisa selekcije proizvodnih i reproduktivnih osobina i stepena genomskog inbridinga u populaciji srpskih holštajn-frizijskih krava
Identification of productive and reproductive trait selection signatures and level of genomic inbreeding in population of Serbian Holstein-Friesian cows 85
- ◆ **Ivan Stančić, Ivan Galić, Jelena Apić, Mihajlo Erdeljan, Jovan Spasojević, Tijana Kukurić, Sandra Nikolić:**
Citomorfološke promene spermatozoida kod nerastova 96
- ◆ **Jovan Stanojević, Miodrag Radinović, Marko R. Cincović, Zorana Kovačević, Ivana Davidov, Tijana Kukurić:**
Značaj enzima LDH iz mleka u dijagnostici mastitisa kod krava 101
- ◆ **Vitomir Čupić, Saša Ivanović, Sunčica Borozan, Gordana Žugić, Indira Mujezinović, Dejana Čupić Miladinović, Jelena Aleksić:**
Za i protiv primene antimikrobnih lekova kod koka nosilja konzumnih jaja
The application of antimicrobial drugs in laying hens: for and against 106
- ◆ **Radiša Prodanović, Ivan Vujanac, Jovan Bojkovski, Sreten Nedić, Sveta Arsić, Ljubomir Jovanović, Danijela Kirovski:**
Uloga dijametra adipocita u regulaciji metabolizma lipida u peripartalnom periodu kod visokomlečnih krava 113

TEMATSKO ZASEĐANJE IV / PLENARY SESSION IV

ULOGA VETERINARSKJE SLUŽBE U RAZVOJU LOVSTVA /

Role of veterinary services in the development of hunting

- ◆ **Milutin Đorđević, Oliver Radanović, Branislav Pešić:**
Naša iskustva u primeni biosigurnosnih mera u fazanerijama
Our experiences in the application of biosecurity measures in pheasantries 123

◆ Vladimir Nešić, Dajana Davitkov: Veterinarsko-forenzička ispitivanja uginule divljači	141
◆ Andrea Radalj, Nenad Milić, Isidora Prošić, Aleksandar Živulj, Damir Benković, Jakov Nišavić: Ispitivanje prisustva parvovirusa i cirkovirusa u populacijama divljih svinja i šakala <i>The detection of parvoviruses and circoviruses in wild boar and jackal populations</i>	152
◆ Vojislav Ilić: Uloga i značaj veterinarske struke u razvoju lovstva <i>Role and significance of veterinary profession in development of hunting</i>	163
◆ Saša M. Trailović, Darko Marinković: Farmakoterapija parazitskih infekcija divljači, naša iskustva <i>Pharmacotherapy of parasitic infections in wild animals, our experiences</i>	168
◆ Alan P. Robertson: Parasitic nematodes of domestic and wild animals and sensitivity to anthelmintics <i>Parazitske nematode domaćih i divljih životinja i osetljivost na antihelmintike</i>	174

TEMATSKO ZASEDANJE V / PLENARY SESSION V

MODIFIKOVANE STRATEGIJE ISHRANE ŽIVOTINJA U PROMOCIJI KONCEPTA ZELENA AGENDA / *Modified animal nutrition strategies in promoting the green agenda concept*

◆ Dragan Šefer, Radmila Marković, Svetlana Grdović, Stamen Radulović, Dragoljub Jovanović, Lazar Makivić, Dejan Perić: Upotreba nutritivnog dodatka „Eubiotik“ u kontroli emisije amonijaka i ugljen dioksida na komercijalnim živinarskim farmama za tov brojlera <i>Use of Eubiotic in control of ammonia and carbon dioxide emissions on commercial poultry farms</i>	181
◆ Radmila Marković, Dejan Perić, Stamen Radulović, Svetlana Grdović, Dragoljub Jovanović, Adriana Radosavac, Dragan Šefer: Helatne forme mikrolemenata kao dodatak hrani za nepreživare <i>Chelate forms of microelements as feed supplement for non-ruminants</i>	188
◆ Stamen Radulović, Dragan Šefer, Radmila Marković, Živan Jokić, Zoran Rašić, Saša Lovrić, Jasmina Kojičić Stefanović: Upotreba fitaze pri formulaciji obroka za ishranu monogastričnih životinja u cilju smanjenog izlučivanja fosfora u spoljašnju sredinu: praktičan pristup <i>The use of phytase in the formulation of rations for the feeding of monogastric animals in order to reduce the excretion of phosphorus into the environment: a practical approach</i>	199
◆ Svetlana Grdović, Radmila Marković, Stamen Radulović, Dejan Perić, Dragan Šefer: Upotreba etarskih ulja u ishrani preživara sa ciljem zaštite životne sredine <i>The use of essential oils in nutrition of ruminants with the purpose of environmental protection</i>	211
◆ Danijela Kirovski, Sreten Nedić, Ljubomir Jovanović, Radiša Prodanović, Milica Stojković, Dušan Bošnjaković, Ivan Vujanac: Modulacijom metabolizma krava do ekološki prihvatljive proizvodnje na govedarskim farmama <i>Modulation of cows metabolism as a tool for the environmentally friendly cattle production</i>	219

- ◆ **Aleksandra Ivetić, Stamen Radulović, Bojan Stojanović, Vesna Davidović, Milivoje Čosić:**
 Predikcija proizvodnje enteričnog metana u organizmu preživala na osnovu hemijskog sastava hrane
Prediction of production of enteric methane in ruminants based on chemical composition of feed 230
- ◆ **Dejan Perić, Radmila Marković, Stamen Radulović, Svetlana Grdović, Dragoljub Jovanović, Dragan Šefer:**
 Upotreba enzima u povećanju svarljivosti hrane i zaštiti životne sredine
The use of enzymes in increasing feed digestion and protecting the environment 241
- ◆ **Akram El Kadi, Dragan Šefer, John Willis:**
 Balanced protein in layer diets to improve birds' welfare
Izbalansirani sadržaj proteina u ishrani koka nosilja sa ciljem unapređenja dobrobiti 253

TEMATSKO ZASEDANJE VI / PLENARY SESSION VI

HEMATOLOŠKE I BIOHEMIJSKE ANALIZE KRVI U PROCENI ZDRAVSTVENOG STANJA ŽIVOTINJA / *Hematological and biochemical blood analyses in assessment of the animal health status*

- ◆ **Anđelo Beletić:**
 Uloga racionalne i tačne laboratorijske dijagnostike u savremenoj veterinarskoj medicini 259
- ◆ **Alenka Nemeč Svete:**
 The five most common preanalytical errors in haematology – are we aware of them?
Pet najčešćih preanalitičkih grešaka u hematologiji – da li smo ih svesni? 266
- ◆ **Milica Kovačević Filipović:**
 Osnovne laboratorijske procedure u dijagnostici imunski-posredovane hemolitičke anemije pasa 278
- ◆ **Marko R. Cincović, Branislava Belić, Mira Majkić, Sandra Nikolić, Nikolina Novakov:**
 Validacija *Point-of-Care* imunofluorescentnog uređaja za određivanje hormona u krvi pasa i mačaka i upotreba u rutinskoj dijagnostici 286
- ◆ **Lazar Marković, Stefan Đoković, Milena Radaković, Jelena Francuski Andrić, Ivan Milošević, Anđelo Beletić, Milica Kovačević Filipović:**
 Laboratorijski profil sinovijalne tečnosti kod šest radnih konja različite starosti 294
- ◆ **Mira Majkić, Nada Plavša, Marko R. Cincović, Slavča Hristov, Branislava Belić, Sandra Nikolić, Dražen Kovačević:**
 Faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) kod krava u toplotnom stresu 301
- ◆ **Kristina Spariosu, Milutin Antić, Milena Radaković, Anđelo Beletić, Milica Kovačević Filipović:**
 Razlike u nivou matriks metaloproteinaza 2 i 9 u serumu pasa sa blagom i umerenom formom lajšmanioze 307
- ◆ **Marija Kovandžić, Filip Janjić, Kristina Spariosu, Milena Radaković, Jelena Francuski Andrić, Anđelo Beletić, Milica Kovačević Filipović:**
 Analiza krvne slike magaraca na velikim i malim farmama – implikacije u vezi sa eozinofilijom 310
- ◆ **Filip Janjić, Kristina Spariosu, Sara Kitanović, Milena Radaković, Jelena Francuski Andrić, Anđelo Beletić, Milica Kovačević Filipović:**
 Retrospektivna analiza prevalencije anemija i faktori rizika kod pasa i mačaka u toku 2021–2022. godine na Klinici za male životinje Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu 312

- ◆ Sandra Nikolić, Branislava Belić, Marko R. Cincović,
Nikolina Novakov, Mira Majkić:
Inter i intra-individualne referentne vrednosti krvnih parametara pasa
i njihova dijagnostička upotreba 314
- ◆ Miloš Ži. Petrović, Radojica Đoković, Marko R. Cincović, Branislava Belić,
Jože Starič, Miodrag Radinović, Jovan Stanojević:
Ekstracelularni protein toplotnog šoka HSP70 kod krava u ranoj laktaciji
i njegov proinflamatorni efekat 316
- ◆ Milica Nikolić, Milena Radaković, Kristina Spariosu,
Milica Kovačević Filipović, Jelena Francuski Andrić:
Značaj indeksa anizocitoze u dijagnostici najčešćih infektivnih anemija mačaka 322

TEMATSKO ZASEĐANJE VII / PLENARY SESSION VII

UNAPREĐENJE ZDRAVSTVENE ZAŠTITE I PROIZVODNIH OSOBINA OVACA I KOZA /

Improving health care and production characteristics of sheep and goats

- ◆ Zsolt Becskei, Mila Savić, Elmin Tarić, Jovan Bojkovski, András Gáspárdy,
Bogdan Cekić, Vladimir Dimitrijević:
Značaj kliničkog pregleda genitalnih organa priplodnih ovnova kao
selekcijski kriterijum u unapređenju autohtonih rasa ovaca
*Importance of clinical assessment of the genital tract in breeding rams in
the process of selection and improvement of autochthonous sheep breeds* 327
- ◆ Minja Zorc, Božidarka Marković, Tamara Ferme, Marjana Cvim, Peter Dovč:
Goats and sheep as a pillar of sustainable animal production in the mountain areas
Kozarstvo i ovčarstvo kao stub samoodržive proizvodnje u planinskim predelima 330
- ◆ Antun Kostelić, Sofija Džakula, Miroslav Benić, Velimir Sušić, Marko Samaradžija:
Sheep and goat breeding in the Republic of Croatia –
breeding and herd health characteristics
Ovčarstvo i kozarstvo u Republici Hrvatskoj – uzgoj i zdravstveni status stada 339
- ◆ Elmin Tarić, Zsolt Besckei, Ružica Trailović, Mila Savić, Vladimir Dimitrijević:
Mogućnost unapređenja ovčarske proizvodnje na sjeničko-peršterskoj visoravni 346
- ◆ Cvijan Mekić:
Uticaj razgradivosti proteina hrane na tovne i klanične rezultate
tovljene jagnjadi ile de france rase
*Influence of feed protein degradability on fattening and
slaughtering results of Ile de France breed lambs* 352
- ◆ Aleksandar Simić, Željko Dželetović, Gordana Andrejić, Ivan Gujaničić:
Konzentracije teških metala u prirodnim i sejanim travnjacima
Heavy metal concentrations in permanent and sown grassland 354
- ◆ Vitomir Čupić, Saša Ivanović, Sunčica Borozan, Gordana Žugić,
Indira Mujezinović, Dejana Čupić Miladinović, Jelena Aleksić:
Specifičnosti primene lekova kod koza
Specificity of drug application in goats 366

TEMATSKO ZASEDANJE VIII / PLENARY SESSION VIII

BEZBEDNOST NAMIRNICA ANIMALNOG POREKLA / *Animal food safety*

- ◆ Milan Ž. Baltić, Marija Bošković Cabrol, Marija Dokmanović,
Jelena Janjić, Milica Glišić, Ivana Branković Lazić, Mirjana Dimitrijević:
Meso in vitro-ante portas 379
- ◆ Marija Starčević, Nataša Glamočlija, Jelena Janjić, Branislav Baltić,
Ksenija Nešić, Radmila Marković, Milan Ž. Baltić:
Izvori proteina u ishrani ljudi i životinja – prošlost, sadašnjost, budućnost 392
- ◆ Jasna Đorđević, Tijana Ledina, Marija Kovandžić, Snežana Bulajić:
Bioaktivni peptidi iz mleka 406
- ◆ Nevena Grković, Milijana Babić, Nikola Čobanović, Ivan Vičić,
Nedeljko Karabasil, Branko Suvajdžić, Mirjana Dimitrijević:
Uticaj pandemije COVID-19 na bezbednost hrane
Impact of COVID-19 pandemic on food safety 414
- ◆ Nikola Čobanović, Branko Suvajdžić, Dragan Vasilev, Nedjeljko Karabasil:
Ispitivanje zavisnosti između pojave fibrinoznog perikarditisa i drugih patomorfoloških
promena, indeksa performansi i kvaliteta mesa i trupa zaklanih svinja 422
- ◆ Jasna Kureljušić, Nikola Rokvić, Marija Pavlović, Dragana Ljubojević Pelić,
Suzana Vidaković Knežević, Jelena Vranešević, Nataša Kilibarda:
Listeria monocytogenes – parametar bezbednosti hrane 430
- ◆ Dragana Ljubojević Pelić, Dalibor Todorović, Miloš Pelić, Jelena Vranešević,
Suzana Vidaković Knežević, Jasna Kureljušić, Marija Pajić:
Značaj kontrole higijenskog kvaliteta sirovog mleka 436
- ◆ Aleksandra Tasić, Ivan Pavlović, Đorđe Radojičić, Milan Baltić:
Nalaz hemijskih kontaminanata u hrani animalnog porekla 445
- ◆ Milica Glišić, Marija Bošković Cabrol, Milan Ž. Baltić,
Vladimir Drašković, Zoran Maksimović:
Derivati celuloze kao materijal na biobazi za strukturisanje oleogelova 455
- ◆ Miloš Pelić, Nikolina Novakov, Dušan Lazić, Nenad Popov,
Milica Živkov Baloš, Jelena Vranešević, Dragana Ljubojević Pelić:
Prihvatanost od strane potrošača mesa riba gajenih u otpadnoj vodi iz klanice 462
- ◆ Saša Vasilev, Ljiljana Sabljic, Ivana Mitić, Nataša Ilić, Marija Gnjatović,
Ljiljana Sofronić Milosavljević:
Kontrola kvaliteta pregleda na prisustvo larvi *Trichinella* 469
- ◆ Jasna Đorđević, Tijana Ledina, Marija Kovandžić, Lazar Marković,
Milica Kovačević Filipović, Snežana Bulajić:
Procena higijenskih uslova muže magarica 471
- ◆ Zoran Ružić, Zdenko Kanački, Zorana Kovačević, Dragoljub Marić,
Srđan Todorović, Slobodan Knežević, Dušan Lazić:
Uticaj vitamina C i ranog termalnog kondicioniranja na
kvalitet mesa brojlera tokom toplotnog stresa 473
- ◆ Biljana Pećanac, Radovan Jeftenić, Dragana Rujević:
Živa u ribi i ribljim proizvodima kao potencijalna opasnost po zdravlje ljudi 475

TEMATSKO ZASEDANJE IX / PLENARY SESSION IX

SLOBODNE TEME / Free topics

- ◆ **Zorana Kovačević, Sara Mučibabić, Zoran Ružić, Nadežda Tešin, Ivan Stančić:**
Značaj magistralne izrade lekova u veterinarskoj praksi
The importance of drug compounding in veterinary practice 479
- ◆ **Jelena Janjić, Amir Zenunović, Drago Nedić, Spomenka Đurić, Branislav Vejnović, Milorad Mirilović, Milan Ž. Baltić:**
Ispitivanje uticaja delovanja različitih količina organskog selena u hrani na ekonomičnost proizvodnje pataka u tovu 489
- ◆ **Branislav Vejnović, Jevrosima Stevanović, Uroš Glavinić, Marko Ristanić, Milorad Mirilović, Spomenka Đurić, Zoran Stanimirović:**
Strategija kontrole *Varroa destructor* u Republici Srbiji
Control strategy of Varroa destructor in the Republic of Serbia 498
- ◆ **Danijela Videnović, Tamaš Petrović, Sara Savić:**
Epidemiološki aspekt prenosa virusa SARS-CoV-2 sa čoveka na kućnog ljubimca u vremenskom periodu od 2020 do 2022.
Epidemiological aspect of SARS-CoV-2 virus transmission from humans to pets in the period 2020-2022 507
- ◆ **Vuk Vračar, Jana Mitrović, Gordana Kozoderović, Tamás Süli, Stanislav Simin, Vesna Lalošević:**
Prvi nalaz gena za *Stx2a* u ukupnoj DNK fecesa svinja s područja Vojvodine 510
- ◆ **Mihajlo Erdeljan, Tijana Kukurić, Zorana Kovačević, Ivana Davidov, Miodrag Radinović, Annamaria Galfi Vukomanović:**
Topikalna terapija oboljenja kože konja 516
- ◆ **Marko Pajić, Slobodan Knežević, Dalibor Todorović:**
Prevalencija supkliničke kokcidioze na farmama tovnih pilića u Vojvodini 522
- ◆ **Ivan Galić, Jovan Spasojević, Tijana Kukurić, Tatjana Lazić, Ivan Stančić, Sandra Nikolić, Nadežda Tešin:**
Adenokarcinom mlečne žlezde mačaka – prikaz slučaja 524
- ◆ **Tijana Kukurić, Mihajlo Erdeljan, Marko Cincović, Mira Majkić, Ivan Galić, Jovan Stanojević:**
Termografija u dijagnostici oboljenja konja 530
- ◆ **Dragana Dimitrijević, Verica Jovanović, Boban Đurić:**
Grip i zoonotske bolesti u humanoj i veterinarskoj medicini u Republici Srbiji 534
- ◆ **Božo Eskić i sar.:**
Deficit vitamina B12 (kobalamina) kod pasa 536

RADIONICE / WORKSHOPS :

- ◆ **Dragan Vasilev, Tamara Bošković, Nevena Grković, Branko Suvajdžić:**
Metode pregleda mesa na trihinele u skladu sa novim propisima 541
- ◆ **Radislava Teodorović, Ljiljana Janković:**
Praktično sprovođenje biosigurnosnih mera – dezinfekcija, na farmama
Practical implementation of biosecurity measures – disinfection on farms 543

◆ Ljiljana Janković, Radislava Teodorović, Milutin Đorđević, Vladimir Drašković, Katarina Nenadović, Štefan Pintarič: Praktično sprovođenje biosigurnosnih mera dezinfekcije i deratizacije na farmama <i>Practical implementation of biosecurity measures of disinsection and deratization on farms</i>	550
◆ Maja Lukač: Klinička biologija i pravilno držanje gmazova u zatočeništvu	559
◆ Maja Lukač: Dijagnostički postupci pri utvrđivanju bolesti gmazova	567
◆ Miloš Vučićević: Afrički patuljasti ježevi – šta znamo do sada?	575

TEMATSKO ZASEDANJE I
PLENARY SESSION I

JEDNO ZDRAVLJE
ONE HEALTH

AKTIVNOSTI I ODGOVORNOSTI VETERINARSKIH SLUŽBI I SVETSKE ORGANIZACIJE ZA ZDRAVLJE ŽIVOTINJA NA GLOBALNOM, EVROPSKOM I NACIONALNOM NIVOU ZA UNAPREĐENJE KONCEPTA JEDNOG ZDRAVLJA

Budimir Plavšić

Kratak sadržaj

Jedno zdravlje, koje predstavlja integrisanu zaštitu zdravlja ljudi, životinja i životne sredine, definisano je od strane vodećih naučnih ustanova i međunarodnih zdravstvenih organizacija, posebno Svetske organizacije za zdravlje životinja (WOAH, osnovana kao OIE) i Svetske zdravstvene organizacije (SZO). Ono se u praksi ostvaruje kroz neposrednu saradnju nadležnih zdravstvenih službi, što se u tradicionalnom smislu podudara sa dobrom veterinarskom praksom, koja podrazumeva neraskidivu povezanost veterinarske i humane medicine, odnosno zaštitu zdravlja ljudi i očuvanje ekosistema. U skladu sa opštim kapacitetima veterinarskih službi, baziranim na kvalitetnoj osnovnoj i kontinuiranoj edukaciji, širokom opsegu veterinarske delatnosti definisanog propisima i međunarodnim standardima, veterinarska profesija je dostigla vodeće pozicije i ključnu ulogu u okviru koncepta Jednog zdravlja.

Veterinarska profesija, koja je u suštinskom smislu odgovorna za zdravlje i dobrobit životinja, veterinarsko javno zdravlje i promet životinja i hrane životinjskog porekla, ima izuzetan društveni značaj, što se ogleda i u tome što WOAHPromoviše veterinarske službe kao globalno javno dobro. Takvu reputaciju, veterinarski zdravstveni radnici dobili su zbog neizmernog doprinosa prevenciji i suzbijanju infektivnih oboljenja domaćih i divljih životinja, dobrobiti životinja, antimikrobnoj rezistenciji i odgovornoj primeni antimikrobnih i antiparazitskih lekova, bezbednosti hrane, međunarodnoj trgovini, jačanju privrede i razvoju sela, biomedicinskim i genetskim istraživanjima i očuvanju biodiverziteta. Međutim, u okviru Jednog zdravlja, podrazumeva se interdisciplinarni pristup i operativno partnerstvo između doktora veterinarske i humane medicine sa stručnjacima iz drugih oblasti kao što su ekologija, poljoprivreda, ekonomija, sociologija, industrija hrane i službama zaduženim za upravljanje zemljištem, biodiverzitetom i klimatskim promenama. Dobro razumevanje ovog pristupa omogućava veterinarima da se adekvatno pozicioniraju i doprinesu unapređenju planetarnog zdravlja, što je posebno značajno u vreme očiglednog postojanja višestrukih zdravstvenih kriza regionalnog i globalnog karaktera, sa nesagledivim posledicama. To uključuje pojavljivanje zoonoza kod kojih dolazi do preskakanja barijera vrsta i novih infektivnih bolesti čiji uzročnici

¹Dr sci. vet. med. Budimir Plavšić, Svetska organizacija za zdravlje životinja (WOAH, OIE), Regionalni predstavnik za Evropu, Moskva, Ruska Federacija

*<https://rr-europe.oie.int/en/news/fao-oie-and-who-call-for-stronger-coordination-in-mitigating-health-threats/>

još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni. Samo u toku poslednjih 40 godina, zabeleženo je šest zoonotskih pandemija, koje su vodile poreklo od životinja, uglavnom divljih.

WOAH, koja je osnovana skoro pre 100 godina, je jedinstvena međudržavna organizacija koja sa veterinarskim službama 182 države članice radi na unapređenju javnog zdravlja širom sveta donošenjem međunarodnih standarda za kopnene i vodene životinje, kao i dijagnostička sredstva i vakcine. Najviši organ ove organizacije, Skupština Delegata, usvojio je dve rezolucije o Jednom zdravlju u 2021 i 2022 godini, konkretizujući sa jedne strane podršku veterinarskim službama država članica da primene međusektorsku saradnju u ovoj oblasti i adekvatno se u njoj pozicioniraju, odnosno da sa druge strane pruže doprinos zdravstvenim službama da ispregovaraju međunarodni instrument za prevenciju, pripravnost i odgovor na pandemijske pretnje. Istovremeno, sa ključnim partnerima u okviru «kvadripartetnog» saveza za Jedno zdravlje (SZO, FAO i UNEP) WOAHA je razvio globalne strategije za usklađivanje politika i operativnih planova o Jednom zdravlju, u skladu sa najnovijim naučnim saznanjima. Usvojen je i Zajednički plan aktivnosti, kao osnov za donošenje regionalnih i nacionalnih strategija i akcionih planova od strane nadležnih organa.

Na istim principima, ove međunarodne organizacije su formirale regionalne mehanizme za Jedno zdravlje (uključujući i Evropu, gde je mehanizam uspostavljen u aprilu 2021. godine), čiji je cilj promocija i operativna primena ovih principa u zemljama članicama, u okviru svojih nacionalnih interesa ovlašćenja, u saradnji sa nacionalnim partnerima i zainteresovanim stranama.

Ključne reči: Jedno zdravlje, međusektorska saradnja, pandemije, planetarno zdravlje, veterinarska medicina

ACTIVITIES AND RESPONSIBILITIES OF VETERINARY SERVICES AND THE WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH AT THE GLOBAL, EUROPEAN AND NATIONAL LEVEL TO PROMOTE ONE HEALTH CONCEPT

Budimir Plavšić

Summary

The One Health, which represents the integrated protection of human, animal and environmental health, has been defined by leading scientific institutions and international health organizations, especially the World Organization for Animal Health (WOAH, founded as OIE) and the World Health Organization (WHO). In practical terms, there is direct cooperation of health workforces, which in the traditional sense coincides with a good veterinary practice, implying an inextricable connection between veterinary and human medicine to protect human health and preserve the ecosystem. Under the general capacities of veterinary services, based on quality primary and continuous education, a broad spectrum of veterinary activities defined by regulations and inter-

national standards, the veterinary profession has reached leading positions and a vital role within the One Health concept.

The veterinary profession, which is fundamentally responsible for the health and welfare of animals, veterinary public health and the trade in animals and food of animal origin, has exceptional social importance, which is reflected in the fact that WOAHA promotes veterinary services as a global public good. Veterinary health professionals have gained such a reputation due to their immense contribution to the prevention and control of infectious diseases in domestic and wild animals, animal welfare, antimicrobial resistance and the responsible use of antimicrobial and antiparasitic drugs, food safety, international trade, strengthening the economy and rural development, biomedical and genetic research and preservation of biodiversity. However, within One Health, there is need to implement an interdisciplinary approach and operational partnership between doctors of veterinary and human medicine with experts from other fields such as ecology, agriculture, economics, sociology, food industry, land management, biodiversity and climate change. A good understanding of this approach allows veterinarians to adequately position themselves and contribute to the improvement of planetary health, which is particularly significant at a time when multiple health crises of a regional and global nature, with unforeseeable consequences, are evident. These include the emergence of zoonoses that jump across species barriers and new infectious diseases whose causes have not yet been fully elucidated. In the last 40 years there have been six pandemics, all of which have originated from the spillover of zoonotic disease-including from wildlife.

WOAHA, founded as OIE almost 100 years ago, is a unique intergovernmental organization that works with the veterinary services of 182 member states to improve public health worldwide by adopting international standards for terrestrial and aquatic animals, diagnostics and vaccines. The highest body of this organization, the World Assembly of Delegates, adopted two results on the One Health in 2021 and 2022, specifying on the one hand, the support to the Veterinary Services of the Members to implement intersectoral cooperation in this area and adequately position themselves in it, and to provide on the other hand contribution to health services to negotiate an international instrument for prevention, preparedness and response to pandemic threats. At the same time, with key partners within the "quadripartite" alliance for One Health (WHO, FAO and UNEP), WOAHA has developed global strategies for harmonizing One Health policies and operational plans in line with the latest scientific knowledge. The Joint Plan of Activities was also adopted as a basis for embracing regional and national strategies and action plans by the competent authorities.

Based on the same principles, these international organizations formed regional mechanisms for One Health (including Europe, where it was established in April 2021), whose goal is the promotion and operationalize the implementation of these principles in Member countries, in close cooperation with national partners and stakeholders.

Key words: *multisectoral approach, One Health, pandemics, planetary health, veterinary medicine*

KONCEPT JEDNE MEDICINE – INTEGRACIJA HUMANE I VETERINARSKJE MEDICINE

Slavica Maris

Kratak sadržaj

Mnogi zdravstveni izazovi (*pandemija gripa, ebola, COVID-19*) sa kojima se suočavaju ljudi i životinje, nemaju jedinstven odgovor i zahtevaju kombinovan pristup u cilju obezbeđivanja napretka u zdravlju ljudi i životinja. Takav pristup može biti omogućen primenom koncepta Jedne medicine. Ovaj koncept promoviše saradnju između medicinske i veterinarske medicine u korist zdravlja ljudi i životinja putem paralelnih studija prirodno nastalih bolesti, koje su uporedive jedna sa drugom zbog genetskih i fizioloških sličnosti. U pogledu bolesti koje se spontano pojavljuju u prirodi, humana i veterinarska medicina imaju tačke konvergencije i preklapanja. Procenjuje se da 60 % postojećih zaraznih bolesti kod ljudi ima životinjsko poreklo. Bakterijski patogeni (*MRSA, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, E. coli*) predstavljaju zdravstvene izazove i za humanu i za veterinarsku medicinu. U cilju lečenja, neke klase antibiotika koji su veoma važni i spadaju u antibiotike visokog prioriteta (*cefalosporini 3. i 4. generacije, fluorohinoloni, kolistin*), se preklapaju u humanoj i veterinarskoj medicini. Prekomerna upotreba antibiotika kod ljudi i životinja i zloupotreba antibiotika su faktori koji doprinose nastanku mikrobne rezistencije. Mnoge nezarazne bolesti (*neurološke, onkološke, osteoartritis*) su zajedničke za ljude i životinje. Jedna medicina je koncept gde su humana i veterinarska medicina međusobno povezane i zavisne jedna od druge. Međusobna saradnja na ovoj platformi bi omogućila podjednak napredak za zdravlje ljudi i životinja.

¹Prim. mr sc. med. dr Slavica Maris, spec. epidemiologije, načelnik Jedinice za zarazne bolesti, Gradski zavod za javno zdravlje, Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa: slavica.maris@zdravlje.org.rs

TEMATSKO ZASEDANJE II
PLENARY SESSION II

AKTUELNA EPIZOOTIOLOŠKA SITUACIJA U
REPUBLICI SRBIJI I ZEMLJAMA IZ OKRUŽENJA
CURRENT EPISOOTIOLOGICAL SITUATION
IN THE REPUBLIC OF SERBIA AND
NEIGHBOURING COUNTRIES

EPIZOOTIOLOŠKA SITUACIJA U SRBIJI 2021. GODINE

***Jelica Uzelac, Boban Đurić, Saša Ostojić, Tatjana Labus,
Aleksandra Nikolić, Jelena Ćuk, Dragana Živanović***

Kratak sadržaj

Epizootiološka situacija u Republici Srbiji je u 2021. godini bila nepovoljna u pogledu naročito opasnih zaraznih bolesti zbog pojave afričke kuge svinja u novim okruzima i pojave avijarne influence.

Upoređujući 2020. godinu, kada su slučajevi afričke kuge svinje kod divljih svinja potvrđeni u tri okruga u Srbiji na granici sa Rumunijom (Borski, Zaječarski i Pirotski), u 2021. godini, bolest se dalje proširila na susedne teritorije, što je rezultiralo pojavom bolesti na području 7 okruga (Pirotski, Borski, Nišavski, Zaječarski, Braničevski, Južnobanatski i Pčinjski). Afrička kuga svinja se kod domaćih svinja, u 2020. godini, pojavila samo u Pirotskom i Borskom okrugu, dok se u 2021. godini proširila i potvrđena je u 9 okruga (Pirotski, Borski, Nišavski, Pomoravski, Rasinski, Zaječarski, Braničevski, Podunavski i Južnobanatski).

Pojava avijarne influence je utvrđena kod divljih ptica, ali i na malim individualnim gazdinstvima kod domaće živine. Bolest je prijavljena u 7 okruga (Zapadnobački, Grad Beograd, Raški, Severnobanatski, Severnobački, Južnobački i Južnobanatski).

Od drugih značajnih zaraznih bolesti životinja, u Republici Srbiji su bile prisutne: tuberkuloza goveda, bruceloza goveda, enzootska leukoza goveda, bruceloza ovaca i koza, Q groznica, trihineloza i američka kuga pčelinjeg legla.

Nije bilo značajnije pojave zoonoza, a saradnja sa epidemiološkom službom je bila dobra.

S obzirom, na aktuelnu epizootiološku situaciju u Evropi, ali i zemljama u okruženju, postoji opasnost od pojavljivanja pojedinih zaraznih bolesti (npr. kuge malih preživala), što povećava značaj jačanja kapaciteta veterinarske službe u zemlji i unapređenje saradnje sa proizvođačima, industrijom i drugim nadležnim službama, uključujući zdravstvenu službu.

Ključne reči: *afrička kuga svinja, avijarna influenza, epizootiološka situacija, zoonoze*

¹Dr vet. Jelica Uzelac; dr vet. Boban Đurić; dr vet. Saša Ostojić; dr vet. Tatjana Labus; dr vet. Aleksandra Nikolić; spec. dr vet. Jelena Ćuk; dr vet. Dragana Živanović, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za veterinu, Beograd

*e mail autora za korespondenciju: jelica.uzelac@minpolj.gov.rs

EPIZOOTIOLOGICAL SITUATION IN SERBIA IN 2021

**Jelica Uzelac, Boban Đurić, Saša Ostojić, Tatjana Labus,
Aleksandra Nikolić, Jelena Ćuk, Dragana Živanović**

Summary

The epizootiological situation in the Republic of Serbia in 2021 was unfavorable in terms of particularly dangerous infectious diseases, the appearance of African Swine Fever in new districts and the appearance of Avian Influenza.

Comparing 2020 when African Swine Fever cases in wild boar occurred in three districts in part of Serbia which is bordering with Romania (Borski, Zaječarski and Pirotski), in 2021, the disease has further spread to the neighboring territories, in 7 affected districts (Pirotski, Borski, Nišavski, Zaječarski, Braničevski, Južnobački and Pčinjski). While in 2020, African Swine Fever in domestic pigs occurred only in the Pirotski and Borski districts, in 2021 the disease has spread further to domestic pigs in 9 districts (Pirotski, Borski, Nišavski, Pomoravski, Rasinski, Zaječarski, Braničevski, Podunavski and Južnobački).

The occurrence of Avian Influenza has been established in wild birds, but also in small individual farms in domestic poultry. The disease was reported in 7 districts (Zapadnobački, City of Belgrade, Raški, Severnobački, Severnobački, Južnobački and Južnobački).

Among other important infectious diseases of animals in the Republic of Serbia, the following were present: Bovine tuberculosis, Bovine brucellosis, Enzootic bovine leukosis, Caprine and ovine brucellosis, Q Fever, Trichinellosis, American fowl pest.

There were no significant outbreaks of zoonoses, and cooperation with the epidemiological service is good.

Considering the current epizootic situation in Europe and the surrounding countries, there is a danger of the appearance of certain infectious diseases (e.g. Peste des petits ruminants), which increases the importance of strengthening the capacity of the veterinary service in the country and improving cooperation with producers, industry and other competent services, including the health service.

Key words: African swine fever, Avian influenza, epizootiological situation, zoonosis

ARTRITIS ENCEFALITIS KOZA – KARAKTERISTIKE BOLESTI, EPIZOOTIOLOŠKA SITUACIJA I MERE KONTROLE

**Zoran Debeljak¹, Milena Živojinović², Ljubiša Veljović³,
Boban Đurić⁴, Olivera Vukelić⁴, Jelica Uzelac⁴, Slobodan Maksimović⁵,
Miroljub Dačić⁶, Dejan Bugarski⁷**

Kratak sadržaj

Artritis encefalitis koza (AEK) je oboljenje izazvano virusom iz roda Lentivirusa. U grupu lentivirusa malih preživara (LVMP), pored virusa uzročnika AEK spada i uzročnik medi-visna (MV) bolesti ovaca. Od pet poznatih genotipova LVMP (označeni od A do E, sa većim brojem podtipova), kao uzročnik AEK dominantan je genotip B, ali se koze mogu inficirati i genotipom A, koji je prevashodni uzročnik MV ovaca. Bolest se karakteriše dugim inkubacionim periodom i upornim širenjem. Najčešća klinička manifestacija je encefalomijelitis jaradi, a kod odraslih jedinki hronični artritis, indurativni mastitis i intersticijalna pneumonija. Trajni izvori oboljenja i rezervoari virusa su inficirane jedinke kod kojih se razvija perzistentna infekcija. Inficirana životinja doživotno izlučuje virus kolostrumom, mlekom, fecesom, slinom i sadržajem iz pluća. Bolest se u zapatu dominantno širi vertikalno kolostrumom, sa majke na potomstvo, kao i horizontalno direktnim i indirektnim kontaktom prijemčivih sa inficiranim životinjama i kontaminiranom opremom. Dijagnostika bolesti se bazira na kliničkoj slici i rezultatima epizootioloških i seroloških ispitivanja (AGID, Elisa, Western-blot). Rezultati molekularnih ispitivanja su osnov detaljnog definisanja epizootioloških karakteristika bolesti. Kontrola oboljenja je kompleksna i usmerena ka dobijanju i očuvanju statusa stada slobodnog od infekcije. Bolest ima veliki epizootiološki značaj i izaziva velike direktne i indirektne ekonomske štete.

¹Dr sci. vet. med. Zoran Debeljak, naučni saradnik, Veterinarski specijalistički institut „Kraljevo” Kraljevo, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Milena Živojinović, istraživač saradnik, Veterinarski specijalistički institut „Požarevac” Požarevac, R. Srbija

³Dr sci. vet. med. Ljubiša Veljović, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije “Beograd” Beograd, R. Srbija

⁴Spec. dr vet. Boban Đurić; spec. dr vet. Olivera Vukelić; spec. dr vet. Jelica Uzelac; Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za veterinu, Beograd, R. Srbija

⁵Spec. dr vet. Slobodan Maksimović, Veterinarski specijalistički institut „Šabac” Šabac, R. Srbija

⁶Dr sci. vet. med. Miroljub Dačić, Veterinarski specijalistički institut „Jagodina” Jagodina, R. Srbija

⁷Dr sci. vet. med. Dejan Bugarski, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo “Novi Sad” Novi Sad, R. Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: debeljak@vsikv.com

Dijagnostičkim ispitivanjima na AEK, koja su realizovana u 2018. godini, u Srbiji je po prvi put sproveden dijagnostički laboratorijski monitoring bolesti. Primenom formule (Segun Cannon Y Roe, 1982) u cilju ustanovljavanja prisustva-odsustva bolesti na nivou zapata, određen je reprezentativan broj životinja za serološka ispitivanja na AEK. Monitoringom su bile obuhvaćene farme sa više od 50 priplodnih koza, podeljene u kategorije: 50 -100, 100 -500 i >500 koza. Za stada do 50 grla, važila je obaveza laboratorijskog pregleda muških priplodnih životinja. Laboratorijskim ispitivanjem uzoraka, poreklom sa 141 farme, u 79 stada (56,3 procenta) ustanovljeno je prisustvo serološki pozitivnih životinja na AEK. U odnosu na zaražene, u grupi farmi sa 50 -100 životinja bilo je zaraženo 48 stada (52,2 procenta), a u grupi farmi sa više od 100 koza bila je zaražena 31 farma (63,3 procenta).

Ovi prvi reprezentativni rezultati ispitivanja seroprevalencije AEK u Srbiji, uz rezultate kontrole muških priplodnih životinja i pasivnog nadzora, treba da budu osnova za definisanje strategije kontrole bolesti u Srbiji.

Ključne reči: *arthritis encefalitis koza, epizootička situacija, mere kontrole*

UVOD

Arthritis encefalitis koza (AEK) je oboljenje izazvano RNA virusom iz roda *Lentivirusa*. S obzirom da uzročnik pripada većoj grupi virusa zajedničkih karakteristika, oni su svrstani u grupu lentivirusa malih preživara (LVMP) u koju, pored virusa uzročnika AEK, spada i uzročnik medi-visna bolesti ovaca (MV).

Bolest se klinički manifestuje poliartritisima, indurativnim mastitisom, hroničnom kliničkom ili subkliničkom intersticijalnom pneumonijom i hroničnim encefalomijelitisom kod odraslih, a kod mladih životinja akutnim leukoencefalitisom i progresivnim parezama.

ETIOLOGIJA

Bolest uzrokuje virus koji pripada familiji *Retroviridae*, podfamiliji *Orthoretrovirinae*, rodu *Lentivirinae*. Pored virusa koji uzrokuje arthritis encefalitis koza (AEKV), ovoj grupi pripadaju i virusi koji uzrokuju: medi-visna bolest ovaca (MVV), virus infektivne anemije konja (IAKV), kao i virusi: imunodeficijencija ljudi (HIV-1 i HIV-2), mačaka (engl: *Feline Immunodeficiency Virus* – FIV), goveda (engl. *Bovine Immunodeficiency Virus* – BIV) i majmuna (engl. *Simian Immunodeficiency Virus* – SIV).

Na osnovu ćelijskog tropizma i kliničkih manifestacija bolesti, lentivirusi se dele u dve grupe. Prvoj grupi pripadaju virusi koji izazivaju imunološku deficijenciju (HIV1, HIV2, FIV, BIV i SIV), inficirajući limfocite ćelije i monocitno makrofagne loze. Drugoj grupi pripadaju virusi koji se razmnožavaju u makrofagama i izazivaju multiorganska oboljenja (AEKV, MVV i IAKV).

Klasifikacija virusa AEK-a i MV u grupu lentivirusa malih preživara (LVMP) bazirana je na filogenetskoj analizi genoma više sojeva virusa izolovanih u toku

pojave ovih bolesti. Od pet poznatih genotipova LVMP (označenih od A do E, sa većim brojem podtipova), kao uzročnik AEK-a je dominantan genotip B, ali se koze mogu inficirati i genotipom A, koji je prevashodni uzročnik MV ovaca. Brojne studije danas dokazuju prenos virusa u oba pravca, sa ovaca na koze i sa koza na ovce.

PATOGENEZA

Većina životinja se inficira posle rođenja sisanjem mleka zaraženih majki. Bolest se klinički razvija posle više meseci ili godina. U zaraženom organizmu, virus stalno inficira ćelije monocitno makrofagne loze i u organizmu se širi preko njih. Oboljenje je rezultat zapaljenjskog procesa izazvanog reakcijom imunskog sistema domaćina, a osnova hroničnih zapaljenjskih procesa u tkivima su imuni kompleksi. Lezije su u osnovi limfoproliferativne prirode.

Virus izaziva multisistemski sindrom koji primarno dovodi do demijelinizacije u nervnom sistemu, koja je često praćena i intersticijalnom pneumonijom. Ukoliko životinje prežive ovu fazu, bolest može potrajati godinama.

U daljem toku oboljenja razvijaju se hronični artritis, sa hiperplazijom sinovijalnih ćelija. U kasnijem toku, na zglobovima nastaju fibroze, nekroze i kalcifikacije sinovijalnih membrana. Hronična intersticijalna pneumonija i oticanje i induracija mlečne žlezde, mogu biti vidljivi u svim oblicima i tokovima bolesti.

Artritis encefalitis koza se karakteriše doživotnim perzistiranjem virusa u monocitima i makrofagima domaćina i zbog toga su inficirane životinje doživotne kliconoše sa proporcionalnim razvojem kliničke slike. Ova činjenica uzrokuje različito dug period od inficiranja životinje do stvaranja serološkog odgovora i mogućnosti ustanovljavanja specifičnih antitela. Razvoj neutralizirajućih antitela ne prati proporcionalno virusnu replikaciju. Klinička slika oboljenja ne mora koincidirati sa infekcijom, niti infekcija sa imunskim odgovorom, ali je prisustvo specifičnih antitela sigurna potvrda infekcije.

Životinje koje su inficirane vakcinalnim virusom razvijaju mnogo jaču kliničku sliku, što isključuje vakcinalnu kontrolu bolesti. Virus je neotporan na dejstvo temperature, fenolnih i kvaternernih amonijumskih jedinjenja.

EPIZOOTIOLOGIJA

Raširenost bolesti

Bolest je bila nepoznata u vreme dominantnog gajenja koza za proizvodnju mesa i dlake, ali intenziviranjem proizvodnje kozjeg mleka, sve više dobija na značaju. Danas je prisutna u mnogim zemljama i na svim kontinentima gde je razvijena ova grana stočarske proizvodnje. U zemljama sa intenzivnim kozarstvom (Kanada, Norveška, Švajcarska, Francuska i Severna Amerika), seroprevalencija AEK-a je veća od 65 procenata. U različitim zemljama, prevalencija bolesti je različita, a viša je u zemljama u razvoju, sa intenzivnijim uvozom mlečnih rasa koza iz zemalja Evrope i Severne Amerike. Prevalencija se razlikuje u pojedinim

krajevima jedne zemlje, a klinička manifestacija bolesti je značajno različita od pojavne i stvarne seroprevalencije.

Faktori rizika vezani za domaćina

U prirodnim uslovima, bolest je specifična za koze kao životinjsku vrstu. U eksperimentalnim uslovima je moguće i zaražavanje ovaca. Brojne studije, danas dokazuju, prenos virusa u oba pravca, sa ovaca na koze i sa koza na ovce, što ne mora rezultirati kliničkom slikom oboljenja. Produženi zajednički boravak ovaca sa zaraženim kozama ne rezultira pojavom infekcije i serokonverzije. Međutim, jagnjad koja sisa zaražene koze u dužem vremenskom periodu razvija perzistentnu infekciju i serokonverziju. Eksperimentalna inokulacija virusa u zglobove jagnjadi dovodi do artritisa i serokonverzije. Takođe, eksperimentalna infekcija novorođene teladi dovodi do serokonverzije posle jednog meseca.

Na oboljenje su osetljive sve rase koza. Neka istraživanja dokazuju da postoji učestalija pojava bolesti kod nekih rasa, što je pre u vezi sa tehnologijom gajenja, nego sa rasnom predispozicijom. Naime, kod mlečnih rasa koza je veća mogućnost horizontalnog širenja bolesti, mada je i ovo u vezi sa sistemom upravljanja koji je karakterističan za pojedine farme.

Ne postoje razlike u osetljivosti na bolest kod različitih starosnih kategorija. Nema ni pravilnosti u distribuciji seroprevalencije po starosnim kategorijama, u različitim stadima. Dok je u nekim stadima ova distribucija ravnomerna u različitim starosnim grupama, u drugima je evidentan porast seroprevalencije sa većom starošću životinja. Međutim, ovo je više odraz razlika u upravljanju farmom i razlike u relativnom značaju pojedinih puteva širenja bolesti u pojedinim stadima. Porast prevalencije sa starošću životinja ukazuje na značajno učešće horizontalnih puteva širenja bolesti u tom zapatu.

Međutim, u odnosu na starost inficiranih životinja postoja razlike u kliničkim manifestacijama bolesti. Kod odraslih životinja, dominantan klinički oblik oboljenja su: artritis, indurativni mastitis, intersticijalne pneumonije, kaheksija i reproduktivne smetnje. Kod mladih životinja, u starosti do 1 godine, bolest se manifestuje nervnom formom uzrokovanom akutnim leukoencefalitisom. Polna predispozicija, odnosno rezistencija na oboljenje nije ustanovljena.

Putevi prenošenja

Inficiranje životinja može nastati na više načina, pri čemu su pojedini putevi inficiranja različito značajni u epizootiologiji oboljenja. Intrauterina infekcija je moguća, ali je njen značaj relativno mali. U periodu posle rođenja, bolest se može preneti kolostrumom, mlekom, kontaktom sa vaginalnim sekretom, plodovim vodama, krvlju, slinom, pljuvačkom ili respiratornim sekretom.

Proučavanja prirodnih pojava bolesti, kao i eksperimentalnih infekcija, ukazuju da je glavni put širenja bolesti preko kolostruma i mleka. Virus AEK-a je izolovan iz ćelija mleka, poreklom od zaraženih koza. Prisustvo antitela u kolostru-

mu ne prevenira infekciju. Mladunčad rođena od neinficiranih majki, ali hranjena kolostrumom i mlekom od zaraženih koza bivaju inficirana. Kraće hranjenje mlekom inficiranih koza nedovoljno je za infekciju mladunčadi. Rizik za infekciju mladunčadi je mnogo manji ukoliko su, odmah po rođenju, izdvojena od inficiranih majki i hranjena pasterizovanim kolostrumom i mlekom, odnosno zamena ma za mleko. Na ovaj način, mnoga mladunčad može biti sačuvana od inficiranja.

Horizontalni prenos bolesti je evidentan u svim starosnim kategorijama. Kontaktom će se brže i lakše širiti u stadima u kojima se prvi put pojavljuje. Ovo je značajan način širenja bolesti u zemljama u koje je oboljenje uneto uvezenim inficiranim životinjama. Produženi kontakt neinficiranih sa zaraženim životinjama pomaže i olakšava horizontalni prenos.

S obzirom da mleko sadrži slobodan virus i virusom inficirane ćelije, oprema za mužu u potencijalnom širenju bolesti je veoma značajna. Jatrogeno i venerično širenje oboljenja je moguće, ali ograničenog značaja.

Ekonomski značaj bolesti

Ekonomski značaj bolesti se ogleda u direktnim štetama koje nastaju zbog povećane smrtnosti, kao i indirektnim štetama u proizvodnji koje nastaju zbog smanjenja proizvodnih mogućnosti i većeg broja izlučenih životinja. Seropozitivna stada imaju visoku stopu incidencije bolesti. Indeks životinja za izlučivanje u zaraženim stadima je visok. U zaraženim stadima se zbog artritisa, godišnje izluči od 5 do 10 procenata koza. Seropozitivne životinje imaju značajno smanjenje produkcije mleka, smanjenu dužinu laktacije, kao i smanjene reproduktivne sposobnosti. Prisustvo infekcije u stadu smanjuje vrednost životinja u prodaji.

KLINIČKA SLIKA

Klinička manifestacija AEK-a zavisi od starosti obolelih životinja i toka bolesti. Takođe je zapažena različitost kliničkih manifestacija oboljenja u odnosu na različita stada i regione. Prema nekim literaturnim navodima, manje od 20 procenata inficiranih životinja ispolji kliničke manifestacije bolesti u toku života.

Mlade životinje obole najčešće u starosti od 2 do 5 meseci. Sindrom se karakteriše unilateralnom ili bilateralnom parezom prednjih ili zadnjih nogu. Ako bolest počne unilateralnom parezom, ona za 5 do 10 dana postaje bilateralna. U ranim fazama bolesti, korak je skraćen i talasast, da bi kasnije postao slab i nemoćan. Ako su zahvaćeni zadnji ekstremiteti, životinja sve češće mirno stoji sa otežanom koordinacijom i zanošenjem zadnjeg dela tela. Neposredno pre ovih znakova, obolela mladunčad je vesela i hitra, normalno jede i pije. Oštećenje mozga može biti praćeno držanjem glave u stranu, tortikolisom i nekoordinisanim okretanjem glave. Refleks gutanja ostaje sačuvan do smrti, ali zbog napredovanja paralize jarad prestaje da jede i uginjava. Pored nervne forme, jarad može oboleti i od zglobne forme.

Odrasle koze boluju uglavnom od zglobne forme bolesti. U osnovi ove forme oboljenja je hronični hiperplastični sinovitis koji se može pojaviti na jednom ili više zglobova (prednje koleno, lakatni, rameni, skočni, koleno, kuk). Zbog promena koje zahvataju okolno tkivo, zglobnu kapsulu i burze, zglob je uvećan i zadebljao. Pojava može nastati postepeno ili iznenada. Bolest se razvija sporo, dugo traje i ima tendenciju trajnog pogoršanja. U toku napredovanja bolesti se pojavljuje šepavost, a životinja sve teže hoda i sve češće leži. Zbog smanjenog uzimanja hrane obolele životinje mršave, dlaka gubi sjaj i pojavljuju se dekubitusi. Kod gravidnih životinja nastaje pobačaj. Artritis mogu biti udruženi sa intersticijalnom pneumonijom koja može biti klinički inaparentna.

Kod odraslih životinja je česta pojava indurativnih mastita. Obolelo vime je tvrdo i otečeno pa se zbog toga naziva i "tvrda vreća". Obično se ovi mastitisi pojavljuju nekoliko dana posle jarenja. Nema sistemskog oboljenja, niti bakterijskog mastitisa. Oporavak nikada nije kompletan, ali može biti gradualnog poboljšanja.

PATOANATOMSKE PROMENE

Lokalizacija i vrsta patoanatomskih promena zavise od toka bolesti i organa koji su primarno zahvaćeni.

U toku zglobne forme, dominantna je degenerativna bolest više zglobova u tipu hroničnog polisinovitisa. Zglobovi su otečeni i sa povećanom količinom sinovijalne tečnosti. Zglobna površina je oštećena, sa ulceracijama i proliferacijama vezivnog tkiva. Često je taloženje mineralnih soli, zbog čega zglobni sadržaj poprima karakterističan izgled i konzistenciju (poput paste za zube). U toku ove forme bolesti, česta je pojava atrofije mišića nogu na kojima se nalaze zahvaćeni zglobovi.

U neuralnoj formi, dijagnostičke promene su u nervnom sistemu i obuhvataju belu masu, posebno vratnog dela kičmene moždine, a ponekad i mali mozak i moždano stablo. Promene su bilateralne, u tipu negnojnog demijelinizirajućeg encefalomijelitisa.

Pluća su difuzno crveno prošarana sa intersticijalnom pneumonijom. Lokalni limfni čvorovi su značajno uvećani.

Na plućima, mozgu i vimenu se mogu naći pojedinačne ili brojne nekroze. Iako je kod većine obolelih životinja konstatovan intersticijalni nefritis, makroskopske lezije u tipu kortikalnih infarkta se ređe sreću.

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Uzorci za laboratorijsko ispitivanje

Za serološka ispitivanja se koristi krvni serum obolelih, ili na oboljenje sumnjivih životinja. Neki autori navode mogućnost korišćenja mleka kao uzorka za serološki monitoring stada, ELISA testom.

Za histološko ispitivanje, u laboratoriju se dopremaju uzorci pluća, bronhijalnih limfnih čvorova, mlečne žlezde, sinovijalnih membrana i mozga, fiksirani u formalinu.

Za virusološki pregled se dostavljaju uzorci pluća, sinovijalnih membrana, mlečne žlezde i nervno tkivo.

Laboratorijska potvrda bolesti

Dijagnostika bolesti se bazira na rezultatima kliničkog pregleda, kao i rezultatima epizootičkih i seroloških ispitivanja (AGID, Elisa, Western-blot). Pozitivan serološki nalaz potvrđuje infekciju, ali ne potvrđuje da su eventualni klinički znaci izazvani virusom AEK-a. Mladunčad inficirana posle porođaja ima merljiva antitela između 4. i 10. nedelje posle infekcije. Zbog prisustva kolostralnih antitela do starosti od 90 dana, do ovog uzrasta se serološki nalaz ne može uzeti kao merodavan u postavljenju dijagnoze. Period između infekcije i pojave specifičnih antitela može biti različito dug, tako da negativan serološki nalaz ne isključuje mogućnost infekcije. Katkada koze proizvode veoma nizak titar antitela koji nije moguće ustanoviti, a nizak titar je veoma čest u fazi visokog graviditeta. Seropozitivan nalaz, kod koza starijih od 6 meseci, je potvrda infekcije i kod mnogih, ali ne i kod svih životinja, se zadržava celog života.

U laboratorijskoj dijagnostici je dokazana unakrsna reaktivnost sa drugim lentivirusima (npr. HIV infekcija), što može imati uticaja u dijagnostici ovih bolesti kod ljudi.

Pored seroloških nalaza, postavljanju dijagnoze doprinosi i ustanovljavanje karakterističnih histoloških lezija. Opisane su histohemijske metode za dokazivanje virusa, kao i testovi prepoznavanja njegove nukleinske kiseline.

Rezultati molekularnih ispitivanja su osnov detaljnog definisanja epizootičkih karakteristika bolesti. Identifikacija prisustva virusa izolacijom na kulturi tkiva je moguća, ali je u izvesnoj meri problematična.

DIFERENCIJALNA DIJAGNOSTIKA

Diferencijalna dijagnoza zglobne forme bolesti uključuje druge uzročnike artritisa, a posebno one koji su uzrokovani mikoplazmama ili hlamidijama. Takođe se moraju isključiti i brojni bakterijski artritis.

Neuralna forma se mora razlikovati od listerioze, cerebrosposinalnih parazitoza kičmenog abscesa, deficita bakra, polioencefalomalacije izazvane različitim uzrocima, kao i od potencijalnih trovanja.

Bolest treba diferencijalno dijagnostički razgraničiti i od maedi-visna, a mastitis od brojnih bakterijskih uzročnika mastitisa.

KONTROLA BOLESTI

Mere kontrole bolesti baziraju se na tri osnovna pristupa.

Prvi podrazumeva mere i postupke za očuvanje statusa stada slobodnog od bolesti. U ovom pristupu je neophodno obezbeđenje uslova kontrolisanog unosa novih životinja u stado slobodno od infekcije, uz poštovanje svih biosigurnosnih i karantinskih mera. Pored toga, stada koja su slobodna od bolesti moraju se redovno testirati na oboljenje.

Drugi pristup, koji je prihvaćen i primenjuje se u mnogim zemljama sa razvijenom kozarskom proizvodnjom, podrazumeva takav sistem upravljanja farmom koji u stadu obezbeđuje održavanje stepena infekcije na nivou koji omogućava ekonomičnost proizvodnje, kao i neophodni minimum zdravstvenog statusa i dobrobiti životinja. Ovo je veoma kompleksan sistem upravljanja farmom koji obezbeđuje takozvani "život sa bolešću".

Treći pristup podrazumeva sistem upravljanja farmom i sprovođenja mera kontrole i suzbijanja čiji je cilj da se bolet suzbije i iskoreni iz stada i da farma koja je bila zaražena postigne status farme slobodne od bolesti.

Uspešnost kontrole oboljenja u zaraženom stadu zavisi od preveniranja i minimiziranja postporođajne infekcije mladunčadi, kao i horizontalnog širenja infekcije.

Preveniranje posleporođajne infekcije

Osnov sprečavanja posleporođajne infekcije je odvajanje novorođenih životinja od majke odmah posle rođenja. U prvih pet dana po rođenju, mladunčad mora biti hranjena termički obrađenim kolostrumom (56°C u toku jednog sata ili 62°C u toku ½ sata), ili kolostrumom krave. Posle ovog perioda, jarad se hrani zamenama za mleko. Evidentna je značajna razlika u serokonverziji, u stadima u kojima se primenjuje ovaj pristup, u odnosu na stada u kojima se mladunčad odgaja bez preveniranja posleporođajnog inficiranja.

Testiranje i izdvajanje životinja

Svi programi kontrole bolesti podrazumevaju kontinuirana serološka ispitivanja stada. Serološki se kontrolišu životinje starije od 3 meseca (do tada postoje maternalna antitela), svakih 6 meseci. Životinje sa serološki pozitivnim nalazom se, u zavisnosti od pristupa, ili uklanjaju iz stada ili se drže i eksploatišu u strogo izolovanim uslovima u odnosu na deo stada koji je bio serološki negativan.

Period između infekcije i serokonverzije varira i nije stalan, tako da optimalno vreme za testiranje nije određeno. Praćenjem serokonverzije u zaraženim stadima, definisan je okvirni period od 6 meseci, a posle toga se ispitivanje ponavlja. U velikim stadima sa visokom seroprevalencijom, poželjno je i preporučuju se češća testiranja, sa razmacima ne kraćim od 4 meseca.

S obzirom na mogućnost horizontalnog širenja bolesti među odraslim kozama, izdvajanje seropozitivnih životinja u zasebne celine je veoma bitno.

Imajući u vidu značaj mleka u širenju infekcije, muža inficiranih, a izdvojenih životinja mora se organizovati u posebnim uslovima, najbolje u zasebnom prostoru, uz korišćenje posebne opreme.

Neke zemlje imaju programe za akreditaciju stada slobodnih od ove bolesti. Ovaj status se postiže sa 2 uzastopna negativna serološka nalaza u stadu, sa razmakom od 6 meseci, kao i strogom kontrolom unosa novih životinja.

S obzirom na odsustvo efektivne vakcine, kao i kompleksnih postupaka kontrole i suzbijanja oboljenja, sve češća su istraživanja mogućnosti razvoja genetske rezistentncije na AEK. Rezultati najnovijih istraživanja sugerišu mogućnost da prevalencija AEK-a može biti smanjena, čak eliminisana primenom genetske selekcije u cilju stvaranja rezistencije na AEK u kombinaciji sa adekvatnim upravljanjem na farmama koza.

U preventivi infekcije stada, kao i merama kontrole u zaraženim stadima, sistem upravljanja farmom ima odlučujući uticaj i prevashodno od njega zavisi pravilan izbor cilja, mere koje će se sprovoditi i krajnji efekat.

EPIZOOTIČKA SITUACIJA I KARAKTERISTIKE AEK U SRBIJI

Prvi laboratorijski potvrđeni slučajevi AEK-a u Srbiji odnosili su se na serološku potvrdu infekcije kod životinja iz uvoza, u toku karantinskih ispitivanja, početkom 21. veka. U svim slučajevima prijavljenog uvoza, kod potvrde oboljenja sprovedena je eutanazija uveženih zapata. Međutim, određeni broj uvoza visoko vrednih priplodnih životinja, koje su bile inficirane virusom AEK-a, obavljen je van učešća i/ili adekvatnog nadzora čime je uveženim životinjama uneta i bolest. Ovo je posebno bitno kada se imaju u vidu činjenice o čestim supkliničkim infekcijama, kao i o značaju priplodnih farmi u daljem širenju infekcije prodajom priplodnih životinja. Važna je činjenica da su najčešći uvozi priplodnih mlečnih koza bile upravo iz zemalja u kojima je bolest bila enzootski prisutna i u kojima je kozarstvo "živelo" sa bolešću. Posledice su bile neminovne: pojava kliničkih slučajeva bolesti, često skrivanje bolesti i dalje širenje. Ovom procesu je bitno doprineo i pozitivan trend gajenja koza, popularnost i povećana potražnja kozjih proizvoda.

Rezultati serološkog monitoringa iz 2018. godine

S obzirom na sve češće pojedinačne slučajeve pojave bolesti, 2018. godine je, od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprave za veterinu donet Plan dijagnostičkih ispitivanja na artritis i encefalitis koza (AEK) i bolest maedi visna ovaca (MVO). Ovaj monitoring je projektovan kao deo šireg nadzora bolesti čiji je cilj bilo serološko ispitivanje prisustva/odsustva bolesti u zapatima koza na individualnim gazdinstvima i farmama u Srbiji. Monitoringom su definisane četiri grupe stada u kojima su realizovana ispitivanja. Broj uzoraka je određen na osnovu veličine stada, korišćenjem epizootičke formule za usta-

novljavanje prisustva-odsustva bolesti na nivou zapata (Segun Caon Y Roe, 1982) uz parametre 95 procenata nivoa pouzdanosti i 10 procenata očekivane prevalencije. U grupi 1. bila su stada koza do 50 grla u kojima su po Programu mera ispitivani priplodni jarčevi. U 2. grupu su svrstana stada sa 50 do 100 grla i u njoj su ispitivani priplodni jarčevi, kao i 25 priplodnih koza po slučajnom izboru, uz poštovanje epizootioloških principa različitog rizika (koze nabavljene iz drugih stada, poreklo iz uvoza, grla starija od 24 meseca i dr.). Istovetni kriterijumi su primenjeni i u 3. grupi (100-500 grla), kao i u 4. grupi (preko 500 životinja), u kojima je pored priplodnih jarčeva uzorkovana krv od 28 koza.

Laboratorijskim ispitivanjem uzoraka krvi priplodnih jarčeva i koza poreklom sa 141 farme, u 79 stada (56,3 procenata) je ustanovljeno prisustvo serološki pozitivnih životinja na AEK. U odnosu na zaražene, u grupi farmi sa 50-100 životinja bilo je zaraženo 48 stada (52,2 procenta), a u grupi farmi sa više od 100 koza bila je zaražena 31 farma (63,3 procenta). U najvećem broju stada sa seropozitivnim životinjama, od pregledanih 25 ili 28 uzoraka, utvrđeno je do 6 seropozitivnih jedinki (49,4 procenata).

Tabela 1. Rezultati serološkog ispitivanja na AEK u okviru monitoringa 2018. godine

Epizootiološko područje	Farme sa 50-100 grla			Farme sa više od 100 grla			Ukupno		
	Ukupno	Pozitivne	Neg.	Ukupno	Pozitivne	Neg.	Ukupno	Pozitivne	Neg.
VSI Zaječar*	5	0	5	1	0	1	6	0	6
VSI Zrenjanin	4	2	2	3	2	1	7	4	3
VSI Jagodina	6	2	4	0	0	0	6	2	4
VSI Kraljevo	12	6	6	8	8	0	20	14	6
VSI Niš	28	15	13	10	5	5	38	20	18
VSI Pančevo	8	7	1	8	5	3	16	12	4
VSI Požarevac	5	3	2	3	2	1	8	5	3
VSI Sombor*	2	0	2	1	0	1	3	0	3
VSI Subotica	5	4	1	2	2	0	7	6	1
VSI Šabac	5	3	2	1	1	0	6	4	2
NIV Novi Sad	10	4	6	7	4	3	17	8	9
NIVS Beograd	2	2	0	5	2	3	7	4	3
Ukupno:	92	48	44	49	31	18	141	79	61
		52,2 %	47,8 %		63,3 %	36,7 %		56%	43,3 %

*Institut na čijem epizootiološkom području nisu ustanovljene serološki pozitivne životinje

Od ispitanih uzoraka, poreklom sa 141 farme, u 61 farmi (43,3 procenata) nije utvrđena ni jedna seropozitivna životinja. Na epizootiološkim područjima VSI "Sombor" i VSI "Zaječar" u pregledanih 9 farmi nije ustanovljena seroprevalencija AEK-a.

Rezultati navedenih seroloških ispitivanja po epizootiološkim područjima pojedinih instituta i veličine farmi prikazani su u tabeli 1.

Distribucija serološki pozitivnih farmi koza u Srbiji, po okruzima, na osnovu realizovanog serološkog monitoringa prikazana je u tabeli 2.

Tabela 2. Broj seropozitivnih farmi, naselja i opština po okruzima

Red. broj	OKRUG	Broj serološki pozitivnih		
		Opština	Naselja	Farmi
1.	Severnobanatski	5	7	7
2.	Severnobački	2	2	2
3.	Srednjobanatski	1	1	1
4.	Južnobački	4	4	4
5.	Zapadnobački**	0	0	0
6.	Sremski	4	4	4
7.	Južnobanatski	6	9	12
8.	Braničevski	5	5	5
9.	Podunavski**	0	0	0
10.	Grad Beograd	3	4	4
11.	Kolubarski	1	1	1
12.	Mačvanski	2	3	3
13.	Zaječarski**	0	0	0
14.	Šumadijski	1	1	1
15.	Pomoravski	1	1	1
16.	Rasinski	2	2	2
17.	Raški	3	4	4
18.	Zlatiborski	5	7	8
19.	Jablanički	4	4	4
20.	Nišavski	3	3	5
21.	Pčinjski	2	2	3
22.	Pirotski	4	8	8
23.	Toplički**	0	0	0
24.	Moravički	Nije rađen monitoring na području ova dva okruga		
25.	Borski			
Ukupno:	19	58	72	79
	82,6%	43,9%		56%

**Okrug na čijoj teritoriji nisu ustanovljene serološki pozitivne životinje

Od 29 okruga, koliko ih ima u Srbiji, monitoringom su bile obuhvaćene farme koje su se nalazile na području 23 okruga. Serokonverzija je ustanovljena na farmama koza na teritoriji 19 okruga (82,6 procenata u odnosu na pregledane i 65,5 procenata u odnosu na sve okruge u Srbiji). Na teritoriji Zaječarskog, Podunavskog, Zapadnobačkog i Topličkog okruga nisu ustanovljene seropozitivne životinje.

Teritorijalna distribucija serološki pozitivnih farmi koza u Srbiji, po opštinama, na osnovu realizovanog serološkog monitoringa prikazana je na kartogramu 1.

Kao što se vidi na kartogramu 1, od ukupno 132 opštine u Srbiji (van područja KiM) farme sa seropozitivnim životinjama su se nalazile na teritoriji 58 opština (43 procenta).



Kartogram 1. Prostorna distribucija AEK-a u Srbiji po opštinama, u monitoringu 2018. godine

Na osnovu rezultata prvog monitoringa AEK-a u Srbiji, koji je realizovan 2018. godine, na osnovu reprezentativnog broja ispitanih uzoraka, može se zaključiti da je epizootiološka situacija bolesti u toj godini bila nepovoljna. Pored toga što je na 56 procenata farmi koza na kojima se gaji više od 50 grla ustanovljeno prisustvo seropozitivnih životinja, veoma je nepovoljna prostorna distribucija bolesti. Ona se, uglavnom, podudara sa područjem intenzivnog gajenja koza na mlečnim farmama. Ova distribucija pokriva skoro ravnomerno čitavu teritoriju Srbije, izuzimajući delove Istočne i Centralne Srbije.

Cilj ovog monitoringa je bio početak planskih aktivnosti na definisanju statusa bolesti priplodnih koza u Srbiji. Nakon dobijanja rezultata u 2018. godini, trebalo je nastaviti sa ispitivanjima u cilju ustanovljavanja stvarne prevalencije u seropozitivnim stadima. Krajnji cilj je bio dodela statusa farmama koza i njihovo razvrstavanje u tri kategorije: 1. farme sa dokazanim prisustvom bolesti; 2. farme sa negativnim statusom i 3. farme sa nepoznatim statusom AEK-a. Ovo bi omogućilo očuvanje statusa nezaraženih zapata, a uz kontrolu i dozvolu prometa samo između farmi istog statusa, stvorili bi se uslovi za uspešnu kontrolu oboljenja.

Rezultati laboratorijskih ispitivanja po Programu mera u periodu 2019-2021. godine

U periodu od 2019 do 2021. godine, u okviru kontrole AEK, nastavljena su samo laboratorijska ispitivanja priplodnih jarčeva u svim kategorijama farmi i gazdinstava, kao i ispitivanja u okviru pasivnog nadzora. Obim ispitivanja je u ovom periodu, po oba osnova bio veoma skroman. Razlozi su višestruki, a verovatno najvažniji među njima su pojava i loša epizootiološka situacija drugih, ekonomski značajnijih bolesti po zemlju: Afričke kuge svinja i avijarne influence. Obim ovih ispitivanja, prikazan po godinama i tipu ispitivanja prikazan je u tabeli 3.

Tabela 3. Laboratorijska ispitivanja AEK-a u Srbiji u periodu 2019-2021. godine***

Godina	Priplodni jarčevi po Pr. mera			Pasivni nadzor		
	Pregledano životinja	Pozitivno		Pregledano životinja	Pozitivno	
		životinja	%		životinja	%
2019.	335	75	22,4	21	1	4,8
2020.	316	64	20,2	10	2	20
2021.	191	37	19,4	22	20	90,9
Ukupno:	842	176	20,9	53	23	43,4

***U iskazanom obimu nisu obuhvaćeni podaci iz VSI "Niš" i NIV "Novi Sad"

Ispitivanja priplodnih jarčeva, po Programu mera, rađeno je na epizootiološkim područjima svih instituta, ali se obim ne može smatrati reprezentativnim za detaljniju epizootiološku analitiku (od 10 do 100 pregledanih grla po institutu

na nivou godine). Ova ispitivanja se rade na teret vlasnika, što može biti jedan od razloga slabog obuhvata. Na osnovu obavljenog obima ispitivanja, procenat seropozitivnih životinja po godinama iznosi oko 20 procenata u odnosu na broj pregledanih životinja.

Obim laboratorijskih ispitivanja u okviru pasivnog nadzora je u ovom periodu bio još slabiji, ali je procenat pozitivnih nalaza bio viši (43,4 procenata). U ovom periodu, laboratorijska ispitivanja u okviru pasivnog nadzora su rađena na području tri instituta: VSI "Požarevac", VSI "Kraljevo" i VSI "Pančevo". Razlozi su kompleksni i istovetni razlozima nedovoljnog učešća pasivnog nadzora u kontroli bilo koje druge bolesti. Među njima su posebno značajni nivo svesti o značaju oboljenja i opšti nivo znanja i posvećenosti, kako uzgajivača, tako i veterinarskih radnika.

Poseban problem u kontroli oboljenja je vezan za mere kontrole i suzbijanja oboljenja u slučajevima pozitivne dijagnoze. Svakom vlasniku, u čijem stadu je ustanovljena infekcija, je data detaljna informacija o bolesti, ali dalji su izbor mera kontrole i suzbijanja prepušteni njegovoj motivaciji i spremnosti da finansira mere suzbijanja. Retki su uzgajivači koji su, shvatajući značaj problema, bili spremni na finansiranje programa kontrole oboljenja u svom zapatu. Jedan od razloga je, svakako, izostanak činjenice da ti postupci čije sprovođenje zahteva određeno finansiranje, rezultiraju nekim prednostima.

UMESTO ZAKLJUČKA

Na osnovu rezultata dijagnostičkih ispitivanja na AEK koja su sprovedena u toku monitoringa u 2018. godini i ispitivanja po Programu mera u periodu od 2019 do 2021. godine, može se zaključiti da je epizootiološka situacija oboljenja u Srbiji nepovoljna, sa uslovima za njeno dalje pogoršanje. Ova bolest dugoročno sigurno dovodi kozarsku proizvodnju u ozbiljne probleme. U tom smislu, kontrola AEK zahteva brojne aktivnosti. Mora se podići nivo svesti i znanja o bolesti, kako kod stočara, tako u i okviru veterinarske službe. Takođe se moraju postaviti adekvatni pravni i stručni okviri kontrole oboljenja. Započetu strategiju upravljanja iz 2018. godine (sa ciljem definisanja statusa stada i mera kontrole u odnosu na njih), posle dobijenih rezultata treba preispitati, razmotriti uslove i načine njene realizacije i aktuelizovati njen nastavak.

LITERATURA

1. Ajauro J.F., Andrioli A., Pinheiro R., Peixoto M.R., Madeira de Sousa A.L. et al., 2021. Detection and isolation of small ruminant lentivirus in the amniotic fluid of goats, *Operative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Vol 78. 2. Ding E.Y., Xiang W.H. 1997. Immune responses in goat to caprine arthritis-encephalitis virus; *Viral Immunol.* 10.2. 111-5. 3. Džadžovski I. 2015. Lentivirusi malih preživara-zastupljenost i ekonomske implikacije, Veterinarska komora Crne Gore, Plav, Veterinarski dani. 4. Hanson J., Hydring E., Olsson K. 1996. A long term study of goats naturally infected with caprine ar-

thritis-encephalitis virus. *Acta Vet Scand.* 37.1. 31-9. **5.** Herrmann L.M., Cheevers W.P., McGuire T.C., Adams D.S., Hutton M.M., Gavin W.G. et al., 2003. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10.2.267-71. **6.** Iowa State University, College of Veterinary Medicine. 2015. Small Ruminant Lentiviruses: Maedi-Visna & Caprine Arthritis and Encephalitis. www.cfsph.iastate.edu **7.** Jimenez A.E.G., Perez T.L.J., Murillo R.C., Reynoso A.B., Alvarez R.H. 2021. Serotyping versus genotyping in infected sheep and goats with small ruminant lentiviruses, *Veterinary Microbiology*, Vol 252, 108931 **8.** Kahn M.C. 2010. The MERCK VETERINARY MANUAL, Merck&CO, INC. **9.** Konishi M., Yoshio N., Naoki T., Masaru F., Ken M., Mitsuhiro T. et al. 2011. Combined eradication strategy for CAE in dairy goat farm in Japan, *Small Ruminant Research*, 99, 1, 65-71. **10.** Krieg A., Peterhans E. 1990. Caprine arthritis-encephalitis in Switzerland: epidemiologic and clinical studies, *Schweiz Arch Tierheilkd.* 132.7. 345-52. **11.** Minguijon E., Reina R., Perez M., Polledo L., Villoria M., Ramirez H. et al., 2015. Small ruminant infections and diseases, *Veterinary Microbiology*, 181, 1-2, 75-89. **12.** Morin T., Guiguen F., Bouyar B.A., Villet S., Greenland T., Grezel D. et al., 2003., Clearance of productive lentivirus infection in calves experimentally inoculated with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol.* 77.11. 6430-7. **13.** Mosa H.A., Hamzah J.K., Aljabory A.H.H. 2022. First study on the molecular prevalence of caprine arthritis encephalitis virus in goats in Babylon, Iraq, *Veterinary World*, EISSN: 2231-0916, www.veterinaryworld.org/Vol.15/April-2022/40.pdf **14.** Motha M.X., Ralston J.C. 1994. Evaluation of Elisa for detection of antibodies to CAEV in milk, *Vet Microbiol.* 38.4. 359-67. **15.** Perk K. 1995. Characteristics of ovine and caprine lentivirus infection. *Leukemia*; 9 Suppl 1:S98-100. **16.** Radostitis M.O., Gay C.C., Blood C.D., Hinchcliff W.K. 2000. *Veterinary Medicine – A Textbook of the Disease of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*; 9th edition; W.B. Saunders Co Ltd, **17.** Rodrigues S.A., Pinheiro R.R., Brito L.R., Oliveira S.L., Oliveira L.E., Santos S.W.V. et al., 2017. Evaluation of caprine arthritic-encephalitis virus transmission in newborn goat kids. *Arq Inst Biol.* 84, 1-5e0542016, .DOI:10.1590/1808-1657000542016. **18.** Roič B., Brnić D., Kostelić A., Romac Z., Jemeršić L., Keros T. et al., 2021. Artritis Encefalitis Virus u koza u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2012. do 2019. godine - serološko i molekularno istraživanje, *Veterinarska stanica* 52.1., .<http://doi.org/10.46419/vs.52.1.11>. **19.** Roy A. 2021. Caprine Arthritis Encephalitis in Goats. *Poultry, Fisheries & Wildlife Sciences*, 9:e116. **20.** Rowe J.D., East N.E. 1997. Risk factors for transmission and method for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection, *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 13.1. 35-53. **21.** Stonos N., Wootton M., Quinton M., Karrow N. 2013. Seroprevalence of small ruminant lentivirus infection in Ontario herds, *Small Ruminant Research*, 114, 2-3, 284-8. **22.** Schultz B.E., Santana B.E., Silva F.F., Garcia O.A., Oliveira R.H., Rodrigues T.M. et al., 2019. Short communications. Genetic parameter estimates for caprine arthritis encephalitis in dairy goats. *J. Dairy Sci.* 103: 6407-6411, <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17740>. **23.** Tesoro-Cruz E., Hernandez-Gonzalez R., Kretschmer-Schmid R., Agu Setien A. 2003. Cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis virus type 1 human immunodeficiency virus. *Arch Med Res.* 34.5. 362-6. **24.** Tu A.P., Siau W.J., Lai Y.F., Yang S.S., Wang H.P. 2017. Diagnostic test for caprine arthritis-encephalitis virus. *CAEV. infection, Rare Diseases Research & Treatment.* 2.5. 13-7.

BESNILO – EPIZOOTIOLOŠKA SITUACIJA U EVROPI I KOD NAS

**Vesna Milićević, Branislav Kureljušić, Dimitrije Glišić,
Nemanja Jezdimirović, Jelena Maletić, Ljubiša Veljović**

Kratak sadržaj

Besnilo je virusno oboljenje centralnog nervnog sistema svih toplokrvnih životinja i jedna od najstarijih i najvažnijih zoonoza. Bez obzira na činjenicu da, prema zvaničnim podacima, u svetu godišnje od besnila umre oko 60 000 ljudi, ova bolest je i dalje zanemarena. Uzročnik je virus koji pripada rodu *Lyssavirus* i familiji *Rhabdoviridae* (Walker et al, 2020). Do sredine XX veka, u Evropi su psi bili rezervoari virusa besnila (urbano besnilo). Međutim, nakon sveobuhvatne vakcinacije pasa, rezervoar virusa na teritoriji Evrope su postale lisice (silvatično besnilo). U 2015. godini, Svetska zdravstvena organizacija (WHO), Svetska organizacija za zdravlje životinja (OIE), Organizacija Ujedinjenih nacija za hranu i poljoprivredu (FAO) i Globalna alijansa za kontrolu besnila (GARC) su sačinili Globalni strateški plan „Zero by 30“ i započeta je akcija suzbijanja besnila sa ciljem da se do 2030 (WHO, 2020). godine broj smrtnih slučajeva kod ljudi izazvanih ujedom pasa svede na nulu. Tokom 2021. godine prijavljena su 294 enzooska slučaja besnila na području Evrope što predstavlja veoma značajan porast u odnosu na 2020. kada je zabeleženo samo 12 slučajeva. Pogoršanje epizootiološke situacije naročito je evidentno u Poljskoj nakon ponovne pojave besnila kod lisica, u kojoj je u 2020. godine registrovano 7 slučajeva, za razliku od 2021. kada ih je prijavljeno 113. Od početka 2022. godine, u Evropi je registrovano 110 slučajeva besnila (Poljska-34, Rumunija-1, Moldavija-3, Turska 72) (ADIS, 2022). Pored besnila kod divljih životinja, stalnu pretnju predstavlja ilegalni uvoz pasa, naročito iz Turske i iz severnoafričkih zemalja. Tokom 2021. godine, zabeleženo je 5 uvezenih slučajeva besnila u Španiju iz Maroka, kao i jedan slučaj u Nemačku iz Turske (Alvarez et al, 2022). Pas koji je u Nemačku uvezen 2. septembra 2021. godine iz Turske je bio star 8 nedelja, a uginuo je nakon 7 dana. Činjenica da je pas uvezen preko Bugarske, te da je prešao dve granice EU, ukazuje na značaj veterinarske kontrole na granicama. Samo u Bremenu je tokom 2021. godine otkriveno 27 nevakcinisanih životinja. Pored klasičnog besnila, veoma važno je spomenuti besnilo slepih miševa (Leopardi et al, 2018). U poslednjih 40 godina, zabeleženo je više od 1 100 slučajeva besnila kod slepih miševa u Evropi, a većina je bila izazvana sa European bat *Lyssavirus-1* (EBLV-1). Većina zemalja EU, sprovodi nadzor besnila kod slepih miševa. Broj uzoraka na godišnjem nivou varira od 1 do 363, u zavisnosti od zemlje.

¹Dr sci. vet. med. Vesna Milićević, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Branislav Kureljušić, viši naučni saradnik; dr vet. Dimitrije Glišić, istraživač pripravnik; dr sci.vet. med. Nemanja Jezdimirović, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Jelena Maletić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Ljubiša Veljović, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Janisa Janulisa 14, 11000 Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: vesna.milicevic@nivs.rs

Tokom 2021. godine, zabeležena su 32 slučaja (Nemačka – 19, Francuska – 5, Poljska – 5, Španija – 3) infekcije slepih miševa EBL virusom (ADIS, 2022). Centar za kontrolu i prevenciju bolesti SAD, nedavno je izdao upozorenje o riziku od besnila slepih miševa nakon što je troje ljudi, uključujući jedno dete, umrlo od te bolesti prošle godine u razmaku od šest nedelja. Eradikacija silvatične forme besnila u Evropi je započeta kasnih 80-ih prošlog veka i još uvek je u toku. Tokom 2021. godine, 14 zemalja Evrope je sprovodilo oralnu vakcinaciju lisica i drugih mesojeda. Procenat serokonverzije kao relativnog indikatora uspešnosti vakcinacije je iznosio 16,6 procenata, što se smatra nedovoljnim vrednostima i manje je od 70 procenata, preporučenih od strane SZO. Takođe, udeo životinja koje su identifikovane kao pozitivne na prisustvo tetraciklina u zubima se kretao od 23 do 88 procenata i u većini zemalja je ova vrednost iznad 70 procenata što je preporučena vrednost SZO (Robardet, 2022).

U Republici Srbiji se besnilo kontroliše obaveznom vakcinacijom pasa i mačaka i peroralnom vakcinacijom lisica koja se sprovodi od 2010. godine. Poslednji slučaj besnila kod nas je zabeležen 2018. godine kod lisice na teritoriji opštine Krupanj, dok je poslednji slučaj kod pasa, dijagnostikovao 2011. godine. Postepeno smanjenje incidencije besnila i odsustvo virusa besnila kod divljih životinja tokom poslednje 4 godine su rezultat oralne vakcinacije lisica i drugih mesojeda. Tokom 2021. godine, u Srbiji je sprovedena kampanja oralne vakcinacije, a relativni parametri uspešnosti iznose 19 procenata za serokonverziju i 55 procenata za nalaz tetraciklina u zubima lisica (Robardet, 2022). Molekularnim ispitivanjem gena za N protein izolata virusa besnila iz Srbije, utvrđeno je da virus pripada istočno-evropskoj liniji virusa.

Ključne reči: besnilo, epizootiološka situacija, Evropa, Srbija

LITERATURA

1. Animal Disease Information System (ADIS): https://food.ec.europa.eu/system/files/2022-07/ad_adns_outbreaks-per-disease_2.pdf 2. Alvarez J., Nielsen S.S., Robardet E., Stegeman A., Van Gucht S., Vuta V., et al. 2017. Risks related to a possible reduction of the waiting period for dogs after rabies antibody titration to 30 days compared with 90 days of the current EU legislative regime. *EFSA J*, 20:6. 3. Leopardi S., Priori P., Zecchin B., et al. 2018. Active and passive surveillance for bat lyssaviruses in Italy revealed serological evidence for their circulation in three bat species. *Epidemiol Infect.* 147:e63. doi:10.1017/S0950268818003072. 4. Robardet E. Review of the analysis related to rabies diagnosis and follow up of oral vaccination performed in NRLs in 2021 - June 2022.. 5. Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adriaenssens E.M., Dempsey D.M., et al. 2020. Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 165:2737-48. 6. WHO Rabies Modelling Consortium. Zero human deaths from dog-mediated rabies by 2030: perspectives from quantitative and mathematical modelling [version 2; peer review: 3 approved, 1 approved with reservations] *Gates Open Research* 2020, 3:1564 <https://doi.org/10.12688/gatesopenres.13074.2>

RABIES – EPIZOOTIOLOGICAL SITUATION IN EUROPE AND IN OUR COUNTRY

**Vesna Milićević, Branislav Kureljušić, Dimitrije Glišić,
Nemanja Jezdimirović, Jelena Maletić, Ljubiša Veljović**

Summary

*Rabies is a viral disease of the central nervous system of all warm-blooded animals and one of the oldest and most important zoonoses. Regardless of the fact that, according to official data, around 60,000 people die of rabies annually in the world, this disease is still neglected. The causative agent is a virus belonging to the genus *Lyssavirus* and the family *Rhabdoviridae* (Walker et al, 2020). Until the middle of the 20th century, in Europe, dogs were reservoirs of the rabies virus (urban rabies). However, after the comprehensive vaccination of dogs, the reservoir of the virus on the territory of Europe became foxes (sylvatic rabies). In 2015, the World Health Organization (WHO), the World Organization for Animal Health (OIE), the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the Global Alliance for Rabies Control (GARC) created the Global Strategic Plan "Zero by 30" and an action to suppress rabies was started with the aim of reducing the number of human deaths caused by dog bites to zero by 2030 (WHO, 2020). During 2021, 294 enzootic cases of rabies were reported in Europe, which represents a very significant increase compared to 2020, when 12 cases were recorded. The worsening of the epizootic situation is particularly evident in Poland after the re-emergence of rabies in foxes, in which 7 cases were registered in 2020, in contrast to 2021 when 113 were reported. Since the beginning of 2022, 110 cases of rabies have been registered in Europe (Poland -34, Romania-1, Moldova-3, Turkey 72) (ADIS, 2022). In addition to rabies in wild animals, a constant threat is the illegal import of dogs, especially from Turkey and North African countries. During 2021, 5 imported cases of rabies were recorded in Spain from Morocco, as well as one case in Germany from Turkey (Alvarez et al, 2022). The dog that was imported to Germany on September 2, 2021 from Turkey was 8 weeks old and died after 7 days. The fact that the dog was imported via Bulgaria, and that it crossed two EU borders, indicates the importance of veterinary control at the borders. In Bremen alone, 27 unvaccinated animals were discovered in 2021. In addition to classic rabies, it is very important to mention bat rabies (Leopardi et al, 2018). Over the past 40 years, more than 1,100 cases of rabies in bats have been reported in Europe, most of which were caused by European bat *Lissavirus-1* (EBLV-1). Most EU countries implement rabies surveillance in bats. The number of samples per year varies from 1 to 363 samples depending on the country. During 2021, 32 cases (Germany – 19, France – 5, Poland – 5, Spain – 3) of bat infection with the EBL virus were recorded (ADIS, 2022). The US Centers for Disease Control and Prevention recently issued a warning about the risk of rabies in bats after three people, including a child, died from the disease in a six-week period last year. Eradication of the sylvatic form of rabies in Europe was started in the late 1980s and is still ongoing. During 2021, 14 European countries implemented oral vaccination of foxes and other carnivores. The percentage of seroconversion as a relative indicator of vaccination success was 16-60%, which are considered insufficient values because they are lower than the*

recommended 70% by WHO. Also, the share of animals that were identified as positive for the presence of tetracycline in their teeth ranged from 23% to 88%, with the fact that in most countries this value is above 70%, which is the WHO recommended value (Robardet, 2022).

In the Republic of Serbia, rabies is controlled by compulsory vaccination of dogs and cats and oral fox vaccination, which has been implemented since 2010. The last case of rabies in our country was recorded in 2018 in a fox in the territory of the municipality of Krupanj, while the last case in dogs was diagnosed in 2011. The gradual decrease in the incidence of rabies and the absence of rabies virus in wild animals during the last 4 years is the result of oral vaccination of foxes and other carnivores. During 2021, an oral vaccination campaign was conducted in Serbia, and the relative success parameters are 19% for seroconversion and 55% for the detection of tetracycline in fox teeth (Robardet, 2022). Through molecular testing of the gene for the N protein of the rabies virus isolate from Serbia, it was determined that the virus belongs to the Eastern European lineage of the virus.

Key words: epizootiological situation, Europe, rabies, Serbia

BRUCELOZA I KONCEPT „JEDNO ZDRAVLJE“

**Nataša Stević¹, Elena Kosović¹, Tamara Radovanović¹,
Zorana Zurovac Sapundžić², Dragan Bacić¹, Sonja Radojičić¹**

Kratak sadržaj

Bruceloza je oboljenje velikog broja domaćih i divljih vrsta životinja i čoveka koje se pojavljuje u mnogim delovima sveta i izaziva velike ekonomske gubitke. Iako Svetska zdravstvena organizacija i Svetska organizacija za zdravlje životinja preporučuju mere kontrole ili iskorenjivanja bruceloze, samo su neke razvijene zemlje postigle status slobodnih od bruceloze. Uprkos postojanju i značajnom napretku strategija za suzbijanje bolesti, Svetska zdravstvena organizacija, svrstava brucelozu u jednu od vodećih zanemarenih zoonoza. Izazovi iskorenjivanja bolesti su teško rešivi i višestruki i pored sprovođenja nacionalnih programa kontrole, kao što je Program mera u Republici Srbiji. Stalna izloženost inficiranim životinjama, njihovim sekretima i ekskretima, kao i proizvodima svrstavaju brucelozu u profesionalna oboljenja. Izloženost patogenu i nedostatak informacija su odlučujući faktori za pojavu bruceloze. Istraživanja dokazuju da se bruceloza najčešće pojavljuje kod stočara, radnika u klanicama, veterinaru i veterinarskih tehničara, laboratorijskih radnika i lovaca. Rizični postupci koji doprinose širenju i ponovnom izbijanju bolesti i dovode do prenošenja bruceloze sa životinja na čoveka uključuju konzumiranje sirovog mleka i mlečnih proizvoda iz nekontrolisanih izvora, neprijavlivanje pobačaja, nesvesno odlaganje pobačenih plodova i otpadnih životinjskih produkata, kao i nekorisćenje zaštitne opreme i nepoštovanje biosigurnosnih mera. Da bi suzbijanje bruceloze bilo efikasno neophodno je preduzeti mere u cilju poboljšanja znanja, stavova i prakse ugroženih kategorija ljudi. Sve navedeno ukazuje na neophodnost uključivanja edukacije u nacionalni program kontrole bruceloze, kao i obaveznu implementaciju koncepta "Jedno zdravlje".

Ključne reči: bruceloza, jedno zdravlje, profesionalno oboljenje, zoonoze,

UVOD

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji, bruceloza je jedna od najčešćih antropozoonoza u svetu, sa približno 500 000 novih slučajeva obolelih ljudi go-

¹Dr sci. vet. med. Nataša Stević, docent; dr vet. Elena Kosović, istraživač pripravnik; dr vet. Tamara Radovanović, stažista; dr sci. vet. med. Dragan Bacić, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Sonja Radojičić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Bulevar Oslobođenja 18, 11000 Beograd, R. Srbija

²Dr vet. Zorana Zurovac Sapundžić, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Janisa Janulisa 14, 11000 Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: natasas@vet.bg.ac.rs

dišnje (Pappas i sar., 2006). Bruceloza je zoonoza koju izazivaju bakterije roda *Brucella* koji obuhvata 12 vrsta i još četiri neimenovana izolata brucela. Ova bolest značajno utiče na smanjenje produktivnosti životinja i zdravlje ljudi širom sveta. Ekonomske posledice, koje ovo oboljenje ostavlja, pogotovo na nerazvijene zemlje, dovele su do toga da ga Svetska zdravstvena organizacija svrsta u jednu od vodećih svetskih „zanemarenih zoonoza“. Najčešći način infekcije ljudi je konzumiranjem mlečnih proizvoda od sirovog mleka, kontakt sa obolelim životinjama ili kontaminiranim biološkim materijalom i nestručna primena atenuiranih vakcina protiv bruceloze životinja. Profesije koje su najviše izložene patogenu su odgajivači životinja i stočari, mesari, laboratorijski radnici, veterinari i veterinarski tehničari i lovci. Iako Svetska zdravstvena organizacija i Svetska Organizacija za zdravlje životinja preporučuju strategije ili mere za kontrolu i iskorenjivanje bruceloze, samo su neke razvijene zemlje slobodne od bruceloze. U zemljama u razvoju ne postoji koncept „Jedno zdravlje“ za nadzor i kontrolu bruceloze kod ljudi i životinja, a treba uložiti posebne napore da se pokrene više programa kontrole bruceloze za zemlje sa niskim resursima (Godfroid i sar., 2013). Prednosti međusektorske saradnje koju čini „Jedno zdravlje“ su fundamentalne za kontrolu zanemarenih zoonoza (WHO, 2005). Strategije i mere je teško efikasno primeniti u zemljama sa ograničenim resursima zbog toga što je iskorenjivanje bruceloze skup, dugotrajan i zahtevan projekat. Bruceloza je prisutna u mnogim delovima sveta, uključujući Bliski istok, Afriku, Latinsku Ameriku, Centralnu Aziju i delove Mediterana (Zheng i sar., 2018). Samo nekoliko regija u svetu je slobodno od bruceloze domaćih životinja i to su: Severna, Centralna i Istočna Evropa, Australija, Kanada, Japan i Novi Zeland. Bruceloza je još uvek prisutna u Severnoj Irskoj, na Mediteranu (Španija, Grčka, Južna Italija, Portugalija) i na Balkanu.

Bruceloza ljudi

Ljudi su slučajni domaćini za brucele i infekcija uglavnom nastaje direktnim kontaktom sa zaraženim životinjama, respiratornim putem ili konzumiranjem mlečnih proizvoda (Godfroid i sar., 2013). Glavni izvor infekcije za ljude su sirovo mleko i mlečni proizvodi od sirovog mleka (nezreli ili srednje zreo sir, puter, sladoled). Iako je pasterizacija mleka efikasno sredstvo za uništavanje brucela i sprečavanje infekcije ljudi, ova mera se ne primenjuje rutinski u nekim zajednicama sa ograničenim resursima zbog kulturoloških običaja i opšteg nerazumevanja javnosti o opasnostima konzumiranja sirovog mleka (Welburn i sar., 2015). Posebno su značajni sirevi napravljeni od mleka zaraženih koza. U sirovom mleku, brucele preživljavaju 24 h na 25-37 °C i 48 h na 8 °C. Minimalno vreme fermentacije potrebno za potpuno uništavanje brucela nije poznato, ali je procenjeno da su dva meseca dovoljna. Konzumiranje nedovoljno termički obrađenih iznutrica ili voća i povrća uzgajanog na zemljištu tretiranom kontaminiranim stajnjakom takođe može izazvati infekciju brucelama. Inkubacija traje od 10 do 21 dan (ali u nekim slučajevima i 12 meseci) zatim sledi kratka bakterijemija i lokalizacija brucela u mononuklearno-fagocitnom sistemu. Intracelularna loka-

lizacija brucela im pruža zaštitu od imunskog sistema domaćina, ali i od antibiotika što komplikuje terapiju. Bruceloza ljudi se pojavljuje u akutnom i hroničnom toku. Početni stadijum bolesti, u 90 odsto slučajeva protiče asimptomatski, ali ova inicijalna faza nije pokazatelj kasnijeg toka bolesti. Ako se ne leči, može doći do nastanka talasaste groznice usled ponavljajućih bakterijemijskih epizoda koje prati stvaranje novih žarišta infekcije (kičma, zglobovi i nervi). Bruceloza ljudi se manifestuje artralgijom, pireksijom i umorom, a javljaju se i hiperhidroza, inapetencija, hepatomegalija i splenomegalija. Dolazi do ubrzanе sedimentacije eritrocita, povišene su vrednosti C-reaktivnog proteina i aktivnost transaminaza, a dolazi i do anemije. Letalitet je nizak i iznosi < 1%. Letalnom ishodu uglavnom prethodi razvoj endokarditisa. Incidencija endokarditisa je oko 2% kliničkih slučajeva, ali je odgovorna za 80 procenata smrtnih slučajeva od bruceloze (Dean i sar., 2012). Značajna, ali retka komplikacija bruceloze je neurobruceloza. Intracelularna invazija centralnog nervnog sistema javlja se u oko 5 odsto slučajeva kliničke bruceloze kod ljudi, a posledice mogu biti meningitis, meningoencefalitis, moždani ili epiduralni apscesi i poremećaj mijelinizacije (Corbel, 2006). Promene u genitourinarnom traktu se sreću i kod ljudi i kod životinja. Kod muškaraca su najčešći orhitis i epididimitis i oni čine 6–8 procenata prijavljenih komplikacija, a kod žena se retko pojavljuju karlični apscesi i salpingitis (Corbel, 2006). Pogrešna dijagnoza je uobičajena kod pacijenata obolelih od bruceloze zbog toga što simptomi mogu biti nejasni i nespecifični i ličiti na neke druge bolesti. Pogrešna dijagnoza često dovodi do odlaganja lečenja i može dovesti do dugoročnih komplikacija (Dean i sar., 2012), kao i do neslaganja između prijavljenog i stvarnog broja obolelih ljudi. Lečenje koje ima za cilj kontrolu akutnog oblika i sprečavanje hroničnog, je obično dugotrajno i praćeno neželjenim efektima (McDermott i sar., 2013). Preporučuje se primena dva sinergistička antibiotika, doksiciklina i rifampicina ili doksiciklina i aminoglikozida, a terapija treba da traje najmanje šest nedelja.

Direktni troškovi usled bolesti obuhvataju troškove zdravstvene zaštite, izdatke za dijagnostiku, lečenje i zbrinjavanje pacijenata i troškove koji ne spadaju u zdravstvene tj. one koji se odnose na pacijentov pristup nezi i prevenciji bolesti. Ovde se misli na prevoz do i od medicinskih ustanova, smeštaj dok traje lečenje i gubitak radne sposobnosti koji mogu predstavljati značajne troškove za pacijente ili njihove porodice. Indirektni troškovi uključuju one koji su povezani sa morbiditetom i mortalitetom i koji specifično utiču na pacijenta i društvo u kome pacijent živi.

Brucella melitensis, *Brucella abortus* i *Brucella suis* su najvažniji članovi roda, odgovorni za pojavu bolesti kod ljudi i za značajne ekonomske gubitke u stočarskoj proizvodnji. Uloga *B. canis* kao uzročnika bolesti ljudi je vrlo verovatno potcenjena zbog toga što u većini slučajeva, ovaj patogen izaziva supkliničku infekciju, što otežava postavljanje dijagnoze. Pored toga, većina seroloških testova koji se koriste u dijagnostici bruceloze ljudi sadrži S vrstu *Brucella* antigena, koji su neefikasni za otkrivanje *B. canis*. S obzirom na nizak zoonozni potencijal *B. canis*, u literaturi je opisan manji broj slučajeva infekcija ljudi. *Brucella canis* izaziva

profesionalno oboljenje koje pogađa uglavnom veterinare ili odgajivače koji su u bliskom kontaktu sa psima i njihovim izlučevinama, posebno fetalnim tkivima ili tečnostima, placentom ili vaginalnim iscedkom, kao i laboratorijsko osoblje koje može biti izloženo velikim količinama bakterija. Naglašava se važnost bruceloze pasa kao potencijalne “urbane” zoonoze u ekspanziji koja bi predstavljala ozbiljan problem javnog zdravlja. Istraživanje sprovedeno u Kini upravo govori u prilog ovim podacima. U ranije objavljenim studijama najčešći uzročnik bruceloze ljudi je bila *B. melitensis*, a *B. canis* vrlo retko (Ferreira i sar., 2020). Kako psi kao kućni ljubimci imaju sve veću ulogu u životu ljudi, u poslednje dve decenije se situacija menja i danas su psi jedan od vodećih rezervoara brucela za ljude (Zhou et al, 2020).

Prema Izveštaju o zaraznim bolestima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut” poslednjih godina se u Republici Srbiji bruceloza ljudi registruje sporadično. Posmatrajući desetogodišnji period, uočava se blagi trend pada oboljevanja od bruceloze, sa cikličnim oscilacijama kada se registruju epidemije. Najviše stope incidencije su zabeležene 2014. i 2016. godine. U 2014. godini, na teritoriji centralne Srbije registrovano je 20 slučajeva bruceloze, a 2016. godine 24 slučaja od kojih većina u Pčinjskom, a zatim u Nišavskom i Zlatiborskom okrugu. Tokom 2020. godine prijavljena su dva slučaja (Nišavski i Južno-bački okrug).

Bruceloza kao profesionalno oboljenje

Pereira i saradnici (2020). su sprovedli istraživanje čiji je fokus bila bruceloza kao profesionalno oboljenje i identifikacija glavnih rizika od infekcije za svaku grupu izloženu patogenu. Smatrali su da je pet različitih profesija veoma izloženo ovoj bolesti: radnici na selu, radnici u klanicama, veterinari i veterinarski tehničari, laboratorijski radnici i lovci. Analizirani glavni faktori rizika i izvori infekcije, kojima su ljudi ovih profesija izloženi, bili su: direktan kontakt sa životinjskim izlučevinama, nepoštovanje pravilne upotrebe lične zaštitne opreme, izloženost živim atenuiranim vakcinama i nepoštovanje principa biosigurnosti. Često izolovane vrste brucela kao uzročnika profesionalnog oboljenja su bile *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis* i *Brucella canis*. Dokazano je da uzgajivači životinja, laboratorijski radnici i radnici u klanicama imaju 3,47 puta veće šanse da se zaraze brucelama nego druge osobe koje nemaju kontakt sa mogućim izvorima infekcije. Seoski radnici, radnici u klanicama, veterinari, laboratorijski radnici i lovci su grupe koje su profesionalno bile izložene izvorima infekcije. Uočeno je da nedostatak znanja o brucelozi i neodgovorno ponašanje, kao što je nemarnost u primeni individualnih i kolektivnih zaštitnih mera, povećavaju verovatnoću inficiranja. Istraživanje je ukazalo da su radnici na selu - stočari među najugroženijima od bruceloze, uglavnom izazvane vrstom *B. melitensis*. *Brucella melitensis* je jedna od najzastupljenijih vrsta brucela i ujedno najpatogenija za ljude. Direktan kontakt stočara (pomoć pri porođaju, čišćenje štale) sa potencijalno zaraženim životinjama, primarnim domaćinima *B. meliten-*

sis, identifikovan je kao glavni uzrok oboljevanja. Brucelozi izazvanoj sa *B. suis*, *B. melitensis* i *B. abortus*, izloženi su mesari i radnici u klanicama zbog redovnog rukovanja oštrim predmetima i bliskog kontakta sa potencijalno zaraženim životinjama i njihovim organima. Za klanične radnike je glavna opasnost kontakt sa životinjskim tkivima. Ono što ove radnike dovodi u opasnost je neadekvatna upotreba zaštitne opreme kao što su rukavice, maska, naočare, čizme i kecelja. Osim toga, nedovoljno znanje o brucelozi, posebno o njenom prenošenju i kliničkim znacima, povećava rizik od inficiranja i ukazuje na značaj sprovođenja edukativnih mera. Aktivnosti veterinaru koje su povezane sa visokim rizikom od infekcije su manipulacija atenuiranim vakcinama protiv bruceloze, intervencije prilikom porođaja životinja, terapija neplodnosti, intervencije prilikom pobačaja, stanja kao što su zaostala placenta i mrtvorodeni fetusi, kontakt sa sekretima i ekskretima. Važno je istaći i neadekvatnu zaštitnu opremu. Atenuirane vakcine (REV-1, S19 i RB51) su takođe izvor infekcije za ljude. Izlaganje atenuiranim vakcinama protiv bruceloze posebno je važno kada je u pitanju RB51 zbog toga što se antitela protiv ovog soja ne otkrivaju rutinskim serološkim testovima kao i zbog otpornosti RB51 na rifampicin, jedan od lekova izbora za lečenje bruceloze ljudi (Dorneles i sar., 2015). Iz tog razloga je važna upotreba zaštitne opreme i prilikom vakcinacije. Bruceloza je jedna od najčešćih laboratorijskih infekcija. Glavni faktori koji dovode do infekcije laboratorijskih radnika su rad van lamiarne komore, boravak u laboratoriji tokom ili posle akcidenta, izostanak postavljanja sumnje na brucelozu kao mogućeg uzročnika, neoprezno otvaranje Petrijevih šolja i rad sa izolatima pre njihove identifikacije. Zanimljivo je da je kod bruceloze laboratorijskih radnika, najveći broj izolovanih vrsta: *B. melitensis*, *B. abortus* i *B. canis*, što bi se moglo objasniti širokim spektrom kliničkih uzoraka kojima se često rukuje u svakodnevnom radu. Iako su dobro informisani o riziku od prenosa zoonoza, mnogi laboratorijski radnici su usvojili stavove i ponašanja kojima ugrožavaju svoje i zdravlje svojih kolega. Izolacija brucela se sme izvoditi samo u određenim biosigurnosnim kabinetima. Nezgode, kao što su oštećenja u biosigurnosnom kabinetu ili centrifugama, mogu se desiti i u laboratoriji visokih nivoa biosigurnosti, što ukazuje da se mora sprovesti obuka osoblja kao i redovno održavanje laboratorijske opreme. Rigorozno pridržavanje pravila i mera kontrole je važno od prijema do pravilnog odlaganja biološkog materijala i dešavale su se infekcije zaposlenih na svim pozicijama u laboratoriji (Compes i sar., 2017). Lovci su takođe u riziku da obole od bruceloze.

Bruceloza životinja

Infekcija brucelozom kod životinja može nastati na više načina, a najčešći je preko gastrointestinalnog trakta, ali i preko konjunktiva ili inhalacijom. Nakon ulaska u organizam, nastaje bakterijemija i odlazak brucela u limfna i tropna tkiva. Tropna tkiva su gravidni uterus, testisi, mlečna žlezda i supramamarni limfni čvorovi. Prisustvo ugljenog hidrata eritritola igra značajnu ulogu u kliničkoj slici bruceloze životinja. Dolazi do infekcije horionskih resica, koja se širi u kotiledone

na fetalnoj strani placente gde se brucele umnožavaju (10^{13} bakterija/g tkiva) i indukuju infiltraciju inflamatornim ćelijama uz nekrozu trofoblasta kada dolazi do vaskulitisa. Zbog svega navedenog, onemogućena je metabolička razmena između fetusa i majke, što dovodi do pobačaja. Pobačeni plod i plodove ovojnice su glavni izvor brucela u spoljašnjoj sredini. Mlečna žlezda je takođe ciljni organ za brucele, a izlučivanje brucela kolostrumom ili mlekom je još jedan važan izvor infekcije. Od ostalih simptoma, kod životinja se mogu pojaviti talasasta groznica, mastitis i karpalni higrom. Kod mužjaka dolazi do epididimitisa i orbitisa. Kod oba pola može doći do neplodnosti.

Bruceloza dovodi do direktnih i indirektnih ekonomskih gubitaka. Direktni gubici obuhvataju one koji su vidljivi ili očigledni i one koji su nevidljivi ili koji uključuju izgubljeni proizvodni potencijal (Rushton i sar., 1999). Vidljivi gubici uključuju: pobačaje, smanjenu proizvodnju mleka, izgubljenu radnu snagu životinja, smanjen prirast usled hroničnih infekcija, uginuća ili prinudno iskorišćavanje, odnosno eutanaziju, veterinarske troškove i narušenu dobrobit životinja. U enzootskim područjima, *Brucella* spp. može prouzrokovati značajno smanjenje produktivnosti stada što ugrožava sigurnost hrane i egzistenciju farmera koji zavise od prodaje ili trgovine mesom, mlečnim proizvodima i životinjama. Dodatni vidljivi gubici uključuju negativne efekte bolesti, posebno kod radnih životinja koje se koriste za vuču. Karpalni higromi su uobičajeni klinički simptomi hronične bruceloze goveda i mogu dovesti do bolova u zglobovima, upale i smanjenja pokretljivosti. Direktni, ali nevidljivi gubici uključuju smanjenu plodnost stada i troškove povezane sa promenom strukture stada kako bi se nadoknadilo smanjenje produktivnosti i plodnosti. Kod goveda, neplodnost usled bruceloze je uzrokovana metritisom posle pobačaja i zaostalom posteljicom. Dodatni nevidljivi gubici su povezani sa prenošenjem uzročnika sa obolelih domaćih životinja na divlje životinje koje potom mogu preneti bolest na okolna stada. Osim gubitaka koji su posledica bolesti, a koji su jedan izvor ekonomskih troškova, bruceloza takođe uzrokuje indirektno finansijske izdatke koji se odnose na menadžment bolesti i izgubljene prihode kada je bolest prisutna u regionu. Troškovi za veterinarske usluge, vakcinaciju, dijagnostiku, nadoknadu štete stočarima i sistem za identifikaciju životinja i održavanje evidencije o nadzoru nastaju kada se plan upravljanja bolesti sprovodi na regionalnom ili nacionalnom nivou. Izgubljeni prihod u vezi sa brucelozom uključuje ograničenja trgovine sa područja na kojima su enzootski prisutne *B. melitensis*, *B. abortus* i *B. suis*. Bolesti koje izazivaju ove vrste brucela su navedene od strane OIE kao bolesti koje treba prijaviti – napravljena je lista u skladu sa Sanitarnim i fitosanitarnim sporazumom Svetske trgovinske organizacije koja pomaže u usmeravanju razvoja politike u vezi sa međunarodnom trgovinom proizvoda kontaminiranim specifičnim biološkim agensima.

Divlje životinje i bruceloza

Kontrola bruceloze ljudi zavisi od kontrole bolesti kod domaćih životinja. Međutim, usled ljudskih aktivnosti i potencijalnog kontakta domaćih i divljih

životinja, važnog faktora u prenošenju bolesti, trebalo bi uzeti u obzir i divlje životinje kao rezervoare brucela. Divlje životinje koje izlučuju brucele su rizik za domaće životinje i ljude. U većini evropskih zemalja, bruceloza je iskorenjena kod domaćih preživara. Infekcija sa *B. melitensis* je otkrivena u populaciji alpskog kozoroga (*Capra ibex*) (Lambert i sar., 2018). Analizom uzoraka poreklom od slepih miševa otkriveno je prisustvo *B. melitensis* što ukazuje na to da slepi miševi mogu biti izvor infekcije za druge životinje (Bai i sar., 2017). Opšte je poznato da se neke vrste brucela održavaju i u divljim životinjama kao npr. *B. abortus* kod bivola (*Sincerus caffer*) (Shirima i sar., 2016) i bizona (*Bison bison*) (Tessaro i sar., 1990), *B. suis* biotip 2 kod divlje svinje (*Sus scrofa*) i evropskog zeca (*Lepus europeus*) (Kreizinger i sar., 2014), *B. suis* biotip 4 kod irvasa (*Rangifer tarandus*) (Forbes i Tessaro, 1993), *Brucella ceti* kod kitova (*Cetacea*) (Foster i sar., 1996), *Brucella microti* kod voluharica (*Microtus arvalis*) (Scholz i sar., 2008) i crvene lisice (*Vulpes vulpes*) (Scholz i sar., 2009). Takođe je u literaturi opisano i prisustvo genetički srodnih vrsta brucela kod različitih vrsta domaćina: vrsta slična *Brucella microti* kod močvarnih žaba (*Pelophilak ridibundus*) (Jay i sar., 2020), *Brucella vulpis* kod crvene lisice (*V. vulpes*) (Scholz i sar., 2016), *Brucella inopinata* kod nekih vrsta žaba (*Ranoidea caerulea* i *Zhangikalus dennisi*) (Kimura i sar., 2017) i ljudi, *Brucella papionis* kod pavijana (*Papio spp.*) (Whatmore i sar., 2014). Prisustvo *B. microti* je dokazano u mandibularnim limfnim čvorovima naizgled zdravih lisica za koje se pretpostavlja da su se inficirale preko glodara koji su njihov plen (Scholz i sar., 2009). *B. pinnipedialis* je izolovana posle 28 dana od eksperimentalne infekcije atlantskog bakalara (*Gadus morhua*), što ukazuje da su i ribe potencijalni rezervoari brucela (Nymo i sar., 2016). Najintragantnije je da je *B. melitensis* (biotip 3), izolovana i iz eksperimentalno i iz prirodno zaraženog nilskog soma (*Clarias gariepinus*), u regionu delte Nila u Egiptu (El-Tras i sar., 2010). Ovi nalazi izazivaju zabrinutost u vezi sa ulogom riba u prenošenju brucele u vodenim sredinama za ljude koji jedu ili rukuju sirovom morskom hranom.

Monitoring prisustva bruceloze divljih životinja predstavlja izazov s obzirom na raznolikost laboratorijskih testova, životinjskih vrsta, okruženja, unakrsne reaktivnosti i odsustva validiranih testova za divlje životinje. Iz ovog razloga, teško je serološkim testovima proceniti stvarnu prevalenciju bruceloze divljih životinja, što zahteva poseban oprez prilikom tumačenja rezultata.

Mere kontrole i eradikacije

Merama kontrole i eradikacije bruceloze smanjuju se ekonomski gubici nastali usled pobačaja životinja, smanjene proizvodnje mleka i ograničenja izvoza.

Zhang i saradnici su u svom radu (2018) analizirali rezultate 23 zemlje koje su sprovdile programe kontrole i eradikacije bruceloze. Samo tri zemlje su postigle kompletnu eradikaciju. Trajanje svakog programa je veoma variralo i generalno je trajalo nekoliko decenija. Australija je iskorenila brucelozu nakon 29 godina sprovođenja programa, a Novi Zeland nakon 23 godine. Sjedinjene Države su započele svoj nacionalni program kontrole bruceloze 1934. godine, a 31. de-

cembra 2000. godine u Sjedinjenim Državama više nije bilo bruceloznih goveda. Programi su podrazumevali samo vakcinaciju, testiranje i uklanjanje ili kombinaciju vakcinacije i testiranja i uklanjanja pozitivnih jedinki. Grčka se opredelila za strategiju sprovođenja samo vakcinacije i pokrenut je program za male preživare 1975. godine, zasnovan na vakcinaciji životinja između 3 i 6 meseci starosti sa Rev-1 vakcinom. Ova strategija je primenjivana do perioda između 1992. i 1994. godine, a prevalencija bruceloze životinja je značajno smanjena. Kampanja iskorenjivanja, zasnovana na politici i uklanjanja pokrenuta je 1993. i 1995. godine na ostrvima, a program vakcinacije je napušten. Međutim, prevalencija bruceloze malih preživara i incidencija bruceloze kod ljudi brzo su porasli. Tako je hitan program masovne vakcinacije ponovo pokrenut u Grčkoj 1998. godine. U Koreji je vakcinacija goveda sojem RB51 započeta 1998. godine, međutim, ovaj program je odmah prekinut zbog neočekivanih neželjenih efekata kao što su pobačaji, prevremeno rađanje i smanjeni prinosi mleka. Zatim je 2004. sproveden program iskorenjivanja zasnovan uglavnom na strategiji testiranja i uklanjanja. Malta, Irska, Makedonija su usvojile program iskorenjivanja bruceloze zasnovan na politici samo testiranja i uklanjanja bez vakcinacije.

Jedno od najefikasnijih sredstava za smanjenje posledica bilo koje bolesti je smanjenje njene prevalencije u regionima gde se ona pojavljuje enzootski. Vakcinacija, edukacija, kao i sprovođenje programa praćenja bolesti su kamen temeljac ovih napora. Trenutno nema dostupnih vakcina protiv bruceloze za upotrebu kod ljudi koje se smatraju bezbednim i efikasnim. Vakcine dostupne za upotrebu kod životinja ne omogućavaju razlikovanje serološkim dijagnostičkim testovima prirodno inficiranih od vakcinisanih životinja, što je imperativ za procenu uspeha bilo kog programa vakcinacije i za procenu stvarne prevalencije bolesti nakon upotrebe vakcina na nekom području. Prema tome, finansiranje istraživanja koja su fokusirana na razvoj poboljšanih vakcina i dijagnostičkih metoda predstavlja prvi suštinski korak strategije za rešavanje problema bruceloze. Za smanjenje prevalencije ili iskorenjivanje bruceloze od velikog značaja je interdisciplinarni pristup "Jedno zdravlje" kojim bi se smanjenjem prevalencije bruceloze životinja sprečila pojava ove zoonoze u humanoj populaciji. Koncept "Jedno zdravlje" obuhvata metodologiju u kojoj su zdravlje ljudi, zdravlje životinja i životna sredina usko isprepleteni, a poboljšanje u jednoj od ovih oblasti zavisi od sve tri. Stoga je saradnja između profesionalaca u više disciplina i sektora, imperativ za postizanje rešenja koja dovode do ublažavanja zaraznih bolesti kao što je bruceloza, što na kraju ima značajnu ekonomsku vrednost.

ZAKLJUČAK

Najbolji način za kontrolu bruceloze je kroz koncept „Jedno zdravlje“ koji uključuje zdravlje ljudi, zdravlje životinja i zdravu životnu sredinu. Edukacija i prenošenje informacija o prevenciji bolesti, u regione u kojima se bruceloza pojavljuje enzootski su od suštinskog značaja za kontrolu bolesti. Prevencija bruceloze ljudi uglavnom zavisi od programa za kontrolu i iskorenjivanje bruceloze životinja. Cilj ovakvih programa je smanjenje prevalencije infekcije kroz imple-

mentaciju kontrole zdravstvenog statusa i primene mera (npr. vakcinacija životinja), i kada je to moguće postići iskorenjivanje bolesti, u početku farmu po farmu, a zatim na nacionalnom i regionalnom nivou. U zaraženim područjima se moraju preduzeti mere predostrožnosti usmerene prema svima onima koji su u kontaktu sa obolelim životinjama ili njihovim proizvodima, kontaminiranim materijalom, kao i onima koji su izloženi aerosolu. Ove mere predostrožnosti uključuju obavezno korišćenje zaštitne opreme i sprovođenje adekvatnih zoohigijenskih mera. Rešavanje pitanja bruceloze zahteva saradnju, kao i poziv na akciju, koji će razviti pristup „Jedno zdravlje“ kroz saradnju humane i veterinarske medicine i javnog zdravlja. Ovakav zajednički pristup, pored poboljšanja zdravlja dovodi i do smanjenja troškova. Neophodno je uključiti lidere zajednice u razvoj metodologije i resursa koji su efikasni u izgradnji kampanja za informisanje i obrazovanje na lokalnom nivou. Posebno je važno primeniti inicijative koje uče ljude kako da zaštite sebe, svoje porodice i svoje zajednice od bolesti kroz održiva poboljšanja i obrazovanje. U skladu sa finansijskim i kulturološkim mogućnostima, neke od oblasti na koje se treba fokusirati su sanitarne mere i higijena, bezbednost hrane, biobezbednost i postupanje sa životinjama.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Bai Y, Urushadze L., Osikowicz L., McKee C., Kuzmin I., Kandaurov, A. et al. 2017. Molecular Survey of Bacterial Zoonotic Agents in Bats from the Country of Georgia (Caucasus). PLoS ONE 2017, 12, e0171175.
2. Compes Dea C., Bescos J.G., Agreda J.P.A.P., Alvaro P.M.M., Blasco Martinez J.M., Villuendas Uson M.C. 2017. Epidemiological investigation of the first human brucellosis case in Spain due to *Brucella suis* biovar 1 strain 1330. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2017; 35(3):179–81. Epub 2016/07/31. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.06.005> PMID: 27474211.
3. Corbel M.J., Elberg S.S., Cosivi O. 2006. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization.
4. Dean AS, Crum L, Greter H, Hattendorf J, Schelling E, Zinsstag J. 2012. Clinical manifestations of human brucellosis: a systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(12):e1929.
5. Dorneles EMS, Sriranganathan N, Lage AP. 2015. Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. Veterinary Research. 46 (1):76. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0199-7> PMID: 26155935
6. El-Tras W.F., Tayel A.A., Eltholth M.M., Guitian, J. 2010. Brucella infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. Vet. Microbiol. 141, 321–325.
7. Ferreira Vicente A., Girault G., Corde Y., Souza Ribeiro Mioni M., Borges Keid L. et al. 2020. The study of worldwide *Brucella canis* of phylogenetic groups by comparative genomics-based approaches. China Biotechnol. 40, 38–47. doi: 10.13523/j.cb.1907053.
8. Forbes L.B., Tessaro S.V. 1993. Transmission of brucellosis from reindeer to cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 203, 289–94.
9. Foster G., Jahans K.L., Reid R.J., Ross H.M. 1996. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. Vet. Rec. 138, 583–6.
10. Godfroid J., Al Dahouk S., Pappas G., Roth F., Matope G., Muma J. et al. 2013. A “One Health” surveillance and control

of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 241–8. **11.** Jaý M., Freddi, L., Mick V., Durand B., Girault G., Perrot L. et al. 2020. *Brucella microti*-like prevalence in French farms producing frogs. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 617–25. **12.** Kimura M., Une Y., Suzuki M., Park E.S., Imaoka K., Morikawa S. 2017, Isolation of *Brucella inopinata* - Like Bacteria from White's and Denny's Tree Frogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017, 17, 297–302. **13.** Kreizinger Z., Foster J.T., Rónai Z., Sulyok K.M., Wehmann E., Jánosi S. et al, Gyuranecz M. 2014. Genetic relatedness of *Brucella suis* biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs. *Vet. Microbiol.* 172, 492–8. **14.** Lambert S., Gilot-Fromont E., Freycon P., Thébault A., Game Y., Toigo C. et al. 2018. High Shedding Potential and Significant Individual Heterogeneity in Naturally-Infected Alpine ibex (*Capra ibex*) With *Brucella melitensis*. *Front. Microbiol.* 9, 1065. **15.** McDermott J, Grace D, Zinsstag J. 2013. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Rev Sci Tech.* 32(1):249–61. **16.** Nymo I.H., Seppola M., Al Dahouk S., Bakkemo K.R., Jiménez de Bagüés M.P., Godfroid J. et al. 2016. Experimental Challenge of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) with a *Brucella pinnipedialis* Strain from Hooded Seal (*Cystophora cristata*). *PLoS ONE* 2016, 11, e0159272. **17.** Pappas G., Papanimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E.V. 2006. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases.* 6(2):91–9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6) PMID: 16439329. **18.** Pereira C.R., Cotrim de Almeida J.V.F., Cardoso de Oliveira I.R., Faria de Oliveira L., Pereira L.J., Zangero nimo M.G. et al. 2020. Occupational exposure to *Brucella* spp.: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 14(5): e0008164. **19.** Rushton J., Thornton P.K., Otte M.J. 1999. Methods of economic impact assessment. *Rev Sci Tech.* 18(2):315–42. **20.** Scholz H.C., Hofer E., Vergnaud G., Fleche P.L., Whatmore A.M., Dahouk S.A. et al. 2009. Isolation of *Brucella microti* from Mandibular Lymph Nodes of Red Foxes, *Vulpes vulpes*, in Lower Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9, 153–6. **21.** Scholz H.C., Hubalek Z., Sedlacek I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S. et al. 2008, *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 375–82. **22.** Scholz H.C., Revilla-Fernández S., Dahouk S.A., Hammerl J.A., Zygmunt M.S., Cloeckeaert A. et al. 2016. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 66, 2090–8. **23.** Shirima G.M., Kunda J.S. 2016. Prevalence of brucellosis in the human, livestock and wildlife interface areas of Serengeti National Park, Tanzania. Onderstepoort J. Vet. Res. 83, a1032. **24.** Tessaro S.V., Forbes L.B., Turcotte C. 1990. A survey of brucellosis and tuberculosis in bison in and around Wood Buffalo National Park, Canada. *Can. Vet. J. La Rev. Vet. Can.*, 31, 174–80. **25.** Welburn S.C., Beange I., Ducrottoy M.J., Okello A.L. 2015. The neglected zoonoses - the case for integrated control and advocacy. *Clin Microbiol Infect.* 21(5):433–43. **26.** Whatmore A.M., Davison N., Cloeckeaert A., Al Dahouk S., Zygmunt M.S., Brew S.D., et al. 2014. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 4120–4128. **27.** WHO, 2005. The control of neglected zoonotic diseases: A route to Poverty Alleviation. (Accessed on 28 December 2017. http://www.who.int/zoonoses/Report_Sept06.pdf. **28.** Zhang Ning, Huang Desheng, Wu Wei, Liu Jing, Liang Feng, Baosen Zhou, Peng Guan, Animal brucellosis control or eradication programs worldwide: A systematic review of experiences and lessons learned, *Preventive Veterinary Medicine*, Volume 160, 2018, 105-15. **29.** Zheng R., Xie S., Lu X., Sun L., Zhou Y., Zhang Y., Wang K. 2018. A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiology and Clinical Manifestations of Human Brucellosis in China. *Biomed. Res. Int.* 2018, 1–10. **30.** Zhou K., Wu B., Pan H., Paudyal N., Jiang J, Zhang L., Li Y. Yue M. 2020. ONE Health Approach to Address Zoonotic Brucellosis: A Spatiotemporal Associations Study Between Animals and Humans. *Front. Vet. Sci.* 7:521.

„MAJMUNSKE BOGINJE“ – ULOGA VETERINARA U SPREČAVANJU ŠIRENJA BOLESTI

Dragan Bacić, Elena Kosović, Tamara Radovanović, Nataša Stević

Kratak sadržaj

Majmunske boginje su retko oboljenje ljudi i životinja i prvi put su otkrivene 1958. godine kod majmuna koji su korišćeni u istraživačke svrhe, pa otuda i naziv „majmunske boginje“. Prvi slučaj majmunskih boginja kod ljudi je zabeležen 1970. godine u Demokratskoj Republici Kongo. Majmunske boginje izaziva virus iz familije Poxviridae, koji pripada rodu Orthopoxvirus. Rezervoar majmunskih boginja u prirodi je nepoznat, ali afrički glodari i primati mogu da budu inficirani virusom i predstavljaju potencijalni izvor zaraze za ljude. Ljudi se najčešće zaraze kontaktom sa inficiranim životinjama ili ljudima kao i materijalima koji su kontaminirani virusom. Prenos infekcije sa životinje na životinju nastaje kontaktom preko povređene kože, respiratornim putem (kapljična infekcija) u obliku aerosola, preko konjunktive ili konzumiranjem zaraženog mesa. Uloga veterinara u sprečavanju širenja majmunskih boginja je veoma značajna s obzirom na to da je sve veći broj primata i glodara, koji se uvoze iz Afrike u Evropu kao kućni ljubimci, a mogu da predstavljaju potencijalni izvor zaraze. Edukacija ljudi, preventivne mere, kao i blagovremena dijagnoza bolesti kod životinja, sprečavaju širenje bolesti na humanu populaciju.

Ključne reči: boginje majmuna, čovek, glodari, preventivne mere, primati, veterinari

UVOD

Majmunske boginje predstavljaju retko virusno oboljenje zoonoznog karaktera. Prvi put ga je identifikovao naučnik, Preben fon Magnus u Kopenhagenu, Danska, 1958. godine kod makaki majmuna (*Macaca fascicularis*) koji su korišćeni kao laboratorijske životinje i zbog toga su dobile ime majmunske boginje (4). Prvi slučaj kod ljudi je dijagnostikovao 1970. godine kod devetogodišnjeg dečaka u Zairu (danas Demokratska Republika Kongo) (5,27). Od tada se majmunske boginje javljaju endemski u Kongu i proširile su se na druge afričke zemlje, uglavnom u centralnoj i zapadnoj Africi (1,26).

¹Dr sci. vet. med. Dragan Bacić, vanredni profesor; dr vet. Elena Kosović, istraživač pripravnik; dr vet. Tamara Radovanović, stažista; dr sci. vet. med. Nataša Stević, docent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Bulevar Oslobođenja 18, 11000 Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: bacid@vet.bg.ac.rs

Van teritorije Afrike, prvi prijavljeni slučajevi majmunskih boginja su zabeleženi 2003. godine (6), a najnoviji slučajevi su prijavljeni 2022. godine (7,8). Majmunske boginje se prvenstveno javljaju u centralnoj i zapadnoj Africi, često u blizini tropskih kišnih šuma, ali se sve češće pojavljuju i u urbanim područjima. Prirodni domaćini za virus majmunskih boginja su različite vrste glodara, veverice, puhovi, pacovi i primati. Potrebna su dalja ispitivanja da bi se utvrdili tačni rezervoari i kako se cirkulacija virusa odvija u prirodi. Infekcija se sa životinje na čoveka može prenositi ujedom životinje ili direktnim kontaktom sa telesnim tečnostima zaražene životinje (19).

Etiologija i epidemiologija

Virus majmunskih boginja pripada rodu *Orthopoxvirus*. Postoje dve različite genske grupe virusa majmunskih boginja: genska grupa centralne Afrike (sliv reke Kongo) i zapadnoafrička grupa (2). Virus majmunskih boginja je kod divljih životinja do sada izolovan samo u dva slučaja, kod veverice u Demokratskoj Republici Kongo 1985. i kod majmuna, mangabeja (*Cercocebus atys*) u Obali Slonovače 2012. godine. S obzirom na to da je još uvek nepoznato koje su vrste životinja podložne infekciji, sve sisare treba smatrati mogućim izvorom infekcije i preduzeti odgovarajuće mere predostrožnosti (10). Majmunske boginje su bolest od globalnog značaja za javno zdravlje zbog toga što ne pogađa samo zemlje zapadne i centralne Afrike, već i ostatak sveta. Pretpostavlja se da je virus majmunskih boginja iz Afrike prenet u druge delove sveta preko turista ili uvezenih životinja, koje često ilegalnim putem dospevaju na teritoriju SAD, Evrope i drugih zemalja van Afričkog kontinenta (11,24).

Od 1970. godine prijavljeni su slučajevi majmunskih boginja u više afričkih zemalja i to su: Kamerun, Centralnoafrička Republika, Demokratska Republika Kongo, Gabon, Obala Slonovače, Liberija, Nigerija, Republika Kongo, Sijera Leone i Južni Sudan. U Nigeriji je 2017. godine zabeležena epidemija, sa preko 500 sumnjivih slučajeva i preko 200 potvrđenih, sa procentom smrtnosti od približno 3.

Prva epidemija majmunskih boginja izvan Afrike je zabeležena u Sjedinjenim Američkim Državama 2003. godine i nastala je kao posledica kontakta ljudi sa zaraženim kućnim ljubimcima, prerijskim psima (glodari iz roda *Cynomys*) (6). Ovi glodari su bili smešteni sa gambijskim pacovima i puhovima koji su uvezeni u SAD iz Gane. Epidemija je dovela do preko 70 slučajeva boginja majmuna kod ljudi u SAD. Majmunske boginje su prijavljene kod putnika iz Nigerije koji su putovali u Izrael u septembru 2018., zatim u UK u septembru 2018., decembru 2019., maju 2021. i maju 2022., a nakon toga u Singapuru u maju 2019., i SAD u julu i novembru 2021. godine (5,6). U maju 2022. godine je identifikovano više slučajeva majmunskih boginja u nekoliko zemalja van endemskih područja. Do 19. maja 2022. godine, širom sveta je potvrđeno 38 slučajeva. Od toga je 26 slučajeva potvrđeno u sledećim zemljama: Belgija (2), Francuska (1), Italija (1), Portugalija (14), Španija (7) i Švedska (1). U Velikoj Britaniji je potvrđeno devet slučajeva (15), u Severnoj Americi (3) u Kanadi (2) i SAD (1) (10). Većina sluča-

jeva je zabeležena kod muškaraca, homoseksualne orijentacije, a nijedan slučaj nije bio povezan sa putovanjem u područja gde se bolest endemski pojavljuje (12,15,16,17,18). Ovo je prvi put da su putevi prenošenja prijavljeni u Evropi bez poznatih epidemioloških veza sa zapadnom ili centralnom Afrikom.

Smatra se da virus majmunskih boginja ima umerenu prenosivost među ljudima. Interhumano širenje infekcije nastaje kao posledica bliskog kontakta sa obolelom osobom: preko sekreta respiratornog trakta, preko lezija na koži i sluzokoži ili preko kontaminiranih predmeta. Da bi došlo do infekcije respiratornim putem (kapljična infekcija) neophodan je duži bliski kontakt, što zdravstvene radnike, članove domaćinstva i druge osobe izlaže većem riziku. Najduži zabeleženi lanac prenošenja u humanoju populaciji, porastao je poslednjih godina sa 6 na 9 uzastopnih infekcija, od osobe do osobe. Infekcija se može preneti preko placente sa majke na fetus (što može dovesti do urođenih boginja majmuna) ili tokom kontakta nakon porođaja. Smatra se da je verovatnoća prenošenja između pojedinaca bez bliskog kontakta mala (3,13,26).

Klinička slika kod ljudi

Period inkubacije kod majmunskih boginja je obično od 6 do 13 dana, ali može da se kreće od 5 do 21 dan. Infekcija nastaje aerogenim putem, prodorom virusa preko oštećene kože, sluzokože respiratornog trakta očiju, nosa ili usta. Tok bolesti se može podeliti na dva stadijuma: početni stadijum (traje između 1-5 dana) i karakterišu ga groznica, intenzivna glavobolja, limfadenopatija, bol u leđima, mijalgija i intenzivna astenija (nedostatak energije).

Drugi stadijum bolesti karakterišu promene na koži koje obično počinju u roku od 1-3 dana od pojave groznice. Osip je uglavnom na licu i ekstremitetima a ne na telu. Pojavljuje se na licu (u 95 procenata slučajeva), dlanovima i tabanima (u 75 procenata slučajeva). Zahvaćene su i oralna sluzokoža (u 70 procenata slučajeva), genitalije (30 procenata), konjunktiva (20 procenata), kao i rožnjača. Osip evoluiru uzastopno od makula (lezije sa ravnom bazom) do papula (blago podignute čvrste lezije), vezikula (lezije ispunjene bistrom tečnošću), pustula (lezije ispunjene žućkastom tečnošću) i krasti koje se suše i otpadaju. Broj lezija varira od nekoliko, do nekoliko hiljada. U teškim slučajevima, lezije se mogu spojiti pa može doći do nekroze i otpadanja velikih delova. Komplikacije mogu nastati zbog sekundarnih infekcija, kada može doći do pojave bronhopneumonije, sepse, encefalitisa i infekcije rožnjače sa gubitkom vida. Stopa smrtnosti kod majmunskih boginja se kretala, od 0 do 11 procenata u opštoj populaciji, veća je među malom decom, a u poslednje vreme, stopa smrtnosti je oko 3-6 procenata. Većina ljudi se oporavi za 2 do 4. nedelje (7).

Dijagnoza

Sumnja na majmunsku boginju se postavlja na osnovu epidemiološke anamneze i kliničke slike, a konačna dijagnoza se može postaviti izolovanjem virusa

ili identifikacijom u lezijama kože pomoću elektronske mikroskopije. Pored toga, infekcija majmunskim boginjama može da se potvrdi testovima lančane reakcije polimeraze (PCR) ili imunohistohemijskim metodama. Serološke metode se ne preporučuju, zbog unakrsne antigenske reaktivnosti sa drugim poksvirusima. Na pregled se šalju delovi kože ili sadržaj iz vezikula i pustula. Virus se takođe može naći u brisevima grla i nazofarinksa. Prilikom obdukcije, potrebno je uzeti uzorke pluća, limfnih čvorova, jetre, slezine, bubrega, polnih žlezdi i delove promenjene kože. Uzorkovani materijal treba podeliti na dva dela. Jednu polovinu treba staviti u 10% formalin i držati na sobnoj temperaturi, a drugu polovinu sakupiti aseptički za izolaciju virusa. Uzorci se moraju čuvati u suvoj, sterilnoj epruveti (bez transportnog medijuma) držati na temperaturi frižidera ili zamrznuti na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Diferencijalno dijagnostički dolaze u obzir i druge bolesti sa pojavom osipa, kao što su velike boginje, varičele, bakterijske infekcije kože, šuga, sifilis i alergije na lekove. Limfadenopatija tokom prodromalnog stadijuma bolesti je patognomonični simptom za razlikovanje majmunskih boginja od varičela ili malih boginja (22,28).

Terapija i imunoprofilaksa

Trenutno ne postoji sigurna terapija za infekciju virusom majmunskih boginja. U svrhu kontrole epidemije majmunskih boginja se mogu koristiti vakcine protiv velikih boginja, antivirusna sredstva (Brincidofovir, Tecovirimat) i imunoglobulini. Nekoliko istraživačkih studija je pokazalo da je vakcinacija protiv velikih boginja, u 85 procenata slučajeva efikasna u prevenciji majmunskih boginja ili dovodi do pojave blaže kliničke slike. Najnovija vakcina protiv velikih boginja zasnovana je na modifikovanom atenuiranom vakcinija virusu (soj Ankara) i odobrena je za prevenciju majmunskih boginja 2019. godine (14,20,21,25). Američki centar za kontrolu bolesti, preporučuje vakcinaciju protiv velikih boginja u roku od 4 dana nakon kontakta sa virusom majmunskih boginja, kako bi se sprečio početak bolesti. Ako se vakcina da u periodu od 4 do 14 dana nakon kontakta sa virusom, ona može ublažiti simptome bolesti, ali ne može sprečiti njenu pojavu. Preporučuje se preekspoziciona vakcinacija osoblja koje radi dijagnostiku majmunskih boginja u laboratoriji, kao i osoblja koje radi sa bolesnim životinjama, vakcinom ACAM2000 ili JYNNEOS (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) (29).

Mere preveniranja infekcije u humanoj populaciji

Postoji niz mera koje se mogu preduzeti da bi se sprečila infekcija ljudi virusom majmunskih boginja: veća dostupnost informacijama o faktorima rizika i edukacija ljudi o merama koje mogu da preduzmu da smanje izloženost infekciji. Izbegavanje kontakta sa životinjama koje bi mogle da budu nosioci virusa (životinje koje su bolesne ili koje su pronađene mrtve u oblastima gde se javljaju majmunske boginje). Preporučuje se izbegavanje kontakta sa bilo kojim materi-

jalom (prostirka, predmeti) koji je bio u kontaktu sa bolesnom životinjom, kao i izolacija zaraženih pacijenata i sprečavanje kontakta sa zdravim osobama. Preporučuje se karantin u trajanju od 21 dana. Obavezno je pranje ruku nakon kontakta sa zaraženim životinjama ili ljudima, sapunom i vodom ili korišćenje sredstva za dezinfekciju ruku. Obavezno je korišćenje lične zaštitne opreme (23,29).

Mere preveniranja infekcije i značaj majmunskih boginja za veterinarsku medicinu

Prilikom pregleda majmuna, malih glodara, veverica, činčila, puhova, koji potiču iz rizičnih područja ili imaju simptome majmunskih boginja veterinari treba da preduzmu sve mere predostrožnosti, kako bi zaštitili sebe, osoblje, klijente, kao i druge životinje u klinici. Za sada je poznato da je nekoliko vrsta primata i glodara podložno infekciji virusom majmunskih boginja. S obzirom na to da su sve vrste životinja koje se mogu razboleti od majmunskih boginja, trenutno nepoznate, sve sisare treba smatrati potencijalnim izvorom zaraze.

Klinička slika kod životinja

Klinička slika je različita kod različitih životinjskih vrsta. Period inkubacije kod eksperimentalno zaraženih majmuna (*Macaca fascicularis*) iznosio je od 6 do 7 dana nakon aerogene infekcije.

Početni simptomi bolesti su groznica i pojava kožnih papula veličine od 1 do 4 mm, koje se razvijaju u pustule, a zatim nastaju kraste, koje otpadaju. Na tim mestima nastaju mali ožiljci. Lezije na koži majmuna imaju tipičan izgled: centar je izrazito, crven nekrotičan i okružen hiperplastičnim ćelijama epiderma. Promene se mogu videti po celom telu, ali su češće na licu, ekstremitetima, dlanovima, tabanima i repu. Broj lezija varira od nekoliko pojedinačnih, do velikog broja izrazitih lezija koje mogu da konfluiraju. Bolest traje od 4 do 6 nedelja. U težim slučajevima pojavljuju se: kašalj, iscedak iz nosa, dispneja, anoreksija, edem lica, promene u usnoj duplji i limfadenopatija. Pneumonija se pojavljuje samo kod majmuna koji su eksperimentalno zaraženi aerosolom.

Većina prirodno zaraženih životinja se oporavi, ali dolazi i do smrtnih ishoda posebno kod mladunaca. Takođe se javljaju i asimptomatske infekcije (29).

Simptomi koji su primećeni kod prerijskih pasa (mali glodari) tokom epidemije u SAD 2003. godine su bili: groznica, respiratorni simptomi, kašalj, konjunktivitis, ulceracije na jeziku, gubitak apetita i osip. Može doći do pojave nodularnog osipa i alopecije. Blagi klinički simptomi, bez respiratornih znakova i ograničenih lezija kože, primećeni su kod zaraženog gambijskog džinovskog pacova.

Zaražene životinje mogu biti infektivne 1 dan pre i do 21 dan nakon pojave početnih simptoma, ili dok se na svim lezijama na koži ne formiraju kraste i nestanu drugi simptomi. Američki centar za kontrolu bolesti preporučuje da se

svet životinje sa sumnjom na boginje majmuna eutanaziraju kako bi se sprečilo širenje bolesti (29).

Životinjama, za koje se sumnja da su zaražene, ne bi trebalo dozvoliti da uđu kroz čekaonicu veterinarske klinike niti ih treba uvoditi u zajedničku prostoriju za lečenje. Sav tretman i dijagnostiku treba obaviti u posebnoj sali za pregled. Broj osoblja koje dolazi u kontakt sa životinjom sumnjivom na oboljenje treba da bude ograničen na što je moguće manji broj (23,29).

Najčešći put prenošenja majmunskih boginja sa životinja na ljude je direktan kontakt sa zaraženim životinjama, ali se ne može isključiti mogućnost prenosa aerosolom. Američki centar za kontrolu bolesti preporučuje obavezan karantin za životinje koje su bile izložene boginjama majmuna u trajanju od mesec dana (29).

Prilikom pregleda životinja sa sumnjom na boginje majmuna, veterinari i osoblje treba da preduzmu sledeće mere predostrožnosti:

1. Obavezno je korišćenje kecelje i rukavica za svaki kontakt sa bolesnom životinjom ili kontaminiranim površinama. Obavezna je upotreba zaštitnih naočara ili štitnika za lice, kao i maske za lice (N95), prilikom pregleda ili ulaska u prostoriju u kojoj su smeštene sumnjive ili bolesne životinje.
2. Obavezno je pranje ruku i dezinfekcija, nakon svakog kontakta sa bolesnim životinjama i kontaminiranim površinama.
3. Odlaganje kontaminiranog otpadnog materijala treba uraditi nakon konsultacije sa veterinarskom ili sanitarnom inspekcijom. Prostirku, kavez, igračke ili činije za hranu i vodu ne treba odlagati u smeće klinike ili gradske kontejnere jer odloženi materijal može biti potencijalno zarazan. Predmete koji se ne mogu ukloniti, treba dezinfikovati, 0,5 % Na-hipohloritom.
4. Pranje veša (peškiri, odeća) se radi toplom vodom i deterdžentom. Može se koristiti standardna mašina za pranje veša. Upotreba hlornog izbeljivača tokom pranja toplom vodom može pružiti dodatnu meru bezbednosti. Treba biti oprezan pri rukovanju zaprljanim vešom kako bi se izbegao direktan kontakt sa kontaminiranim materijalom. Zaprljani veš ne treba istresati jer se mogu raspršiti čestice virusa (23,29).

ZAKLJUČAK

Boginje majmuna predstavljaju ozbiljan problem kako za humanu tako i za veterinarsku medicinu. Obzirom da se radi o ozbiljnoj bolesti i zoonozi za koju se još uvek ne zna pouzdan izvor infekcije u prirodi, kao ni vrste životinja koje mogu da obole ili da budu prenosioci virusa, pred strukom je ozbiljan problem kome treba posvetiti veliku pažnju. Pojava nekoliko slučajeva majmunskih boginja u maju 2022. godine u neendemskim zemaljama, kod ljudi koji nisu putovali u endemska područja i nisu došli u kontakt sa potencijalno inficiranim životinjama

je zabrinjavajuća i nameće pitanje: Ko su izvori i koji su putevi širenja infekcije? Obzirom na sve veći broj egzotičnih kućnih ljubimaca poreklom iz Afrike, veterinari su direktno suočeni sa potencijalnim izvorima zaraze. Da bi zaštitili sebe i sprečili širenje zaraze na humanu populaciju, veterinari treba zajedno sa medicinskom strukom da rade na edukaciji stanovništava i sprovođenju adekvatnih preventivnih mera. Preporučuje se fizičko distanciranje između ljudi zaraženih majmunskim boginjama i kućnih ljubimaca, pravilno zbrinjavanje otpada, kako bi se sprečilo prenošenje bolesti sa zaraženih ljudi na kućne ljubimce, životinje u zoološkim vrtovima i rezervatima. Da bi se smanjila mogućnost zaraze, turisti koji borave u endemskim zemljama treba da izbegavaju kontakt sa majmunima, glodarima, bolesnim ili mrtvim životinjama, kontakt sa kućnim ljubimcima i domaćim preživarima (goveda, bivoli), kao i direktan kontakt sa obolelim ljudima.

Na osnovu trenutne epidemiološke situacije i procene rizika, u ovom trenutku se ne preporučuje masovna vakcinacija ljudi protiv majmunskih boginja.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Breman J.G., Kalisa R., Steniowski M.V., Zanutto E., Gromyko A.I., Arita I. 1980. "Human monkeypox, 1970-79". *Bull World Health Organ.* 58 (2): 165-82. 2. Chen N., Li G., Liszewski M.K., et al. 2005. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *Virology.* 340:46. 3. Fine P.E., Jezek Z., Grab B., Dixon H. 1988. The transmission potential of monkeypox virus in human populations. *Int J Epidemiol.* 17(3):643-650. pmid:285027. 4. Von Magnus P., Andersen E.A., Petersen K.B., Birch-Andersen A. 1959. A pox-like disease in cynomolgus monkeys. *Acta Path Microbiol Scand.* 46:159. 5. Yong S.E.F., Ng O.T., Ho Z.J.M., Mak T.M., Marimuthu K., Vasoo S. et al. 2020. Imported monkeypox, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 26(8):1826-1830. pmid:32338590. 6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: multistate outbreak of monkeypox--Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; 52:642. 7. Reynolds M.G., Yorita K.L., Kuehnert M.J. et al. 2006. Clinical manifestations of human monkeypox influenced by route of infection. *J Infect Dis.* 194:773. 8. United States Centers for Disease Control and Prevention. Potential exposure to person with confirmed human monkeypox infection — United States, 2021 <https://emergency.cdc.gov/han/2021/han00446.asp> (Accessed on July 21, 2021). 9. European Centers for Disease Control. Monkeypox cases reported in UK and Portugal. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/monkeypox-cases-reported-uk-and-portugal> (Accessed on May 19, 2022). 10. Mukinda V.B., Mwema G., Kilundu M. et al. 1997. Re-emergence of human monkeypox in Zaire in 1996. Monkeypox Epidemiologic Working Group. *Lancet.* 349:1449. 11. Mauldin M.R., McCollum A.M., Nakazawa Y.J. et al. 2022. Exportation of Monkeypox Virus From the African Continent. *J Infect Dis.* 225:1367. 12. Reynolds M.G., Davidson W.B., Curns A.T. et al. 2003. Spectrum of infection and risk factors for human

monkeypox, United States, *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1332. **13.** Fleischauer A.T., Kile J.C., Davidson M. et al. 2005. Evaluation of human-to-human transmission of monkeypox from infected patients to health care workers. *Clin Infect Dis.* 40:689. **14.** Hammarlund E., Lewis M.W., Carter S.V. et al. 2005, Multiple diagnostic techniques identify previously vaccinated individuals with protective immunity against monkeypox. *Nat Med.* 11:1005. **15.** Vaughan A., Aarons E., Astbury J. et al. 2018. Two cases of monkeypox imported to the United Kingdom, September. *Euro Surveill.* 23. **16.** Vaughan A., Aarons E., Astbury J. 2020. Human-to-Human Transmission of Monkeypox Virus, United Kingdom, October. 2018. *Emerg Infect Dis.* 26:782. **17.** Erez N., Achdout H., Milrot E. et al. 2019. Diagnosis of Imported Monkeypox, Israel, 2018. *Emerg Infect Dis.* 25:980. **18.** Public Health Agency of Canada. Public Health Agency of Canada confirms 2 cases of monkeypox. <https://www.canada.ca/en/public-health/news/2022/05/public-health-agency-of-canada-confirms-2-cases-of-monkeypox.html> (Accessed on May 20, 2022). **19.** Huhn G.D., Bauer A.M., Yorita K. et al. 2005. Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease. *Clin Infect Dis.* 41:1742. **20.** Hutson C.L., Kondas A.V., Mauldin M.R. et al. 2021. Pharmacokinetics and Efficacy of a Potential Smallpox Therapeutic, Brincidofovir, in a Lethal Monkeypox Virus Animal Model. *mSphere*; 6. **21.** Grosenbach D.W., Honeychurch K., Rose E.A., et al. 2018. Oral Tecovirimat for the Treatment of Smallpox. *N Engl J Med*; 379:44. **22.** Li Y., Olson V.A., Laue T., Laker M.T., Damon I.K. 2006. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *J Clin Virol.* 36:194–203. **23.** Centers for Disease Control and Prevention. Monkeypox—transmission. 2015. (cited 2019 Sep 39. <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/transmission.html>. **24.** Angelo K.M., Petersen B.W., Hamer D.H., Schwartz E., 2019. Brunette G. Monkeypox transmission among international travelers— serious monkey business? *J Travel Med.* <http://dx.doi.org/10.1093/jtm/taz002>. **25.** Melamed S., Israely T., Paran N. 2018. Challenges and achievements in prevention and treatment of smallpox. *Vaccines (Basel).* 6:E8. **26.** Di Giulio D.B., Eckburg P.B. 2004. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect Dis.*4:15–25. **27.** Ladnyj I.D., Ziegler P., Kima E. 1972. A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. *Bull World Health Organ.*;46:593–7. **28.** Liszewski M.K., Farries T.C., Lublin D.M., Rooney I.A., Atkinson J.P. 1996. Control of the complement system. *Adv Immunol.* 61:201–83. **29.** “Basic Information about monkeypox.” Centers for Disease Control and Prevention (CDC), June 2003. 27 June 2003 <<http://www.cdc.gov/ncidod/monkeypox/factsheet.htm>>.

MALIGNA KATARALNA GROZNICA – PRIKAZ SLUČAJA

**Dimitrije Glišić¹, Milan Đorđević², Milan Ninković¹,
Zorana Zurovac Sapundžić¹, Bojan Milovanović¹,
Branislav Kureljušić¹, Vesna Milićević¹**

Kratak sadržaj

Maligna kataralna groznica je fatalno virusno oboljenje goveda, ali i drugih papkara. Bolest prouzrokuje četiri različita virusa iz familije Herpesviridae i roda Macavirus: Alcelaphine gammaherpesvirus 1 (AlHV-1), Alcelaphine gammaherpesvirus 2 (AlHV-2), Caprine gammaherpesvirus 2 (CpHV 2) i Ovine gammaherpesvirus 2 (OvHV-2). Najistraženije forme bolesti uključuju malignu kataralnu groznicu, koju prouzrokuje Alcelaphine gammaherpesvirus 1 kod papkara u Africi i životinja u zoološkim vrtovima i malignu kataralnu groznicu koju prouzrokuje Ovine gammaherpesvirus 2 kod goveda. Slučajevi maligne kataralne groznice su prijavljeni širom sveta. U Evropi su prijavljeni sporadični slučajevi maligne kataralne groznice kod goveda prouzrokovani sa OvHV-2. Kod svih oblika maligne kataralne groznice, postoji prirodni pravi domaćin kod koga ne dolazi do kliničke manifestacije oboljenja i prijemčive vrste, kod kojih dolazi do ispoljavanja kliničkih znakova. Pravi domaćin za OvHV-2 su ovce koje izlučuju virus, a do infekcije goveda dolazi putem aerosola usled kohabitacije. Kod goveda, bolest je najčešće akutnog toka sa ispoljenim kliničkim znacima koji obuhvataju: visoku temperaturu, depresiju, okularni i nazalni mukopurulentni eksudat, zamućenje kornee, limfadenopatiju, dijareju i mogući letalan ishod. Letalitet je kod goveda, sa manifestnim kliničkim znacima bolesti, 70-80 procenata. Maligna kataralna groznica je posebno značajna u diferencijalnoj dijagnostici nekih naročito opasnih infektivnih bolesti kao što su virusna dijareja goveda, slinavka i šap i infektivni rinotraheitis goveda. Iako je bolest potvrđena u Srbiji i u regionu postoji mali broj objavljenih saopštenja o tome. U ovom radu je opisan slučaj maligne kataralne groznice kod junice koja je preživela infekciju. Kod junice su opisani klinički znaci koji su obuhvatali: visoku temperaturu, otok limfnih čvorova, mukopurulentan iscedak iz očiju, inapetenciju, dijareju i erozije po mukozi usne duplje. Obolela junica se nalazila u kohabitaciji sa 7 ovaca i još jednim govečetom koga koga nije prijavljena pojava simptoma. Uzorci pune krvi (EDTA), brisa oka i brisa nosa su uzeti od junice sa opisanim kliničkim simptomima, zatim od

¹Dr vet. Dimitrije Glišić, istraživač pripravnik; dr vet. Milan Ninković, istraživač pripravnik; dr vet. Zorana Zurovac Sapundžić, istraživač saradnik; dr vet. Bojan Milovanović, istraživač pripravnik; dr sci. vet. med. Branislav Kureljušić, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Vesna Milićević, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Janisa Janulisa 14, 11000 Beograd, R. Srbija

²Spec. dr vet. Milan Đorđević, Veterinarska stanica Mladenovac, Kralja Petra 1347, 11400 Mladenovac, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: dimitrije.glisic@nivs.rs

govečeta bez kliničkih simptoma i od ovaca sa kojima je obolela jedinka bila u kohabitaciji. Od obolele jedinke su uzorci uzimani svake sedmice radi utvrđivanja trajanja viremije. Uzorci su dostavljeni u Naučni institut za veterinarstvo Srbije gde je izvršena dijagnostika primenom PCR metodologije. Genom uzročnika maligne kataralne groznice (OvHV-2) je utvrđen iz uzorka EDTA krvi, nazalnih i očnih briseva kod obolele junice, zatim kod dve od 7 kohabirajućih ovaca, dok kod drugog prijemčivog govečeta genom uzročnika nije detektovan. Vrlo interesantan podatak čini dužina trajanja viremije kod obolele junice, koja je u ovom slučaju iznosila skoro dva meseca. To je bilo potvrđeno prisustvom genoma virusa maligne kataralne groznice u uzorcima EDTA krvi, brisa oka i nosa i dva meseca nakon prvih zabeleženih simptoma. Izvor infekcije za obolelu junicu su predstavljale dve ovce kod kojih je detektovan genom virusa maligne kataralne groznice, a druga prijemčiva jedinka u zapatu nije obolela uprkos kohabitaciji. Kod junice koja je preživela infekciju nije zabeležen potpun oporavak. Opisane su hronične promene koje su obuhvatale zamućenje kornee kao i pojavu ožiljaka po nazalnoj i bukalnoj mukozi. Na osnovu zapaženih simptoma aplikovana je simptomatska terapija koju su činili preparati na bazi glukokortikosteroida (deksametazon), antibiotika širokog spektra delovanja (tetraciklini), zatim preparati na bazi kalcijuma, rastvori glukoze i fiziološki rastvor.

Ključne reči: *goveda, maligna kataralna groznica, PCR*

BRUCELOZA KOD DIVLJIH SVINJA I NJIHOV EPIZOOTIOLOŠKI ZNAČAJ

**Zorana Zurovac Sapundžić¹, Nataša Stević², Vesna Milićević¹,
Aleksandar Živulj³, Milijana Nešković⁴, Marina Radojičić²,
Jadranka Žutić¹**

Kratak sadržaj

*Bruceloza predstavlja jednu od najznačajnijih zoonoza i može se reći da u prošlosti nije bilo kontinenta na kojem zaraza nije registrovana kod domaćih životinja i ljudi. Zbog toga, bruceloza zauzima posebno mesto kako u veterinarskoj, tako i u humanoj infektologiji. Divlje svinje (*Sus scrofa*) su rezervoari mnogih infektivnih oboljenja, uključujući i brucelozu, dok sve češći kontakti divljih sa domaćim svinjama stvaraju uslove za međusobnu razmenu patogena. Našu zemlju karakteriše bogat fond lovne divljači, a divlja svinja je jedna od najznačajnijih lovnih vrsta. Istovremeno, uzgoj svinja u Srbiji, pogotovo u ekstenzivnom stočarstvu, često podrazumeva držanje svinja na otvorenom, što uz loše biosigurnosne mere, obezbeđuje gotovo idealne uslove za prodor različitih patogena. Sa druge strane, sve veća populacija divljih svinja, uz nepoznatu prevalenciju bruceloze, geografske karakteristike terena, kao i sve češće i slobodnije kretanje divljih svinja u blizini komercijalnih svinjarskih farmi povećavaju rizik za unos bruceloze u populaciju domaćih svinja. Takođe ne treba zanemariti ni praksu konzumiranja mesa divljih svinja. Iako su svinje prirodni domaćini za *B. suis*, kod ove vrste su zabeležene infekcije i sa drugim vrstama brucela. U Evropi, prevalencija bruceloze kod divljih svinja se kreće u širokom opsegu, do skoro 60 procenata. Najčešće je izolovana *B. suis* biotip 2. Na teritoriji naše zemlje, do danas, zvanično je potvrđeno prisustvo tri vrste brucela; *B. melitensis* biotip 3, *B. suis* biotip 2 i *B. canis*. Podaci o ovoj bolesti u populaciji divljih svinja na teritoriji naše zemlje nisu poznati. Sporadični slučajevi bolesti kod domaćih svinja, mogu ukazivati na divlje svinje kao potencijalne izvore ove infekcije. U zemljama u regionu, u populaciji divljih svinja je potvrđeno prisustvo *B. suis* biotip 2, a da granice ne predstavljaju prepreke za divlje svinje, ukazuje i utvrđena genetička sličnost izolata.*

¹Dr vet. Zorana Zurovac Sapundžić, istraživač saradnik; dr sci. vet. med. Vesna Milićević, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Jadranka Žutić, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Janisa Janulisa 14, 11000 Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Nataša Stević, docent; dr sci. vet. med. Marina Radojičić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Bulevar Oslobođenja 18, 11000 Beograd, R. Srbija

³Dr sci. vet. med. Aleksandar Živulj, Veterinarsko specijalistički institut Pančevo, Novoseljanski put 33, 26000 Pančevo, R. Srbija

⁴Dr vet. spec. Milijana Nešković, Veterinarsko specijalistički institut Zaječar, Izvorski put 1, 19000 Zaječar, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: zorana.zurovac@nivs.rs

Kontrolni programi bruceloze kod divljih životinja se ne sprovode i zbog toga postoji nesumnjiva potreba za istraživanjima pojave bruceloze kod divljih svinja.

Ključne reči: bruceloza, divlje svinje, Srbija, svinje

UVOD

Bruceloza predstavlja jednu od najznačajnijih zoonoza, a uzrokuju je gram negativne bakterije iz roda *Brucella* (familija *Brucellaceae*). Još od prvog opisa infekcije sa *B. melitensis*, kao uzročnikom Malteške groznice, pa sve do otkrića novih vrsta brucela i poslednje otkrivene vrste izolovane kod babuna (*B. papionis*) (Whatmore et al., 2014), bruceloza i dalje zauzima posebno mesto u veterinarskoj i humanoj infektologiji. Zaraza je poznata od davnina i rasprostranjena je širom sveta, a veruje se da je francuski imperator Napoleon Bonaparte (1769-1821) bolovao od bruceloze (Estipona et al., 1989). Ova hronična antropozoonoza je prisutna kod velikog broja domaćih i divljih životinja, a iako je eradikovana u mnogim zemljama Evrope, smatra se da su divlje životinje (divlje svinje, zečevi, lisice) rezervoari brucela, predstavljajući konstantan rizik za reintrodukciju zaraze u ovim zemljama.

BRUCELOZA KOD DIVLJIH SVINJA

Divlje svinje (*Sus scrofa*) su preci današnjih domaćih svinja i kao jedna od najrasprostranjenijih vrsta sisara na svetu su domorodačke vrste Evrope i severne Afrike. Populacija divljih svinja se poslednjih decenija konstantno povećava, pretežno u kontinentalnoj Evropi, što je omogućeno odsustvom predatora kao što su mrki medved i vuk, a takođe i zbog veštačkog prihranjivanja, razvijene poljoprivrede i visoke plodnosti. Gustina populacije divljih svinja u Evropi se kreće do 15 jedinki na km² (EFSA, 2022). Divlje svinje se smatraju sedentarnom vrstom, uprkos povremenim kretanjima na velike udaljenosti, kada mogu preći čak 100 km za 6 meseci (Jerina et al., 2014). Ova vrsta predstavlja rezervoar za mnoga zarazna oboljenja različite etiologije, uključujući i brucelozu. Svinje su prirodni domaćini za *B. suis*, u okviru koje postoji pet biotipova. Biotipovi 1, 2 i 3 *B. suis* se najčešće izoluju kod svinja i to 1 i 3 kod domaćih svinja, dok divlje svinje zajedno sa divljim zečevima (*Lepus europaeus*) predstavljaju rezervoare za *B. suis* biotip 2. Biotip 4 se nalazi kod irvasa, a biotip 5 samo kod glodara. *B. suis* biotipovi 1-4 imaju zoonozni potencijal, pri čemu 1 i 3 uzrokuju značajno težu kliničku sliku u odnosu na *B. suis* biotip 2. Iako su divlje svinje rezervoari za *B. suis* biotip 2, zabeležena je infekcija i sa biotipom *B. suis* 3 (Cvetnić et al., 2009). Dostupni literaturni podaci ukazuju da su moguće infekcije i sa drugim vrstama brucela (*B. melitensis* i *B. abortus*) (World Organisation for Animal Health OIE, 2021). Još jedan interesantan nalaz je izolacija *B. microti* iz submandibularnog limfnog čvora kod ženske jedinice divlje svinje (Rónai et al., 2015), iako se prirodnim rezervoarima ove vrste smatraju voluharice, a bakterije se mogu naći i kod lisica (Scholz et al., 2009) i u zemljištu (Scholz et al., 2008).

B. suis je kontrolnim programima praktično eradikovana iz populacije domaćih svinja, posebno na komercijalnim farmama u Evropi, Americi, Kanadi i Australiji, a uzročnik se održava u grupama divljih svinja u mnogim regionima, što komplikuje kontrolu bruceloze i dovodi do sporadične transmisije uzročnika na domaće svinje. Slučajevi bruceloze se sporadično prijavljuju kod lovačkih pasa i lovaca. Divlje svinje, kao rezervoari *B. suis* mogu predstavljati izvor zaraze i za goveda, što je dodatni rizik za zdravlje ljudi. Limitirani načini kojima se može smanjiti prevalencija bruceloze kod prirodnih rezervoara, kao i visoka virulencija pojedinih biotipova za ljude, ukazuju da *B. suis* i dalje zauzima važno mesto na listi infektivnih agenasa.

Do infekcije svinja brucelama najčešće dolazi alimentarnim putem, ingestijom hrane i vode kontaminirane delovima fetusa, placentom ili fetalnim tečnostima, ili putem vaginalne sluzi kojom se izlučuju velike količine ovih bakterija. Svinje izlučuju brucele i preko mleka, urina i semena. Mladunčad se može zaraziti preko majčinog mleka ili *in utero*. Infekcija je moguća i inhalacijom uzročnika, preko konjunktive ili povreda na koži, ali su ovi putevi infekcije manjeg epizootičkog značaja. Inkubacioni period može da varira, a za nastajanje infekcije ključni su doza i virulencija uzročnika, ulazna vrata infekcije i odbrambeni mehanizmi domaćina. Osnova patogeneze infekcije sa brucelama leži u njihovom intracelularnom parazitizmu, gde su zaštićene od odbrambenih mehanizama domaćina, što im omogućava da perzistiraju u organizmu duži vremenski period, čak i doživotno. U epidemiološkom i epizootičkom smislu ovo ima velikog značaja, gledano iz ugla širenja uzročnika u okolinu. Brucele imaju afinitet za reproduktivni trakt, pa kod ženskih jedinki dolazi do pobačaja, prevremenog porođaja ili rađanja avitalnih mladunaca, dok su kod muških promene u vidu inflamatornih promena na testisima, zglobovima i kostima. Epididimitis i orhitis mogu rezultirati sterilitetom, artritis i spondilitis otežanim kretanjem, a moguće su i druge komplikacije kao posledica formiranja apscesa u različitim tkivima i organima. Od patomorfoloških promena zapažaju se: apscesi, granulomi ili zapaljenske promene na materici, testisima, akcesornim polnim žlezdama, zglobovima, kostima, limfnim čvorovima, slezini, jetri, bubrezima, mlečnoj žlezdi i mokraćnoj bešici.

Glavna karakteristika bruceloze divljih svinja je izostanak kliničke slike i karakterističnih patomorfoloških promena. Da li je uzrok ovome niska patogenost *B. suis* biotipa 2, najčešće izolovana kod divljih svinja, nije jasno utvrđeno. Dijagnostika infekcija izazvanih brucelama obično ide u dva pravca: izolacijom uzročnika klasičnim bakteriološkim metodama ili dokazivanjem specifičnih antitela kao posrednih indikatora infekcije. Postavljanje konačne dijagnoze zahteva izolaciju i identifikaciju uzročnika, koja se retko sprovodi zbog neophodnih uslova rada i čestih neuspeha, te se status zaraženosti procenjuje na osnovu rezultata seroloških ispitivanja. Brucele se mogu izolovati iz pobačenih fetusa, placentae, vaginalnog brisa ili sluzi, semena, tkiva testisa ili epididimisa, krvi u fazi bakterijemije, sinovijalne tečnosti promenjenih zglobova, limfnih čvorova, slezine, materice, vimena, akcesornih polnih žlezda, jetre i bubrega. Od seroloških testova koji

se koriste u dijagnostici bruceloze u primeni su: Rose Bengal test (RBT), ELISA testovi (indirektni i kompetitivni ELISA testovi), reakcija vezivanja komplementa (RVK) i fluorescentna polarizacija. Do lažno pozitivnih rezultata može doći zbog unakrsne reaktivnosti sa antigenima drugih vrsta bakterija kao što su: *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* i *Yersinia enterocolitica* O:9. Molekularna dijagnostika (PCR) omogućava, ne samo identifikaciju izolovanih bakterija, već i direktno ispitivanje uzoraka.

Infekcija je kod divljih svinja potvrđena širom Evrope, od Skandinavije do Balkana (Godfroid 2002), sa prevalencijom *Brucella spp.* u širokom opsegu do skoro 60 procenata (Cvetnić et al., 2004). Rekordan broj divljih svinja u jugoistočnoj Belgiji, kada je veličina populacije procenjavana na preko 10 000 jedinki (45 jedinki na 1 000 ha šume), doveo je do izbivanja enzooske bruceloze (*B. suis* biotip 2) kod divljih svinja u ovoj zemlji 1994. godine (Godfroid et al., 1994). Iste godine, *B. suis* biotip 1 je izolovan kod radnika u mesari koji je obrađivao uvezeno meso poreklom od divlje svinje (Godfroid et al., 1994). U susednoj Hrvatskoj, utvrđena prevalencija bruceloze kod divljih svinja iznosi 17 procenata, pri čemu su divlje svinje potvrđeni prirodni vektori i rezervoari za *B. suis* biotip 2 (Cvetnić et al., 2004). Daljim ispitivanjima, koja su obuhvatila genotipizaciju *B. suis* ustanovljeno je da na teritoriji Hrvatske, Mađarske, Nemačke i Francuske cirkulišu identični sojevi (Ferreira et al., 2017), što govori u prilog činjenici da državne granice nisu dovoljna prepreka širenju infekcije.

BRUCELOZA KOD DIVLJIH SVINJA U SRBIJI

Republiku Srbiju sa preko 320 lovišta i oko 6 500 000 hektara lovne površine karakteriše bogat fond lovne divljači. Ekonomski gledano, divlja svinja je jedna od najznačajnijih lovnih vrsta. S obzirom na geografske karakteristike naše zemlje i nizak nivo primenjenih biosigurnosnih mera, divlje svinje neretko dolaze u kontakt sa domaćim svinjama i drugim domaćim životinjama, što olakšava međusobnu razmenu patogena. Uzgoj svinja u Srbiji, sa akcentom na ekstenzivno stočarstvo, često podrazumeva držanje svinja na otvorenom, što zajedno sa lošim biosigurnosnim merama koje se primenjuju stvara gotovo idealne uslove za prodor različitih patogenih agenasa. Sa druge strane, sve veća populacija divljih svinja, uz nepoznatu prevalenciju bruceloze kod ove vrste, geografske karakteristike terena i sve slobodnije kretanje divljih svinja u blizini komercijalnih farmi svinja povećavaju rizik za unos bruceloze u populaciju domaćih svinja. Često dolazi i do parenja, te nisu retki slučajevi legala iz direktnog ukrštanja divljih sa domaćim svinjama. Ne treba zanemariti ni praksu konzumiranja mesa divljih svinja. Nedostatak kontinuiranog praćenja zdravstvenog stanja ove lovne divljači predstavlja rizik prilikom konzumacije mesa poreklom od divljih svinja (Petrović et al., 2019). S obzirom da se monitoring programi različitih zaraznih bolesti u populaciji divljih svinja, za razliku od domaćih, ne spovode, konzumacija mesa divljih svinja predstavlja rizik za oboljevanje od bruceloze, tuberkuloze, leptospiroze i trihineloze (Petrović et al., 2019). Još jedna razlika podrazumeva metod

ubijanja životinja. Nasuprot kontrolisanim uslovima klanja u registrovanim klanicama, odstrel divljih svinja i obrada trupova u sklopu lovišta najčešće ne ispunjavaju zadovoljavajuće higijenske kriterijume, te lako dolazi do kontaminacije trupova.

Na teritoriji naše zemlje je do danas, potvrđeno prisustvo *B. melitensis* biotip 3, *B. suis* biotip 2 i *B. canis* (Radojičić, 2005). Za razliku od domaćih svinja, podaci o prisustvu i raširenosti bruceloze kod divljih svinja na teritoriji Srbije nisu dostupni. *B. suis* biotip 2 je potvrđen na teritoriji dva okruga naše zemlje, u populaciji domaćih svinja (Rogožarski et al., 2009; Žutić et al., 2017). Žutić i saradnici (2017) su izolovali *B. suis* biotip 2 iz dva fetusa domaćih svinja koje su gajene na otvorenom, a na osnovu dostupnih epizootioloških podataka nije bilo moguće utvrditi izvor infekcije. U ovom slučaju se pretpostavlja da je do infekcije došlo kao rezultat direktnog ili indirektnog kontakta sa divljim svinjama.

ZAKLJUČAK

Međusobna razmena različitih patogena između domaćih i divljih životinja se nesporno dešava, iako svi mehanizmi i načini prenošenja još uvek nisu razjašnjeni. Prenos bruceloze sa divljih na domaće životinje zavisi od prevalencije bruceloze kod divljih životinja, prijemčivosti vrste, otpornosti patogena u spoljašnjoj sredini i svakako od mogućnost kontakta domaćih sa divljim životinjama (Godfroid, 2014). Veoma je važno, u proučavanju bruceloze kod divljih životinja, napraviti razliku između preliivanja infekcije sa domaćih životinja i održive infekcije kod divljih vrsta, kako bi i strategije kontrole i eradikacije bile adekvatne. Koncept "Jedno zdravlje" (*One Health*) kao integrativni i višestruki pristup za kontrolu i prevenciju bruceloze u odnosu divlje životinje-domaće životinje-ljudi, uzimajući u obzir složene eko-epidemiološke aspekte ove zoonoze zahteva blisku međudisciplinarnu saradnju i angažman različitih sektora uključenih u nadzor, dijagnostiku i tretman infekcije. Do danas je sprovedeno nekoliko studija koje pružaju epidemiološke podatke o brucelozu kod divljih životinja, ali ne postoji sveobuhvatna studija koja daje globalnu sliku epidemiologije bruceloze kod divljih životinja (Dadar et al., 2020). Prema dostupnim literaturnim podacima utvrđeno je da su divlje svinje, od svih divljih životinja, vrsta kod koje je brucelozu najčešće ispitivana (Dadar et al., 2020).

Malo se zna o patologiji *B. suis* biotip 2 kod divljih svinja (Godfroid et al., 1994). Potreban je multidisciplinarni pristup koji bi obuhvatao sve aspekte počevši od odsustva/prisustva kliničkih simptoma infekcije, patologije i dr., prvenstveno u cilju utvrđivanja da li je brucelozu održiva u populaciji divljih svinja, kao i analiza faktora koji su od značaja za održavanje infekcije u ovoj populaciji. U upotrebi su različite metode dijagnostike, ali je zlatni standard u dijagnostici bruceloze i dalje izolacija brucela.

Na osnovu svega izloženog, zaključuje se da je značaj bruceloze u populaciji divljih svinja evidentan, kao i da se ogleda u više aspekata: zaštitu zdravlja

domaćih životinja, zaštiti javnog zdravlja, stočarstvu, lovu i uzgoju lovne divljači, očuvanju divljih životinja i njihove dobrobiti.

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2022- 14/200030).

LITERATURA

1. Cvetnić Ž., Tončić J., Spičić S., Lojkić M., Terzić S., Jemeršić L., et al., 2004. Brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in the Republic of Croatia. Veterinárni medicína, 49(4):115-122.
2. Cvetnić Ž., Špičić S., Tončić J., Majnarić D., Benić M., Albert D., et al., 2009. *Brucella suis* infection in domestic pigs and wild boar in Croatia. Rev Sci Tech, 28(3):1057-1067.
3. Dadar M., Shahali Y., Fakhri Y., Godfroid J. 2020. The global epidemiology of *Brucella* infections in terrestrial wildlife: a meta-analysis. Transboundary and Emerging Diseases, 68(2):715-729.
4. ENETWILD-consortium, Acevedo P., Aleksovski V., Apollonio M., Berdión O., Blanco-Aguilar J.A., del Rio L., et al., 2022. Wild boar density data generated by camera trapping in nineteen European areas. EFSA supporting publication 2022:EN-7214. 21pp.
5. Estipona A., Mason RE., Young J., Young JA. 1989. Brucellosis: A Range Livestock Problem. Rangelands, 11(4):174-176.
6. Ferreira AC., Corrêa de Sá MI., Dias R., Tenreiro R. 2017. MLVA-16 typing of *Brucella suis* biovar 2 strains circulating in Europe. Vet Microbiol, 210:77-82.
7. Godfroid J., Michel P., Uytterhaegen L., De Smedt C., Rasseneur F., Boelaert F., et al., 1994. Brucellose enzootique a *Brucella suis* biotype 2 chez le samglier (*Sus scrofa*) en Belgique. Ann Med vet, 138:263-268.
8. Godfroid J. 2002. Brucellosis in wildlife. Rev Sci Tech Off. int. Epiz, 21(2):277-86.
9. Godfroid J. 2014. Wildlife brucellosis: spillover or sustainable infection? In: Brucellosis 2014 International Research Conference: 67th Annual Brucellosis Research Meeting. Berlin, Germany: BFR, pp. 205-208.
10. Jerina K., Pokorný B., Stergar M. 2014. First evidence of long-distance dispersal of adult female wild boar (*Sus scrofa*) with piglets. European journal of wildlife research, 60(2):367-370.
11. Petrović J.M., Prodanov-Radulović J.Z., Mirčeta J.D. 2019. Wild boar meat safety. IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci, 333, 012015.
12. Radojičić S. 2005. Bruceloza- Epizootiološki i dijagnostički izazov. Veterinarski glasnik, 59(1-2):79-87.
13. Rogožarski D., Potkonjak A., Gagrcin M., Lako B., Plavšić B. 2009. Izolacija i identifikacija *Brucella suis* biotip 2 iz punktata epididimisa nerasta obolelog od bruceloze. Veterinarski glasnik, 63:153-161.
14. Rónai Z., Kreizinger Z., Dán Á., Drees K., Foster JT., Bányai K. et al., 2015. First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar *BMC Vet Res* 11, 147.
15. Scholz HC., Hubalek Z., Nesvadbova J., Tomaso H., Vergnaud G., Le Flèche P., et al. 2008. Isolation of *Brucella microti* from Soil. Emerg Infect Dis, 14:1316-7.
16. Scholz H.C., Hofer E., Vergnaud G., Le Fleche P., Whatmore A.M., Al Dahouk S. et al. 2009. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. Vector Borne Zoonotic Dis, 9:153.
17. Whatmore A.M., Davison N., Cloeckeaert A., Al Dahouk, S., Zygmunt M.S., Brew S.D., et al. 2014. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). Int J Syst Evol Microbiol, 64:4120-4128.
18. World Organisation for Animal Health OIE 2021. Chapter 3.1.4. - Brucellosis (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). OIE, Paris https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm
19. Žutić J., Cvetojević D.J., Veljović L.J., Radanović O., Stanojević S., Kureljušić B. 2017. First report of *Brucella suis* biovar 2 in outdoor reared pigs (*Sus Scrofa domesticus*) in Serbia. Turk J Vet Anim Sci, 41:700-704.

BRUCELLOSIS IN WILD BOARS AND THEIR EPIZOOTIOLOGICAL IMPORTANCE

**Zorana Zurovac Sapundžić, Nataša Stević, Vesna Milićević,
Aleksandar Živulj, Milijana Nešković, Marina Radojičić, Jadranka Žutić**

Summary

*Brucellosis is one of the most important zoonosis, and it could be said that in the past there was no continent where the disease was not registered in animals and humans. Therefore, the disease takes an important place in veterinary and human infectology. Wild boars (*Sus scrofa*) are reservoirs for many infectious diseases, including brucellosis, while more frequent contacts of wild and domestic pigs facilitate the pathogen transmission. In our country, rich with hunting fund, wild boars represent the dominant hunting species. In Serbia pigs breeding, emphasizing extensive farming, usually imply holding pigs on open, which supported with low biosecurity measures, ensure the almost ideal environment for different pathogen entrance. Increased wild boar population, with unknown disease prevalence, characteristics of inhabited areas, and freely movement of wild boars in commercial farms zone increase the risk of brucellosis in domestic pigs. Also, the practice of consuming wild boars meat, shouldn't be neglected. Although the pigs are natural hosts for *B. suis*, infections with other *Brucella* species were also registered. In Europe, reported brucellosis prevalence in wild boars is in a wide range, to almost 60%. The mostly isolated is *B. suis* biovar 2. On the territory of our country, the presence of three *Brucella* species is officially confirmed; *B. melitensis* biovar 3, *B. suis* biovar 2 and *B. canis*. Data regarding brucellosis in wild boars on the territory of our country are unknown. Sporadically reported cases in domestic pigs can indicate wild boars as potential sources of the infection. Presence of *B. suis* biovar 2 is confirmed in neighbouring countries, while the genetic similarity between isolates indicate that state borders are not barrier for the infection.*

Brucellosis control programs in wild life are not implemented, but all of the presented signify the need for research of brucellosis in wild boar population.

Key words: *brucellosis, pigs, Serbia, wild boar*

GOVEĐI RESPIRATORNI SINCICIJALNI VIRUS UZROČNIK PNEUMONIJA KOD GOVEDA – PRIKAZI SLUČAJEVA

*Milan Ninković, Ljubiša Veljović, Dimitrije Glišić,
Zorana Zurovac Sapundžić, Jadranka Žutić,
Branislav Kureljušić, Vesna Milićević*

Kratak sadržaj

Goveđi respiratorni sincicijalni virus je jedan od najznačajnijih uzročnika virusne etiologije koji dovode do pneumonije goveda svih starosnih kategorija. U ovom radu su prikazani slučajevi pneumonija prouzrokovanih goveđim respiratornim sincicijalnim virusom na 2 farme goveda koji su dijagnostikovani tokom maja 2022. god u opštini Vladimirci, Mačvanski okrug. Bolest je utvrđena na farmi tovne junadi (farma A sa 22 jedinke u tovu) i farmi muznih krava (farma B sa 24 jedinke). Kliničkim pregledom je kod obolelih životinja zapažen poremećaj opšteg zdravstvenog stanja koji se manifestovao apatijom, povišenom telesnom temperaturom, obilnim nosnim iscetkom, intenzivnim kašljanjem i otežalim abdominalnim disanjem. U težim kliničkim slučajevima, bolest se manifestovala držanjem otvorenih usta usled otežanog disanja i nedostatka vazduha. Na farmi tovne junadi, bolest se manifestovala i perakutnim tokom. U roku od 24 h od pojave prvih simptoma, na farmi A je došlo do uginuća jednog juneta težine oko 300 kg, dok je druga obolela jedinka uginula sledećeg dana. Na farmi muznih krava nije bilo uginuća, a pored prisutnih respiratornih simptoma, došlo je do pobačaja kod jedne krave u 8. mesecu steonosti. Za potrebe dijagnostičkog ispitivanja, izvršeno je uzorkovanje nosnih briseva od obolelih grla. Primenom metode RT-PCR potvrđeno je prisustvo genoma goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa. Testirani nosni brisevi su bili negativni na bovini herpes virus 1, parainfluncu 3 goveda, parainfluncu D, bovini korona virus i virus bovine virusne dijareje. Značajno je napomenuti da se na navedenim farmama ne vrši vakcinacija protiv respiratornih bolesti. Kod obolelih životinja je sprovedena simptomatska terapija koja je podrazumevala upotrebu antibiotika širokog spektra, glukokortikosteroida, nesteroidnih antiinflamatornih lekova, hipertoničnih rastvora elektrolita, bronhodilatatora, antihistaminika i vitamina C. Navedeni slučajevi potvrđuju, već uočen gubitak sezonskog karaktera, u pojavi pneumonija i težih respiratornih oboljenja goveda.

Ključne reči: *bovini respiratorni sincicijalni virus, goveda, pneumonije*

¹Dr vet. Milan Ninković, istraživač pripravnik; dr sci. vet. med. Ljubiša Veljović, naučni saradnik; dr vet. Dimitrije Glišić, istraživač pripravnik; dr vet. Zorana Zurovac Sapundžić, istraživač saradnik; dr sci. vet. med. Jadranka Žutić, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Branislav Kureljušić, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Vesna Milićević, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Janisa Janulisa 14, 11000 Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: milan.ninkovic@nivs.rs

Goveđi respiratorni sincicijalni virus je jedan od najvažnijih virusnih uzročnika respiratornih oboljenja kod goveda. Pojava bolesti je povezana sa stresogenim faktorima kao što su: transport, dolazak u tovilište, temperaturne varijacije, prenatrpanost u objektima i neadekvatni mikroklimatski uslovi. Mortalitet kod pneumonija prouzrokovanih goveđim respiratornim sincicijalnim virusom može biti i do 30 procenata. U ovom radu su prikazani slučajevi pneumonija prouzrokovani goveđim respiratornim sincicijalnim virusom na 2 farme goveda koji su dijagnostikovani tokom maja 2022. god u opštini Vladimirci, Mačvanski okrug. Bolest je utvrđena na farmi tovne junadi (farma A sa 22 jedinke u tovu) i farmi muznih krava (farma B sa 24 jedinke). Kliničkim pregledom je kod obolelih životinja zapažen poremećaj opšteg zdravstvenog stanja koji se manifestovao apatijom, povišenom telesnom temperaturom, obilnim nosnim iscetkom, intenzivnim kašljanjem, i otežanim abdominalnim disanjem. U težim kliničkim slučajevima bolest se manifestovala i držanjem otvorenih usta, izraženom salivacijom i ispruženim vratom usled otežanog disanja i nedostatka vazduha. Na farmi tovne junadi. bolest se manifestovala perakutnim tokom. U roku od 24 h, od pojave prvih simptoma, na farmi je došlo do uginuća jednog juneta težine oko 300 kg, dok je druga obolela jedinka uginula sledećeg dana. Na farmi muznih krava nije bilo uginuća, a pored prisutnih respiratornih simptoma, došlo je do pobačaja kod jedne krave u 8. mesecu steonosti. U posmatranim farmama je uzrok pojave pneumonije prouzrokovane goveđim respiratornim sincicijalnim bilo uvođenje nove teladi. U vrlo kratkom vremenskom roku došlo je do akutizacije procesa kod novopridošlih grla usled čega je većina ispoljila respiratorne simptome različitog inteziteta. Na farmi krava manji broj je ispoljavao respiratorne simptome i to su pre svega krave koje su bile bliže novopridošlj teladi. One su i imale težu kliničku sliku. Usled pneumonije praćene visokom telesnom temperaturom koja je prelazila preko 40 °C i izražene salivacije, kod jedne krave u osmom mesecu graviditeta, je drugog dana bolesti došlo do početka pobačaja. Već sledećeg dana, krava je izbacila mrtvo tele. Patoanatomskim pregledom uginule junadi su ustanovljene dominantne promene u kranioventralnim delovima pluća sa atelektatičnim promenama, tamno crvene do ljubičaste boje. Bilo je zapaženi i karakterično prisustvo interlobarnih emfizematoznih promena uz vrlo malu količinu penušavog sadržaja u respiratornim putevima. Prilikom manipulacije, tkivo pluća je često bilo krto pa je dolazilo do pucanja tkiva. Za potrebe dijagnostičkog ispitivanja izvršeno je uzorkovanje nosnih briseva od obolelih grla, dok je kod uginule junadi izvršeno uzorkovanje kranioventralnih delova pluća u cilju potvrde prisustva genoma goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa.

Primenom metode RT-PCR potvrđeno je prisustvo genoma goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa. Testirani nosni brisevi su bili negativni na bovini herpes virus 1, parainfluncu 3 goveda, parainfluncu D, bovini korona virus i virus bovine virusne dijareje. Značajno je napomenuti da se na navedenim farmama ne vrši vakcinacija protiv respiratornih bolesti. Kod obolelih životinja je sprovedena simptomatska terapija koja je podrazumevala upotrebu antibiotika širokog spektra, glukokortikosteroida, nesteroidnih antiinflamatornih lekova, hipertoničnih

rastvora elektrolita, bronhodilatatora, antihistaminika i vitamina C. Navedeni slučajevi potvrđuju već uočen gubitak sezonskog karaktera pojave pneumonija i težih respiratornih oboljenja kod goveda. Dokazana je pojava goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa često u obliku epidemija u letnjim mesecima, što ukazuje da se cirkulacija virusa odigrava cele godine.

U zaključku možemo reći da poštovanje principa biosigurnosnih mera "all in, all out" na primeru tovilišta predstavlja ključnu meru u cilju sprečavanja pojave pneumonije teladi. Često prisutna transportna groznica u tranzicionom periodu prelaska sa gazdinstva do tovilišta, predisponira pojavu pneumonija u interakciji sa mnogobrojnim drugim faktorima. Jedino rešenje koje treba primeniti u cilju sprečavanja uginuća, usled pneumonija prouzrokovanih goveđim respiratornim sincicijalnim virusom, je vakcinacija protiv respiratornih uzročnika pneumonija.

BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS CAUSING PNEUMONIA IN CATTLE – CASE REPORTS

**Milan Ninković, Ljubiša Veljović, Dimitrije Glišić,
Zorana Zurovac Sapundžić, Jadranka Žutić,
Branislav Kureljušić, Vesna Milićević**

Summary

The bovine respiratory syncytial virus is one of the most important viral etiology causes of pneumonia in cattle of all age categories. This paper presents case reports of pneumonia caused by bovine respiratory syncytial virus on 2 cattle farms, diagnosed in May 2022 in the municipality Vladimirci, Macva district. The disease was confirmed on a fattening farm (farm A with 22 cattle in fattening) and on a dairy cattle farm (farm B with 24 dairy cows). Clinical examination of infected animals revealed general health disorders manifested by apathy, fever, profuse nasal discharge, intense coughing, and difficulty in abdominal breathing. In severe clinical cases, the disease was manifested by keeping the mouth open due to the shortness of breath. On the fattening farm, the disease was manifested by a peracute course. Within 24 hours of the appearance of the first symptoms on the farm A, one calf weighing about 300 kg died, while the other infected animal died the next day. On the dairy farm no deaths were observed, and in addition to the present respiratory symptoms, one cow had an abortion in the 8th month of pregnancy. For the diagnostic examination purposes, nasal swabs from the infected animals were collected. The presence of the bovine respiratory syncytial virus genome was confirmed by the real-time RT-PCR method. The tested nasal swabs were negative for bovine herpesvirus 1, bovine parainfluenza 3, parainfluenza D, bovine coronavirus and bovine viral diarrhoea virus. Additionally, it is important to mention that vaccination against respiratory diseases on the both observed farms was not performed. A symptomatic therapy of infected animals was conducted, including the use of broad-spectrum antibiotics, glucocorticosteroids, non-steroidal anti-inflammatory drugs, hyper-

tonic electrolyte solutions, bronchodilators, antihistamines and vitamin C. The presented cases confirm the already observed loss of seasonal character of pneumonia occurrence and severe respiratory disorders in cattle.

Key words: *bovine respiratory syncytial virus, cattle, pneumonia*

AVIJARNI METAPNEUMOVIRUS NA RODITELJSKIM FARMAMA I FARMAMA KOKA NOSILJA

Slobodan Knežević^{1}, Marko Pajić¹, Suzana Vidaković Knežević¹,
Biljana Đurđević¹, Zoran Ružić², Diana Lupulović¹*

Kratak sadržaj

Avijarni metapneumovirus (aMPV) ili virus ćurećeg rinotraheitisa (TRTV) je veoma značajan patogen za živinu, posebno ćurke, koji izaziva akutnu infekciju gornjih respiratornih puteva, kao i sindrom otečene glave. Bolest je visoko kontagiozna, nanosi velike ekonomske gubitke u jatima kokošaka i ćuraka, posebno kada je povezana sa sekundarnim infekcijama. Oboljenje je uzrokovano avijarnim pneumovirusom različitih podtipova (A, B, C i D). AMPV pripada familiji Paramyxoviridae, subfamiliji Pneumovirinae, rod Metapneumovirus. Virus se prenosi direktnim i indirektnim putem. Nije dokazana mogućnost vertikalne transmisije. Klinička slika je nespecifična, a bolest se ispoljava u vidu poremećaja respiratornog i reproduktivnog sistema. Veliku ulogu u razvoju kliničke slike igraju sekundarne bakterijske infekcije, kao što je sindrom otečene glave koji je obično uzrokovan bakterijom *Escherichia coli*. Kod koka nosilja, ovo oboljenje se manifestuje padom nosivosti i lošim kvalitetom jaja. Mortalitet je nizak, obično ne viši od 2 odsto. Lezije u vidu edema i purulentnog eksudata se nalaze u potkožnom tkivu glave, vrata i infraorbitalnom sinusu. Nespecifični klinički simptomi predstavljaju otežavajuću okolnost u dijagnostici. Laboratorijska dijagnostika se zasniva na serološkim analizama, molekularnoj dijagnostici i izolaciji virusa. Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi epizootiološka situacija na farmama i prisustvo avijarnog metapneumovirusa (aMPV). U ovoj studiji su prikazani rezultati sprovedenog serološkog monitoringa na avijarni metapneumovirus u periodu od početka 2018. godine do kraja 2019. godine, u svrhu epizootiološkog nadzora na terenu. Tokom istraživanja, analizirane su farme koka nosilja i roditeljskog jata na području Južnobačkog i Sremskog okruga, koja nisu bila vakcinisana protiv ovog virusa. U navedenom periodu, ukupno su analizirana 39 jata koka nosilja, kao i 33 roditeljska jata pri čemu je uzorkovano po 20 uzoraka krvi od svakog jata za vreme perioda odgoja i eksploatacije. U toku 2018. godine, serološka provera je urađena kod 27 jata koka nosilja i 12 roditeljskih jata teške linije. U 2019. godini, serološka provera krvi na avijarni pneumovirus je rađena na 12 jata koka nosilja, odnosno kod 11 roditeljskih jata, među kojima je jedno roditeljsko jato bilo lake

¹Dr vet. Slobodan Knežević, istraživač saradnik; dr sci. vet. med. Marko Pajić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Suzana Vidaković Knežević, istraživač saradnik; dr sci. vet. med. Biljana Đurđević, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Diana Lupulović, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad, R. Srbija

²Dr Zoran Ružić, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: slobodan.knezevic@niv.ns.ac.rs

linije, a ostalih 10 jata su bili hibridi teške linije. Serološkom analizom uzoraka krvi na prisustvo specifičnih antitela protiv avijarnog metapneumovirusa dobijeni su pozitivni nalazi. Visoke vrednosti titra antitela na avijarni metapneumovirus kod nevakcinisanih jata živine, ispoljena klinička slika (jednostran do obostran otok glave, pad nosivosti, pad konzumacije hrane i vode, apatičnost jedinki) i povećan mortalitet, ukazuju na prisustvo avijarnog metapneumovirusa na farmama u Srbiji. U cilju prevencije pojave ovog oboljenja na farmama, potrebno je održavati visok nivo mera biosigurnosti, sprovoditi mere dezinfekcije, dezinsekcije i deratizacije i sprovoditi vakcinaciju. Vakcinacija je mera koja je od velikog značaja i značajno redukuje zdravstvene i proizvodne gubitke izazvane ovim patogenom. Žive atenuirane i inaktivisane vakcine imaju zadatak da stimulišu sistemski i lokalni imunitet na nivou respiratornog trakta. Eksperimentalna istraživanja su dokazala da je punu zaštitu protiv klinički ispoljenog avijarnog metapneumovirusa, uključujući i pad proizvodnje jaja, jedino moguće postići primenom žive atenuirane, a nakon toga i inaktivisane vakcine. Serološke i molekularne analize uzoraka tokom sporadičnog uzorkovanja ukazuju na to da većina jedinki u odgoju dolazi u kontakt sa virusom pre perioda pronošenja bez ispoljavanja kliničke slike.

Ključne reči: avijarni metapneumovirus, koke nosilje, otok glave, roditeljska jata, serološka analiza, vakcinacija

Zahvalnica:

Ovaj rad je rezultat istraživanja po Ugovoru sa Ministarstvom prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIV-NS u 2022. godini, broj 451-03-68/2022-14/200031.

UTICAJ ADENOVIRUSNE INFEKCIJE PILIĆA NA IMUNOLOŠKI ODGOVOR NAKON VAKINACIJE PROTIV ATIPIČNE KUGE PERADI

Jelena Maletić, Ljiljana Spalević, Branislav Kureljušić, Ljubiša Veljović, Nemanja Zdravković, Bojan Milovanović, Vesna Milićević

Kratak sadržaj

Živinarska proizvodnja se širom sveta suočava sa sve većom učestalošću bolesti izazvanih Adenovirusima živine (engl. Fowl Adenovirus – FAdV). Ova oboljenja imaju značajan ekonomski uticaj, naročito u proizvodnji brojlera. FAdV se smatra glavnim uzročnikom tri sindroma: adenovirusnih erozija i ulceracija mišićnog dela želuca, hepatitisa sa inkluzionim telima i hepatitis-hidroperikardijum sindroma. Virus se širi horizontalno i vertikalno. Moguće ga je izolovati od obolelih, ali i od zdravih odnosno inaparentno obolelih jedinki. Veoma važna osobina ovog virusa je njegov imunosupresivni potencijal, koji se ogleda supresijom humoralnog i ćelijskog imuniteta.

U ovom istraživanju je ispitivan imunski odgovor posle primene vakcine protiv Atipične kuge peradi (AKP) u jatima kod kojih je prethodno potvrđena serokonverzija protiv adenovirusa živine. Studija je sprovedena na 5 farmi (farme 1 – 4 i kontrolna farma) kapaciteta od 10 000 do 25 000 pilića. Ispitivanjem je bilo obuhvaćeno ukupno 220 pilića, starosti od četiri do pet nedelja, koji nisu ispoljavali kliničke znakove oboljevanja. Kontrolnu grupu je činilo 20 pilića sa farme kod koje nije utvrđena serokonverzija protiv FAdV. Pilići su između 11. i 13. dana života vakcinisani komercijalno dostupnim živim vakcinama. Primenom ELISA metode, utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv FAdV u 130 krvnih seruma (65 procenata). U zavisnosti od farme, prosečna seroprevalencija se kretala od 30-100 procenata. Primenom testa inhibicije hemaglutinacije, 14-21. dana nakon vakcinacije, utvrđivano je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa AKP. Pozitivan heminhibicioni (HI) titar (≥ 16) je utvrđen u 41 (20,5 procenata) serumu, što je značajno manje u poređenju sa kontrolnom farmom, gde je pozitivan HI titar utvrđen u 20 (100 procenata) seruma.

Naši rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora i ukazuju na prisustvo infekcije adenovirusima živine na brojlerskim farmama i na ozbiljan imunosupresivni potencijal ovog virusa kod inaparentno obolelih jedinki.

Ključne reči: adenovirus živine, atipična kuga peradi, vakcinacija

¹Dr sci. vet. med. Jelena Maletić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Ljiljana Spalević, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Branislav Kureljušić, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Ljubiša Veljović, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Nemanja Zdravković, naučni saradnik; dr vet. Bojan Milovanović, stručni saradnik; dr sci. vet. med. Vesna Milićević, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Janisa Janulisa 14, 11000 Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: jelena.maletic@nivs.rs

**FOWL ADENOVIRUS INFECTION INFLUENCE ON
THE IMMUNOLOGICAL RESPONSE OF BROILERS
AFTER VACCINATION AGAINST NEWCASTLE DISEASE**

**Jelena Maletić, Ljiljana Spalević, Branislav Kureljušić, Ljubiša Veljović,
Nemanja Zdravković, Bojan Milovanović, Vesna Milićević**

Summary

All over the world the poultry production is facing with an increasing of number of diseases related to Fowl adenovirus (FAdV). These diseases have a significant economic impact, especially in the production of broilers. FAdV is considered to be the main cause of three syndromes: adenoviral gizzard erosions and ulcerations, inclusion body hepatitis and hepatitis-hydropericardium syndrome. The virus spreads horizontally and vertically. It is possible to isolate it from sick, but also from healthy individuals. A very important feature of this virus is its immunosuppressive potential, which is reflected in the suppression of humoral and cellular immunity.

In this study, we examined the immune response after administration of the Newcastle disease (ND) vaccine in flocks with previously confirmed seroconversion against Fowl adenovirus. The study was conducted on 5 farms (farm 1, farm 2, farm 3, farm 4 and control farm). A total of 220 chickens, age of four to five weeks, did not show clinical signs of the disease. The control group consisted of 20 chickens from a FAdV-free farm. Chickens were vaccinated with commercially available live vaccines between 11 and 13 days of life. Using the ELISA method, the presence of specific antibodies against FAdV was determined in 130 blood sera (65 %) from farm 1, farm 2, farm 3 and farm 4. Depending on the farm, the average seroprevalence ranged from 30-100%. Using the hemagglutination inhibition assay, in the period from 14-21. days after vaccination, the presence of specific antibodies against ND virus were determined. A positive hemagglutination inhibition (HI) titer (≥ 16) was found in 41 (20.5%) sera, which is significantly less compared to the control farm, where a positive HI titer was found in 20 (100%) sera.

Our results are consistent with the results of other authors and indicate the presence of poultry adenovirus infection on broiler farms and a serious immunosuppressive potential of this virus in subclinical infected individuals.

Key words: fowl adenoviruses, Newcastle disease, vaccination

TEMATSKO ZASEDANJE III
PLENARY SESSION III

REPRODUKCIJA I ZDRAVSTVENA ZAŠTITA
DOMAĆIH ŽIVOTINJA
REPRODUCTION AND HEALTH CARE
OF DOMESTIC ANIMALS

DIFERENCIJALNA DIJAGNOSTIKA BOLESTI DEBELOG CREVA KOD SVINJA – PATOLOŠKI ASPEKT

**Branislav Kureljušić, Nemanja Jezdimirović, Bojan Milovanović,
Vesna Milićević, Jelena Maksimović Zorić, Jelena Maletić, Božidar Savić**

Kratak sadržaj

Infekcije digestivnog trakta predstavljaju veoma učestala oboljenja u uslovima intenzivne proizvodnje svinja i mogu imati značajan uticaj na ekonomičnost proizvodnje. U odnosu na lokalizaciju patološkog procesa, enteropatije svinja se mogu podeliti na enteropatije tankog i enteropatije debelog creva. Međutim, kod nekih bolesti, patološke lezije mogu biti prisutne i u tankom i u debelom crevu.

U patologiji digestivnog trakta, značajnu ulogu imaju pre svega *Salmonella* *Typimurium* koja dovodi do pojave ulceroznog difteroidno-nekrotičnog tiflokolitisa, *Lawsonia intracellularis* uzročnik proliferativne enteropatije svinja (PPE), *Brachyspira hyodysenteriae* uzročnik mukohemoragičnog pseudomembranoznog tiflokolitisa, dok je *Brachyspira pilosicoli* etiološki agens intestinalne spirohetoze. U slučajevima teže infestacije, parazit *Trichuris suis* prouzrokuje mukohemoragični tiflokolitis. Kolitis kompleks dijareja (CCD) se karakteriše pojavom dijareje kod svinja kao posledicom zapaljenja kolona i oštećenja sluznice. Egzaktna etiologija ove bolesti nije potvrđena. Smatra se da prekomerna upotreba antibiotika uz sadejstvo *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* i *T. suis* imaju dominantnu ulogu u etiopatogenezi bolesti. Sindrom hemoragičnih creva (HBS) se karakteriše iznenadnim uginućem svinja u predtovu i tovu. Na obdukciji se uočava izrazita kongestija tankih i debelih creva, a sadržaj creva sadrži primese krvi. Ovo stanje se mora razlikovati od ezofagogastričnog ulkusa i ulceracija želuca kod svinja, torzije i volvulusa creva i hemoragične forme proliferativne enteropatije. Edem mezokolona se karakteriše seroznom infiltracijom mezenterijuma kolona i može se pojaviti u sklopu sindroma edema mezokolona, cirkovirusne infekcije, edemske bolesti i ređe, kao pratilac salmoneloze i dizenterije svinja. Cistična pneumatoza mezenterijuma creva (*Pneumatosis cystoides intestinalis*) predstavlja idiopatsko nakupljanje gasa u serozi i limfnim sudovima seroze tankog i debelog creva, a dovodi se u vezu sa prisustvom većeg broja anaerobnih bakterija u crevima koje proizvode gasove i to najčešće u slučaju ishrane svinja hranivima koja sadrže veliku količinu ugljenih hidrata.

¹Dr sci. vet. med. Branislav Kureljušić, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Nemanja Jezdimirović, naučni saradnik; dr vet. Bojan Milovanović, stručni saradnik; dr sci. vet. med. Vesna Milićević, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Jelena Maksimović Zorić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Jelena Maletić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Božidar Savić, naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, R. Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: branislavkureljusic@yahoo.com

Blagovremeno dijagnostikovanje određene enteropatije je od ključnog značaja za pravovremenu terapiju, ali i za implemetaciju odgovarajućih profilaktičkih mera.

Ključne reči: bolesti debelog creva, etiologija, dijagnostika, svinje

UVOD

Infekcije digestivnog trakta su učestala oboljenja u uslovima intenzivne proizvodnje svinja i mogu imati značajan uticaj na ekonomičnost proizvodnje. U etiologiji enteropatija, najznačajniju ulogu imaju virusi, bakterije, protozoe i paraziti. U nastanku nekih enteropatija značajno je sinergističko delovanje više etioloških činilaca uz sadejstvo faktora spoljašnje sredine. U tom smislu, mora se posvetiti posebna pažnja ishrani svinja, s obzirom da u kvalitativnom i u kvantitativnom smislu kompletna krmna smeša mora da zadovolji potrebe odgovarajuće proizvodne kategorije svinja. U suprotnom, stvaraju se uslovi za nastanak različitih digestivnih poremećaja.

U odnosu na lokalizaciju patološkog procesa, enteropatije svinja se mogu podeliti na enteropatije tankog i enteropatije debelog creva. Ovakva podela je samo didaktička, zbog toga što su svi delovi digestivnog trakta funkcionalno međusobno povezani pa se određeni patološki proces iz jednog segmenta može vrlo lako preneti u drugi segment digestivnog trakta. Tako na primer, kod nekih bolesti, patološke lezije mogu biti prisutne i u tankom i u debelom crevu. Međutim, pojedini uzročnici pokazuju isključivo tropizam ka debelom crevu, kao što su na primer *Brachispira hyodysenterae* i *Brachispira pilosicoli*. U odnosu na lokalizaciju patološkog procesa u debelom crevu se razlikuju se: tiflitis, kolitis i proktitis.

Salmoneloza

Salmoneloza je oboljenje želudačno-crevnog trakta ljudi i životinja. Salmoneloze su primarno bolesti domaćih životinja, koje se na čoveka prenose konzumiranjem hrane animalnog porekla, kontaminirane salmonelom i njenim toksinom. *S. Choleleraeus* je najčešći uzročnik salmoneloze svinja i najčešće izaziva septikemičnu formu bolesti. *S. Typhimurium* je drugi po učestalosti uzročnik salmoneloze svinja i izaziva enterokolitis. U Evropi se najčešće pojavljuje infekcija sa *S. Typhimurium* (Zimmerman et al., 2012). Međutim, tokom 2021. godine, u Srbiji je po prvi put potvrđen slučaj salmoneloze prouzrokovane sa *S. Choleraeus* (Savić et al., 2021). Pored njih, *S. Heidelberg* se pominje kao uzročnik kataralnog enterokolitisa mladih svinja (Zimmerman et al., 2012).

Klinički se salmoneloza kod svinja može pojaviti u septikemičnoj formi, formi enterokolitisa i drugih ređe prisutnih oblika kao što su kazeozni limfadenitis, meningoencefalitis, intersticijalna ili gnojna pneumonija (Kureljušić i sar, 2016).

Salmonelozni enterokolitis se najčešće pojavljuje od zalučenja pa do četvrtog meseca života. Oboljenje može biti akutno ili hronično. Najčešće se izoluje

S. Typhimurium, a ređe *S. Choleraesuis*. Bolest se karakteriše profuznom vodenastom dijarejom žute boje, kasnije uz primese sluzi i krvi. Životinje su febrilne, dehidrirane i bez apetita (Zimmerman et al., 2012). Infekcija svinja salmonelama nastaje orofekalnim putem, ali su neka ispitivanja dokazala da gornji respiratorni putevi i pluća mogu biti ulazna vrata za infekciju salmonelama (Proux et al., 2001). Nespecifični faktori odbrane u usnoj duplji su od prvorazrednog značaja u odbrani organizma od infekcije. Salmonele koje prođu ovu barijeru mogu da kolonizuju tonzile. Nepčane tonzile su često teško inficirane kod svinja i iz tog razloga ih ne bi trebalo potcenjivati kao izvor mogućih kontaminacija prilikom klanja.

Prilikom obdukcije se mogu ustanoviti promene na sluznici želuca, ileuma, cekuma i kolona. Ove promene se manifestuju u tipu difteroidno-nekrotične inflamacije (debele žuto-sive naslage koje su na pojedinim mestima ispucale). Spajanjem difteroidno-nekrotičnih polja, promenjeni delovi creva podsećaju na krute cevi debelog zida, a kada se otvore, ne gube lumen. Na preseku je zid creva slaninasto zadebljao. Patološki proces u debelim crevima se odigrava u određenim razvojnim fazama kojima prethodi proliferacija limfnih folikula, koja je uvek prisutan nalaz (Kureljušić i sar, 2016).

Proliferativna enteropatija svinja

Proliferativna enteropatija svinja (PPE) je infektivno, hiperplastično oboljenje creva koje se karakteriše zadebljanjem intestinalne sluznice i nastaje kao posledica proliferacije enterocita. Oboljenje se pojavljuje kod zalučene prasadi i to najčešće kod svinja u odgoju i tovu. Uzročnik oboljenja je obligatno intracelularna bakterija *Lawsonia intracellularis*, koja se pre svega umnožava u citoplazmi epitelnih ćelija creva. Postoje dve forme proliferativne enteropatije svinja: klinička i supklinička. Kliničke forme mogu biti akutne i hronične. Akutna klinička forma je hemoragična proliferativna enteropatija. Hronične forme obuhvataju: intestinalnu adenomatozu svinja, nekrotični enteritis i regionalni ileitis. Kod svih ovih oblika, prisutna je karakteristična lezija: zadebljanje sluznice tankog creva (pre svega ileuma), cekuma i/ili proksimalnog kolona. Osnovna histološka lezija proliferativne enteropatije svinja je adenomatozna hiperplazija nezrelih ćelija crevnih kripti i nedostatak peharastih ćelija. Patomorfološka dijagnoza uključuje makroskopski nalaz, kao i primenu histohemijskih i imunohistohemijskih metoda (Ivetić i sar, 2009).

Najčešći oblik koji se pojavljuje na našim farmama je hemoragična proliferativna enteropatija. Patomorfološke promene u vidu zadebljanja crevnog zida i proširenog lumena se mogu ustanoviti na kaudalnom delu jejunuma i ileumu. U lumenu ileuma i kolona se mogu uočiti ugrušci krvi bez prisustva hrane. U rektumu se ustanovljava katranasti feces koji potiče od svaene krvi i crevnog sadržaja. Površina sluznice zahvaćenog dela creva ispoljava značajno hiperplastično zadebljanje. U proliferisanom epitelu se histološkim ispitivanjem uočava degeneracija epitelnih ćelija, kao i kongestija i obimna krvavljenja. Pored toga, zapaža se i nakupljanje hemoragičnog ćelijskog debrisa iznad površine sluznice.

Warthin-Starry bojenjem se uočavaju grupe argirofilnih, blago savijenih štapićastih mikroorganizama u apikalnoj citoplazmi enterocita. Imunohistohemijskim ispitivanjem, upotrebom monoklonskih antitela protiv *L. intracellularis*, može se potvrditi prisustvo mikroorganizama u apikalnoj citoplazmi hiperplastičnih enterocita i u lamini propriji (Kureljušić i sar, 2012).

Dizenterija

Dizenterija je, u ekonomskom smislu, veoma važna enteropatija svinja koja prouzrokuje značajne direktne i indirektne gubitke u savremenoj proizvodnji svinja. Oboljenje se pojavljuje najčešće kod svinja u tovu, mada se može pojaviti i kod prasadi u odgoju. Uzročnik dizenterije je *Brachyspira hyodysenteriae*. Razlikuje se dvanaest serotipova *B. hyodysenteriae*. Pored nje, u etiopatogenezi ove enteropatije određenu ulogu imaju i drugi mikroorganizmi od koji su najznačajniji *Campylobacter coli*, *Bacteriodes vulgatus*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens* i *Balantidium coli* koji delujući sinergistički sa primarnim etiološkim agensom dovode do karakterističnih patoloških lezija.

Oboljenje se karakteriše pojavom mukohemoragičnog enteritisa pri čemu su najčešće zahvaćeni cekum, spiralni kolon, kolon i rektum. Patološke promene na sluznici debelog creva mogu biti akutne, subakutne i hronične i u zavisnosti od toga varira patoanatomska slika. Promene se u početku karakterišu difuznim pseudomembranoznim superficijalnim zapaljenjem sa pojavom krvi, sluzi i fibrina u sadržaju creva. U hroničnim slučajevima se razvija difteroidno nekrotično zapaljenje, obično bez krvavog sadržaja. Primarni izvor infekcije za prasad je feces inficiranih krmača tako da je održavanje zoohigijenskih mera na primerenom nivou od prvorazrednog značaja u borbi protiv dizenterije (Savić et al., 2016).

Trihurioza

Trihurioza svinja je parazitsko oboljenje debelog creva prouzrokovano nematodom *Trichuris suis*. U nekim zemljama, oboljenje je veoma učestalo i to naročito kod svinja u slobodnom načinu uzgoja. U SAD, se *Trichuris suis* smatra trećim endoparazitom po učestalosti pojavljivanja. U zavisnosti od intenziteta infekcije, oboljenje se može pojaviti u subkliničkoj i kliničkoj formi. Ženke parazita su dužine od 6 do 8 cm, dok su mužjaci kraći (3 do 4). Kada se na obdukciji pregleda debelo crevo (cekum i kolon) može se uočiti adultni oblik parazita čije su 2/3 prednjeg užeg dela pričvršćene u samoj sluznici creva, a jedna trećina je na površini crevne sluznice. U debelom crevu, paraziti prouzrokuju difuzni mukofibrozni ili mukohemoragični tiflokolitis. Fokalne ulceracije mogu biti komplikovane sekundarnom infekcijom salmonelama ili protozoama kao što je *Balantidium coli*. Ponekad, usled inflamatorne reakcije, oko parazita se formiraju infalamorni noduli zbog edema i zadebljanja crevnog zida. Kod težih slučajeva se na površini sluznice debelog creva mogu uočiti fibrinozne pseudomembrane. Blaga infestacija najčešće nije praćena kliničkom slikom. Kod težih infestacija se mogu javi-

ti: anoreksija, mukoidna ili mukohemoragična dijareja, dehidracija i ponekada uginuća (Bünger et al. 2022; Zimmerman et al., 2012).

Kolitis kompleks dijareja (CCD)

Kod svinja u tovu, dijareja predstavlja veoma veliki izazov za savremenu proizvodnju i veterinarsku profesiju. Patologija digestivnog trakta svinja je uvek povezana sa smanjenom dobrobiti, smanjenim prirastom odnosno usporenim rastom, povećanjem stope konverzije hrane i veoma često, upotrebom antibiotika, čime se stvaraju uslovi za razvoj globalne rezistencije mikroorganizama prema antimikrobnim lekovima. Najčešći uzrok dijareje kod svinja u porastu (odgoj i tov) su inflamatorne bolesti debelog creva (kolitis) koje se u literaturi danas opisuju kao kolitis kompleks dijareja (CCD).

Kolitis kompleks dijareja (CCD) se karakteriše pojavom dijareje kod svinja kao posledicom zapaljenja kolona i oštećenja sluznice čime se remeti barijera digestivnog trakta. Egzaktna etiologija ove bolesti nije potvrđena, međutim, smatra se da nutritivni faktori, prekomerna upotreba antibiotika uz sadejstvo *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* i *T. suis* imaju dominantnu ulogu u njenoj etiopatogenezi. Pored toga, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* i *Lawsonia intracellularis* takođe mogu biti infektivni uzročnici koji provociraju nastanak CCD. Kolitis kompleks dijareja se najčešće pojavljuje kod svinja od 4. do 16. nedelje nakon zalućenja. Ukoliko se pri dijagnostici ne utvrde specifični infektivni uzročnici, nutritivni faktori kao što su visok nivo proteina u kompletnoj krmnoj smeši, peletirana hrana i deficit antioksidanasa mogu biti potencijalni uzroci nespecifičnog kolitisa. U prevenciji ovog poremećaja pozitivne efekte ima suplementacija polinezasićenim masnim kiselinama, polifenolima, esencijalnim aminokiselinama (treonin, cistein, prolin), kratkolančanim masnim kiselinama (buterna kiselina). Bolest se može podeliti na dva nozološka entiteta: specifični kolitis (SC) koji je prouzrokovan jednim ili sa više specifičnih patogena i nespecifični kolitis koji je najčešće prouzrokovan nutritivnim faktorima bez uticaja infektivnih etioloških činilaca (Panah et al., 2021).

Definisan kao inflamatorna bolest debelog creva, CCD može da deli neke od patogenih mehanizama inflamatorne bolesti creva (IBD) kod ljudi, kao što je na primer, ulcerozni kolitis (UC). Zadebljanje zida creva sa izraženom vaskularizacijom se smatra najčešće korišćenim dijagnostičkim kriterijumom za karakterizaciju IBD kod ljudi (Panah et al., 2021).

Poremećaji u položaju creva i enterohemoragični sindrom

Poremećaj u položaju creva kod intestinalne torzije je neizostavno praćen pojavom hemoragičnog infarkta creva i prisustvom sveže krvi u lumenu creva. Za razliku od ovog stanja, gde je torzija po uzdužnoj osi mezenterijuma evidentna i zahvata najčešće i tanko i debelo crevo, krvavljenja u tankim i debelim crevima se mogu javiti i kod hemoragične bolesti creva (engl. *hemorrhagic bowel disease* – HBS). Oba ova stanja se završavaju perakutnim uginućem pre nego što se pojavi

krv u fecesu. Etiologija HBS je kompleksna i nije sasvim poznata. Predisponirajući faktori za nastanak ove bolesti su nagli pokreti koje svinje prave naročito kada su uznemirene, potom premeštanje svinja i neredovno hranjenje. Ishrana tečnom hranom i lako svarljivim hranivima predstavljaju predispoziciju za nastanak HBS. Jedan od mogućih uzroka može biti i torzija mezenterijuma, koja se otkriva na obdukciji. Međutim, u najvećem broju slučajeva dolazi do postmortalne repozicije pa se na obdukciji ustanovljava fiziološki situs organa trbušne duplje.

Bolest se karakteriše iznenadnim uginućem svinja bez pojave dijareje, najčešće tovljenika u uzrastu od 4 do 6 meseci. Na obdukciji se u tankom crevu nalazi ugrušana ili neugrušana krv, a zid tankog creva je značajno istanjen. U debelom crevu se nalazi katranasti sadržaj, a na sluznici debelog creva nema lezija (Kureljušić et al., 2022).

Cistična pneumatoza mezenterijuma creva

Cistična pneumatoza mezenterijuma creva (*Pneumosis cystoides intestinalis*) je idiopatsko nakupljanje gasa u serozi i limfnim sudovima seroze tankog i debelog creva, a dovodi se u vezu sa prisustvom većeg broja anaerobnih bakterija u crevima koje produkuju gasove i to najčešće pri ishrani svinja hranivima koja sadrže veliku količinu ugljenih hidrata (Ivetić et al., 2007).

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2022-14/200030)

LITERATURA

1. Büngrer M., Renzhammer R., Joachim A., Hinney B., Brunthaler R., Al Hossan M et al, 2022. Trichurosis on a Conventional Swine Fattening Farm with Extensive Husbandry – A Case Report. *Pathogens*. 11(7):775. 2. Ivetić V., Žutić M., Savić B., Kureljušić B. 2009. Proliferativna enteropatija svinja (PPE), Zbornik radova 7. simpozijuma Zdravstvena zaštita, selekcija i reprodukcija svinja, 21-23.5.2009. Srebrno Jezero, 45-50. 3. Ivetić V., Žutić M., Savić B., Pavlović I., Milošević B., Valter D, 2007. Atlas bolesti svinja, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd. 4. Kureljušić B., Dobrosavljević I., Milovanović B., Jezdimirović N., Radanović O., Miličević V i sar. 2022. Diferencijalna dijagnostika bolesti svinja koje se karakterišu krvavljenjem u digestivnom traktu. Zbornik radova 19. simpozijuma sa međunarodnim učešćem "Zdravstvena zaštita, selekcija i reprodukcija svinja, Srebrno jezero – Veliko Gradište, 2-3. jun 2022., 16. 5. Kureljušić B., Savić B., Jezdimirović N., Radanović O., Kureljušić J., Žutić M et al, 2012, Patomorphological diagnosis of hemorrhagic proliferative enteropathy in swine, *Contemporary Agriculture*, 61(1-2): 68-74. 6. Kureljušić B., Savić B., Radanović O., Cvetojević Đ., Kureljušić Jasna, Jezdimirović N, 2016. Salmoneloza u savremenoj proizvodnji svinja – uvek aktuelna zoonoza, Zbornik radova 14. savetovanja „Zdravstvena zaštita, selekcija i reprodukcija svinja“, Srebrno jezero, 2-4. Jun 2016, 50-5. 7. Panah F.M., Lauridsen C., Højberg O., Nielsen T.S. 2021. Etiology of Colitis-Complex Diarrhea in Growing Pigs: A Review. *Animals (Basel)*. July 20;11(7):2151. 8.

Proux K., Cariolet R., Fravalo P., Houdayer C., Keranflech A., Made, F. 2001. Contamination of pigs by nose-to-nose contact or airborne transmission of *Salmonella* Typhimurium. *Veterinary Research*, 32, 591–600. **9.** Savić B., Zdravković N., Radanović O., Jezdimirović N., Kureljusić B., Stevancević O. 2021. A *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Choleraesuis outbreak in weaned piglets in Serbia: clinical signs, pathologic changes, and microbiologic features. *J Vet Diagn Invest.* 33(5):993-6. **10.** Savić B., Radanović O., Cvetojević Đ., Kureljušić B. 2016. *Brachyspira* spp. identified in growing pigs in Serbia. Proceedings of Second International Symposium of Veterinary Medicine – ISVM 2016, June 22-24. 2016., Hotel Metropol, Belgrade, 110. **11.** Zimmerman J. Locke A., Karriker Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz, Gregory W. Stevenson (Editors), 2012. Diseases of swine, 10th Edition, April 2012, Wiley-Blackwell.

SUPKLINIČKI ENDOMETRITIS KRAVA – IZAZOV U DIJAGNOSTICI

**Milan Maletić¹, Branislav Kureljušić², Vesna Milićević²,
Nemanja Zdravković², Predrag Ivančev³, Slobodanka Vakanjac¹,
Bojan Milovanović²**

Kratak sadržaj

Supklinički endometritis (SCE) je zapaljenje materice bez vidljivih znakova oboljenja. Ubraja se u jedno od najčešćih oboljenja materice u postpartalnom periodu sa kojim se veterinari suočavaju na terenu. Supklinički endometritis se dovodi u vezu sa smanjenjem stope koncepcije nakon prvog veštačkog osemenjavanja, produženim servis periodom i posledičnim povećanjem troškova na farmi. Još uvek se vode diskusije o uzrocima koji dovode do ovog oboljenja. Pretpostavlja se da su uzroci nastanka SCE odgovor na nespecifične infekcije materice ili produženi inflamatorni odgovor koji perzistira nakon završene involucije uterusa. Visoki nivoi proinflamatornih citokina nakon teljenja mogu dovesti do prenatrženog inflamatornog odgovora, dok niski nivoi mogu umanjeti inflamatorni odgovor i dovesti do razvoja endometritisa. Takođe i metabolički disbalans, koji nastaje kao posledica neodgovarajuće pripreme krava u periodu zasušenja, dovodi do povećane prevalencije ovog oboljenja. U literaturi se dosta diskutuje o graničnom procentu polimorfonuklearnih leukocita (PMN) u bojenom razmazu sadržaja uterusa, iznad kog nastaju negativni efekti na reproduktivnu sposobnost krava. Zbog toga postoji i više graničnih vrednosti (engl. cut off) na osnovu kojih se mikroskopski preparati procenjuju kao SCE pozitivni i SCE negativni. Prevalencija zavisi od vremena uzorkovanja, primenjene granične vrednosti, metode uzorkovanja i zdravstvenog stanja zapata. U studijama koje se bave ovom problematikom zabeležena je prevalencija od 6-90 procenata. "Skrivena" priroda SCE iziskuje primenu dodatnih tehnika (pored rutinskih) kako bi se postavila dijagnoza. Neke od tehnika koje se koriste za dijagnostiku SCE su ultrazvučni pregled, biopsija uterusa i citološke tehnike. Najpouzdaniji rezultati u dijagnostici ovog oboljenja su dobijeni citološkim metodama. U citološke metode se ubrajaju Cytobrush metoda i njene modifikacije, kao i lavaža materice koje daju dobar uvid u zdravlje materice sa minimalnom invazivnošću. Tehnika izvođenja ovih metoda kao i njihove prednosti i mane su osnovni cilj ovog rada.

Ključne reči: dijagnostika, reproduktivna sposobnost, supklinički endometritis

¹Dr sci. vet. med. Milan Maletić, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Slobodanka Vakanjac, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Branislav Kureljušić, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Vesna Milićević, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Nemanja Zdravković, naučni saradnik; dr vet. Bojan Milovanović, stručni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

³Spec. dr vet. Predrag Ivančev, Al Dahra doo, Beograd, Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: maletic@vet.bg.ac.rs

UVOD

Poboljšanje uslova držanja, selekcije i ishrane krava je poslednje decenije dovelo do velikih promena u načinu koncipiranja i sprovođenja mlečne proizvodnje. Prateći globalne trendove došlo je do povećanja broja mini farmi gde se krave drže u vezanom sistemu. Prelazak na ovaj način držanja gde postoje veća stada u malom prostoru i intezivnija ishrana koju je potrebno optimizovati prema fazi laktacije imao je za posledicu smanjenje reproduktivne efikasnosti. Proizvodnja mleka i početak nove laktacije (izuzev indukovane laktacije) zavise od sposobnosti krava da koncipiraju. Produžavanjem servis perioda dolazi do smanjene efikasnosti ukupne proizvodnje na farmi. Stoga, pravilno praćenje toka puerperijuma i odgovarajuća priprema materice za graviditet predstavljaju imperativ. *De facto*, krave sa većim proizvodnim mogućnostima imaju i veću incidencu reproduktivnih problema (Tenhagen i sar., 2003). Ovi problemi se ogledaju u puerperalnim oboljenjima materice, potrebi za kontrolom estralnog ciklusa, smanjenoj koncepciji i ranom embrionalnom mortalitetu. Puerperalna oboljenja materice koja uključuju metritise i endometritise predstavljaju jedan od glavnih faktora koji utiču na reproduktivnu sposobnost krava. Metritisi i endometritisi su povezani sa odlaganjem početka ovarijalne aktivnosti nakon teljenja, produženim servis periodom, smanjenjem stope koncepcije nakon prvog veštačkog osemenjavanja (VO) i povećanjem broja isključenih krava iz zapata (Priest i sar., 2013). Obolele krave se lako identifikuju kada ispolje kliničke znakove koji ukazuju na bolest materice. Iako simptomi sistemskog oboljenja često izostaju, gnojni ili mukopurulentni vaginalni iscedak predstavljaju relativno siguran znak da su ova oboljenja prisutna. Zbog toga klinički metritis i endometritis retko ostaju nedijagnostikovani. Problem sa kojim se veterinari često suočavaju u ovom periodu je supkliničko oboljenje materice. Specifičnost ovog oboljenja se ogleda u zapaljenju materice bez vidljivih znakova bolesti. Uobičajenim kliničkim pregledom reproduktivnih organa nije moguće dijagnostikovati supklinički endometritis (SCE) tako da pri redovnoj kontroli zdravstvenog statusa zapata on prolazi neopaženo (Maletić i sar., 2022). Za dijagnostiku ovog oboljenja potrebne su specijalističke i laboratorijske metode koje se često koriste poslednjih godina. Cilj ovog rada je da se sagledaju dosadašnja saznanja povezana sa ovom bolešću i načinima za njenu dijagnostiku.

SUPKLINIČKI ENDOMETRITISI

Postporođajna oboljenja materice spadaju među najčešće probleme sa kojima se veterinari suočavaju u svakodnevnom radu na terenu. U ova oboljenja ubrajaju se puerperalni metritisi, klinički metritisi, klinički endometritisi i supklinički endometritisi sa prevalencijom od 2,8, 25, 29 i 26 procenata, tim redom (Vallejo -Timaran i sar., 2021). Sve u svemu, prevalenca postporođajnih oboljenja materice tokom prvih 60 dana nakon teljenja dobijena u ovom istraživanju je bila 51,2 procenata. Pored klinički vidljivih oboljenja, supklinički endometritis predstavlja oboljenje u literaturi poznato i kao "citološki endometritis" i definiše

se kao zapaljenje endometrijuma bez prisustva sistemskih i kliničkih znakova bolesti (Barlund i sar., 2008). Jedini znak da postoji upala je povećan broj polimorfonuklearnih leukocita (PMN) u citološkom razmazu dobijenom uzimanjem brisa iz uterusu 21. dana posle teljenja. U jednom istraživanju koje je obuhvatilo 228 klinički zdravih krava 21-33. dana nakon teljenja sprovedenom od strane Kasimanickam i sar. (2004), ustanovljeno je da naočigled zdrave krave imaju supklinički endometritis. Pod zdravim kravama su podrazumevali životinje koje nemaju patološki iscedak iz vagine. Ovo pionirsko istraživanje je dovelo do daljeg istraživanja i sveobuhvatnog pristupa ovoj bolesti.

Pored aktivne upale materice koja nastaje kao normalan fiziološki proces u toku involucije nakon porođaja, dolazi i do kontaminacije materice tokom porođaja. Mikroorganizmi mogu direktno dovesti do oštećenja endometrijuma, ali takođe i indirektno proizvodnjom toksina (Williams i sar., 2007). Poznato je da bakterijski endotoksini imaju brojne neželjene efekte na reproduktivnu sposobnost krava koji se ogledaju u mogućem uticaju na lučenje estradiola i progesterona, razvoj folikula, a posledično i na razvoj žutog tela (Shimitzu i sar., 2012).

Najčešće izolovani patogeni iz uterusu krava sa metritisom i kliničkim endometritisom su *E. coli*, *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum* i *Prevotella* spp. (Sheldon i sar., 2006). Nasuprot tome, studija Madoza i sar. (2014) je dokazala da se bakterijske kulture izolovane iz materice krava sa SCE ne razlikuju od onih izolovanih iz uterusu zdravih krava. Rezultati ove dve studije sugerišu da uobičajeni patogeni koji su izolovani iz materice krava sa metritisom i kliničkim endometritisom nemaju značajnu ulogu u patogenezi nastanka SCE. Pretpostavlja se da SCE nastaje kao odgovor na nespecifične infekcije materice (Gärtner i sar., 2015) ili na produženi inflamatorni proces koji perzistira nakon eliminacije bakterija. Usled produženog inflamatornog procesa dolazi do povećane produkcije proinflamatornih medijatora i produžavanja perioda oporavka materice. Visoki nivoi proinflamatornih citokina, tokom prve nedelje nakon teljenja, mogu dovesti do prenatlaženog inflamatornog odgovora, dok niski nivoi mogu umanjiti inflamatorni odgovor i dovesti do razvoja endometritisa (Brodzki i sar., 2015). Sa druge strane određeni citokini imaju ulogu u kontroli rasta folikula, ovulaciji, formiranju žutog tela i regresiji žutog tela (Field i sar., 2013). Iz tih razloga, citokini nastali tokom SCE mogu dovesti do disbalansa ovog fiziološkog mehanizma i narušiti normalan ovarijalni ciklus. Ovo za posledicu može imati smanjenu mogućnost ili nemogućnost koncepcije.

Metabolički disbalans predstavlja još jedan faktor koji dovodi do povećane prevalencije SCE. Loša telesna kondicija i visoke koncentracije neesterifikovanih masnih kiselina takođe predstavljaju predisponirajuće činioce za nastanak ovog oboljenja (Douglas i sar., 2007). Povišeni nivoi azota, uree i smanjena koncentracija glukoze u krvi mogu pogodovati razvoju SCE (Senosy i sar., 2012). Povišena učestalost SCE je uočena i kod jedinki sa oštećenjem jetre (Priest i sar., 2013). Takođe je dokazano i da smanjena koncentracija serumskog kalcijuma dovodi do povećane incidence SCE (Vallejo-Timaran i sar., 2021). Shodno tome, potrebno je

obratiti naročitu pažnju i pravilno uvesti krave u zasušenje, a nakon toga izbalansirati obroke shodno fazi laktacije.

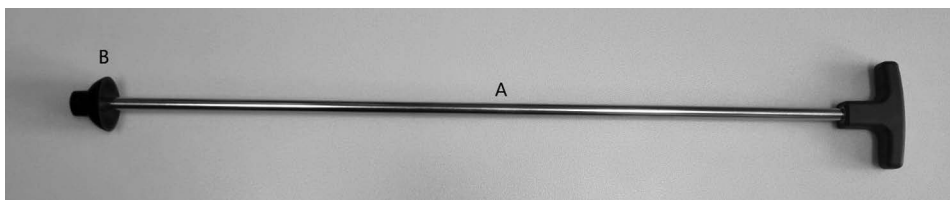
Prevalencija SCE dobijena u dosadašnjim studijama se kreće od 6-90 procenata (Lincke i sar, 2007). Razlog ovog širokog raspona u prevalenciji su brojni faktori koji utiču na procenu mikroskopskih preparata. Prevalencija zavisi od zdravstvenog statusa zapata, vremena uzorkovanja, granične vrednosti i metode koja je korišćena. (Madoz i sar., 2014).

DIJAGNOSTIKA

Krave sa supkliničkim endometritisom ne pokazuju vidljive znakove bolesti što njih čini "skrivenim" oboljenjima. Shodno tome, pored rutinskih, potrebne su neke dodatne metode za njihovu dijagnostiku. Do danas je razvijeno nekoliko metoda za detekciju ovog oboljenja ali još ni jedna nije uspostavljena kao zlatni standard.

Metricheck®

Metricheck® predstavlja instrument za procenu kvaliteta vaginalne sluzi. Instrument se sastoji od baze u obliku slova "T" koji na svom kraju ima plastični kolektor sluzi u obliku polukružne posude (slika 1). Pre uzorkovanja sadržaja iz vagine, vulvu je potrebno očistiti čistim ubrusom, a instrument dezinfikovati alkoholom. Uzorkovanje se vrši uvođenjem instrumenta kroz *labia vulvae* duboko do cerviksa, nakon čega je ručicu uređaja potrebno podignuti blago ka dorzalnoj komisuri da bi kolektor pokupio sadržaj sa ventralnog zida vagine pri izvlačenju instrumenta. Sluz se procenjuje na osnovu boje, mirisa, konzistencije, prisustva gnoja i patološkog sadržaja. Gradacija se vrši ocenama od 0-3, gde je: 0 – čista prozirna sluz; 1 – sluz sa krpicama gnoja; 2 – mukopurulentni iscedak; 3– gnojni/smrđljivi/truležni iscedak (Pleticha i sar., 2009). Ocene od 1 do 3, 21. dana nakon teljenja, se smatraju kliničkim endometritisom. Procena kvaliteta vaginalne sluzi se može vršiti i manuelnim vaginalnim pregledom i vaginoskopom, ali se ovo u literaturi navodi kao manje pouzdano. U istraživanju McDougall i sar. (2007), gde je vršeno uporedno ispitivanje Metricheck®, manuelnog vaginalnog pregleda i vaginospoka najbolji rezultati su dobijeni sa upotrebom Metricheck® što ovu metodu čini relativno pouzdanom, ali isto tako jeftinom i lakom za korišćenje.



Slika 1. Metricheck® instrument: (A) baza, (B) kolektor vaginalne sluzi.

Ultrazvučni pregled

Ultrazvučni pregled je pomoćna metoda kojom se može proceniti stanje materice na osnovu prisustva sadržaja, zadebljanja zida materice, veličine cerviksa i materičnog roga u kome se odigrao prethodni graviditet. Dobri rezultati u detekciji SCE su dobijeni procenom zadebljanja zida materice i prisustva sadržaja u njoj (Kasimanicham i sar., 2004). Međutim, ova metoda nije stoprocentno pouzdana zbog toga što u nekim fiziološkim stanjima, kao što je to estrus, takođe dolazi do zadebljanja materičnog zida. Korišćenjem ultrazvuka najbolji rezultati su dobijeni u proceni prisustva sadržaja, veličine cerviksa i veličine roga u kome se odvijao graviditet (Meira i sar., 2012). U studiji Kasimanichama i sar. (2004) veličina cerviksa i roga u kome se odvijao graviditet je podeljena na malu (<3,5 cm), srednju (3,5 - 5,0 cm) i veliku (>5,0 cm). Kod merenja veličine ova dva parametra radi procene endometritisa kao *cut off* (granična vrednost) je uzeta vrednost >5 cm koja je ranije ustanovljena u studiji koju su uradili Gier i Marion (1968).

Biopsija

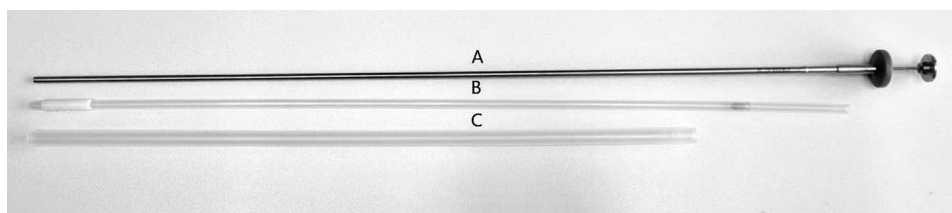
Biopsija je još jedna metoda za dijagnostiku SCE, a uzorci endometrijuma se dobijaju upotrebom instrumenta za biopsiju koji se uvodi kroz cerviks do jednog od rogova materice. Nakon uvođenja u uterus, "usta" biopsera koja imaju narezuckane ivice se zatvaraju, rotiraju za 90 stepeni i u zavisnosti od instrumenta, otkida se uzorak veličine 0,6 x 0,4 cm. Zatim se biopser sa uzorkom retrahuje napolje. Uzorak se skladišti u transportnom medijumu (fiksativ- 10% formalin). U laboratoriji se uzorak dalje dehidrira, prosvetljava, kalupi i priprema se histološki preparat. Pripremljeni mikroskopski preparat se nakon toga boji nekom od histoloških boja i posmatra pod mikroskopom na uveličanju od 400 × (Madoz i sar., 2014). Prednost biopsije je u tome što se uzorak sastoji od svih slojeva endometrijuma za razliku od citoloških uzoraka, što omogućava uvid u detaljnu histološku građu. Međutim, u toku estrusa postoji problem korišćenja ove metode zbog fiziološke infiltracije endometrijuma ćelijama imunskog sistema koja može dati pogrešnu sliku o stanju endometrijuma (Madoz i sar., 2013).

Citološke tehnike

Za razliku od biopsije gde se u uzorku nalaze dublji slojevi endometrijuma, kod korišćenja citoloških tehnika se za uzorak uzimaju samo površinski slojevi endometrijuma. Tako se isključuje mogućnost detekcije ćelija upale koje se uobičajeno nalaze kod životinja u estrusu, čineći biopsiju pouzdanijom metodom (Madoz i sar., 2014). U citološke tehnike se ubrajaju *Cytobrush* (*Cytoprint/Cytotape*) metoda i lavaža uterusa.

Postoji više modifikacija ove tehnike u zavisnosti od izgleda katetera i materijala od kog je napravljena četkica za uzorkovanje. Citološke tehnike su minimalno invazivne metode, koje ne utiču negativno na stopu koncepcije, čak i ukoliko se izvode nekoliko časova nakon VO (Kaufmann i sar., 2009). *Cytobrush*

(*Cytoprint/Cytotape*) predstavlja bimanuelnu metodu koja se izvodi uz pomoć sterilnog plastičnog katetera sa četkicom (ili trakom) na vrhu, koji ima zaštitnu navlaku (slika 2). Kateter se navlači na pistolet za VO i uvodi u matericu uz transrektalno navođenje. U materici se spoljna navlaka povlači unazad, uzima se bris sa dorzalnog zida materice rotiranjem pistoleta u smeru kazaljki na satu za 360 stepeni. Nakon toga se spoljna navlaka prevlači preko četkice da bi se sprečila kontaminacija pri izvlačenju katetera. Rotiranjem četkice preko mikroskopske pločice, počevši od jednog kraja pločice ka drugom, dobija se citološki preparat, a potom se pločica suši na vazduhu i nakon toga boji. Još jedna prednost ove tehnike je i što se nakon nanošenja na mikroskopsku pločicu četkica može koristiti za bakteriološka i molekularna ispitivanja.



Slika 2. Instrumenti za izvođenje *Cytoprint* metode: **(A)** pistolet, **(B)** *Cytoprint* kateter, **(C)** zaštitna navlaka.

Druga tehnika za uzorkovanje ćelija endometrijuma je lavaža materice (*low-volume uterus flushing*) (Gilbert i sar., 2005). Za izvođenje ove tehnike se koristi plastični kateter sa brizgalicom u kojoj je 20 ml sterilnog fiziološkog rastvora. Ovo je takođe bimanuelna tehnika i kateter se uvodi u matericu uz pomoć transrektalnog navođenja rukom. U uterus se aplikuje fiziološki rastvor, a zatim se materica nežno masira nekoliko sekundi. Nakon masaže, fiziološki rastvor se zajedno sa sadržajem materice aspirira putem istog katetera u brizgalicu. Aspirirana tečnost se vorteksira i centrifugira nakon čega se precipitat (talog) uzima i razmazuje na mikroskopsku pločicu, fiksira i boji.

U odnosu na lavažu materice *Cytobrush* metoda ima nekih prednosti. One se ogledaju u bržem i lakšem izvođenju, manjem strukturnom oštećenju ćelija, manjoj iritaciji materice i manjoj kontaminaciji eritrocitima. Jedina mana *Cytobrush* metode je što su ćelije koje su prikupljene ovom metodom uzete sa jedne tačke materice dok kod lavaže postoji zbirni i reprezentativni uzorak iz cele materice (Kasimanickam i sar., 2005).

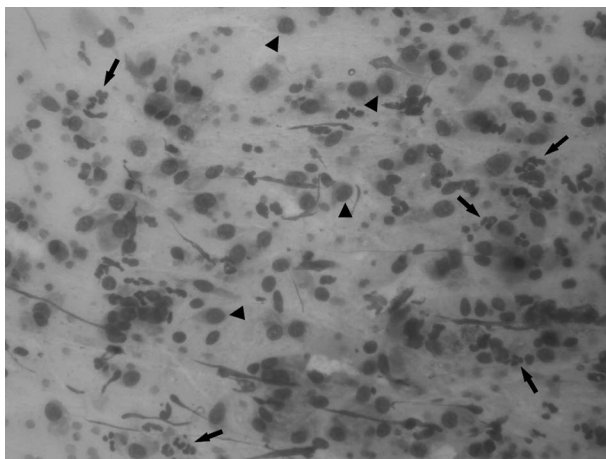
Citološke tehnike daju dobar uvid u stanje materice sa minimalnom invazivnošću. Trenutno se ne smatraju metodama za rutinsku primenu na pojedinačnim životinjama zbog procedura uzorkovanja, pripreme uzoraka i procene preparata koje dugo traju. Međutim, mogu se primeniti kao metoda za praćenje reproduktivne sposobnosti krava tokom kontrole zdravstvenog statusa farme ili zapata, proceni rizika od subfertiliteta, kao i u naučnoistraživačke svrhe.

Bojenje citoloških preparata

Nakon fiksiranja preparata na vazduhu, pristupa se njihovom bojenju. Metode bojenja, koje su u rutinskoj upotrebi, se izvode lako i brzo. One se zasnivaju na modifikovanom Wright-Giemsa bojenju kao što su Diff-Quick®, Tincion 15®, Haema Quick® ili 43 Hemacolor® (Pascottini i sar., 2015).

Mikroskopski pregled preparata

Procenat PMN se računa određivanjem odnosa PMN i epitelnih ćelija pod svetlosnim mikroskopom na uveličanju od 400× (Madoz i sar., 2014) (slika 3). U pojedinim studijama se odnos se računa brojanjem 100 (Kasimanickam i sar., 2005), 200 (Madoz i sar., 2014), 300 ćelija (Selah i sar., 2017) ili brojanjem 100-200 ćelija u 20 vidnih polja (Ahmadi i sar., 2005). Mikroskopska procena preparata je veoma pouzdana i ponovljiva metoda koja omogućava određivanje proporcije PMN i epitelnih ćelija. Međutim, u zavisnosti od primenjene metodologije, ovom tehnikom se mogu dobiti različiti rezultati. Pored toga, ona predstavlja subjektivnu metodu što može biti uzrok različitih rezultata u određivanju prevalencije SCE.

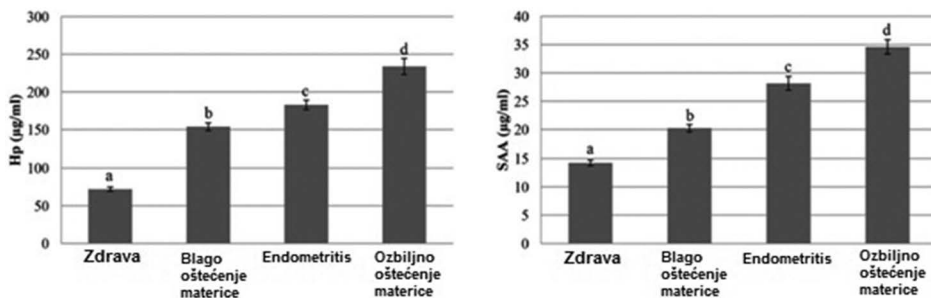


Slika 3. Endometrijalna citologija: (a) polimorfonuklearne ćelije (cela strelica), (b) endotelne ćelije (glava strelice), Cytoprint tehnika, MGG Quick Stain®, ×400.

Biomarkeri u dijagnostici supkliničkih endometritisa

Mnoge studije u dijagnostici SCE posvećuju sve veću pažnju biomarkerima, pre svega proteinima akutne faze. Dokazano je da se nivoi haptoglobina (Hp), serum amiloida A (SAA) i ceruloplazmina povećavaju kod ovog oboljenja čineći ih značajnim u dijagnostici (Chan i sar., 2014, Biswal i sar., 2014, Brodzki i sar., 2015.). Nivoi Hp kod zdravih krava se kreću između 22-140 mg/ml, dok se u stanjima zapaljenja materice nivoi ovog proteina povećavaju i do 9 puta. Nivoi SAA

se kod zdravih krava kreću između 16-22 mg/ml, a pri upali materice dostižu koncentraciju od 35-99 mg/ml (Biswal i sar., 2014). U studiji Musal-a i sar. (2004) se navodi da su krave sa endometritisom imale značajno više koncentracije Hp i SAA nego zdrave krave i da su se nivoi ovih biomarkera povećavali kako je upala postajala teža (slika 4).



Slika 4. Nivoi proteina akutne faze u odnosu na stepen oštećenja materice (modifikovano prema Kaya i sar., 2016).

ZAKLJUČAK

Supklinički endometritisi nastaju usled poremećaja regulatornih mehanizama zapaljenja i metaboličkog disbalansa. Oni predstavljaju "skrivena" oboljenja materice koja se ne mogu dijagnostikovati redovnim rutinskim pregledom. Citološke tehnike su metode koje su dale najpouzdanije rezultate u dijagnostici ovog oboljenja. Pored citoloških metoda, sve veća paznja se posvećuje i biomarkerima. Do danas, u ovoj oblasti, ni jedna metoda dijagnostike nije postavljena kao zlatni standard.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Ahmadi M, Tafti A, Nazifi S, 2005, The comparative evaluation of uterine and cervical mucosa cytology with endometrial histopathology in cows, *Comp Clin Pathol*, 14, 90–94. 2. Annekathrin L and Marc W, 2007, Subclinical endometritis in dairy cattle and its effect on fertility- a review of recent publications, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 120, 5-6, 245–50. 3. Barlund C, Carruthers T, Waldner C, 2008, A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle, *Theriogenology*, 69, 6, 714–23. 4. Biswal S, Das S, Balasubramanian S, Mohanty D, Sethy K, Dasgupta M, 2014, Serum amyloid A and haptoglobin levels in crossbred cows with endometritis following different therapy, *Vet World*, 7, 1066-70. 5. Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Wawron W, Marczuk J, Kurek

L, 2015, Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum, *Theriogenology*, 84, 11-18. **6.** Brodzki P, Kostro K, Brodzki A, Wawron W, Marczuk J, Kurek L, 2015, Inflammatory cytokines and acute-phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum, *Theriogenology*, 84, 11-18. **7.** Chan J, Chu C, Fung H, Chuang S, Lin Y, Chu R et al, 2004 Serum haptoglobin concentration in cattle, *J Vet Med Sci*, 66, 43-46. **8.** Douglas G, Rehage J, Beaulieu A, Bahaa A, Drackley J, 2007, Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*, 90, 2941-59. **9.** Field S, Dasgupta T, Cummings M, Orsi N, 2013, Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation, *Mol Reprod Dev*, 81, 4, 284-314. **10.** Gärtner M, Peter S, Jung M, Drillich M, Einspanier R, Gabler C, 2015, Increased mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in inflamed bovine endometrium *in vivo* as well as in endometrial epithelial cells exposed to *Bacillus pumilus in vitro*, *Reprod Fertil Dev*, 28, 982-94. **11.** Gier T, Marion G, 1968, Uterus of the cow after parturition: Involutional changes, *Am J Vet Res*, 29, 83-96. **12.** Gilbert R, Shin S, Guard C, Erb H, Frajblat M, 2005, Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows, *Theriogenology*, 64, 1879-88. **13.** Kasimanickam R, Duffield T, Foster R, 2005, A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows, *Can Vet J*, 46, 3, 255-59. **14.** Kasimanickam R, Duffield T, Foster R, Gartley C, Leslie K i sar, 2003, Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows, *Theriogenology*, 62, 9-23. **15.** Kaufmann T, Drillich M, Tenhagen B, Forderung D, Heuwieser W, 2009, Prevalence of bovine subclinical endometritis 4h after insemination and its effects on first service conception rate, *Theriogenology*, 71, 385-91. **16.** Kaya S, Merhan O, Kacar C, Colak A, Bozokluhan K, 2016, Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with endometritis, *Vet World*, 9, 10, 1056-62. **17.** Madoz L, Giuliadori M, Migliorisi A, Jaureguiberry M, de la Sota R, 2014, Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows, *J Dairy Sci*, 97, 1-7. **18.** Maletić M, Kureljušić B, Milovanović M, Vakanjac S, Ivančev P i sar, 2022, Uticaj primene selektivnih i neselektivnih inhibitora ciklooksigenaze na plodnost krava sa supkliničkim endometritisom, *Zbornik predavanja XLIII seminara za inovacije znanja veterinaru*, 58-64. **19.** Meira E, Henriques L, Sá L, Gregory L, 2012, Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows, *J Dairy Sci*, 95, 12, 6969-73. **20.** Musal B, Seyrek K, Ulutaş P, 2004, Serum sialic acid, total protein and albumin levels in cows with metritis treated with intrauterine oxytetracycline, *Uludağ Univ J Fac Vet Med*, 23, 71-75. **21.** Pascottini O, Dini P, Hostens M, Ducatelle R, Opsomer G, 2015, A novel cytologic sampling technique to diagnose subclinical endometritis and comparison of staining methods for endometrial cytology samples in dairy cows, *Theriogenology*, 84, 8, 1438-46. **22.** Pleticha S, Drillich M, Heuwieser W, 2009, Evaluation of the Metrichheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows, *J Dairy Sci*, 92, 11, 5429-35. **23.** Priest N, 2012, The Effect of a Non-steroidal Anti-Inflammatory Drug on Subclinical Endometritis in Dairy Cows and the Identification of at-Risk Cows, MSc Thesis, New Zealand: Lincoln University. **24.** Salah N i Yimer N, 2017, Cytological endometritis and its agreement with ultrasound examination in postpartum beef cows, *Vet World*, 10, 6, 605-9. **25.** Senosy W, Zain A, Abdel-Razek A, 2012, Association between energy status early postpartum and subsequent embryonic mortality in high-yielding recipient cows, *Anim Sci J*, 83, 4, 284-90. **26.** Sheldon I, Lewis G,

LeBlanc S, Gilbert R, 2006, Defining postpartum uterine disease in cattle, *Theriogenology*, 65, 1516-30. **27.** Shimizu T, Miyauchi K, Shirasuna K, Bollwein H, Magata F, Murayama C et al, 2012, Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on estradiol production in bovine granulosa cells from small and large follicles, *Toxicol in Vitro*, 26, 1134-42. **28.** Tenhagen B, Vogel C, Drillich M, Thiele G, Heuwieser W, 2003, Influence of stage of lactation and milk production on conception rates after timed artificial insemination following Ovsynch, *Theriogenology*, 60, 8, 1527-37. **29.** Vallejo - Timaran D, Reyes J, Gilbert R, Lefebvre R, Palacio-Baena L, Maldonado-Estrada J, 2021, Incidence, clinical patterns, and risk factors of postpartum uterine diseases in dairy cows from high-altitude tropical herds, *J Dairy Sci*, 104, 8, 9016-26. **30.** Williams E, Fischer D, Noakes D, England G, Rycroft A, Dobson H, i sar., 2007, The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow, *Theriogenology*, 68, 549-59.

SUBCLINICAL ENDOMETRITIS IN COWS – A CHALLENGE IN DIAGNOSIS

***Milan Maletić, Branislav Kureljušić, Vesna Milićević,
Nemanja Zdravković, Predrag Ivančev, Slobodanka Vakanjac,
Bojan Milovanović***

Summary

Subclinical endometritis (SCE) is an inflammation of the uterus without visible signs of the disease. Subclinical endometritis is one of the most common diseases of the uterus in the postpartum period that veterinarians face. Subclinical endometritis has been linked to a reduced conception rate after the first insemination, an extended service period and other negative effect on reproductive performances that lead to increase in farm costs. There is a discussion among the authors about the causes that leads to this disease. It is assumed that the causes of SCE are a inflammatory response to non-specific uterine infections or a prolonged inflammatory response that persists after the completion of uterine involution. High levels of proinflammatory cytokines after calving can lead to an excess inflammatory response, while low levels can reduce the inflammatory response and lead to the development of endometritis. Also, the metabolic imbalance that occurs as a result of inadequate management of cows during the dry period leads to an increased prevalence of this disease. There is a lot of discussion about the percentage of PMN that leads to negative effects on the reproductive performance, so there are several cutoff values based on which microscopic specimens are evaluated as SCE positive and SCE negative. The prevalence of SCE depends on the time of sampling, cutoff values, sampling methods and the health status of the drove. In literature, prevalence of SCE, 6-90% has been reported. The "hidden" nature of SCE requires additional techniques in addition to routine to diagnose. Some of the techniques used to diagnose SCE are ultrasound, biopsy and cytological techniques. The most reliable results in the diagnosis of SCE were obtained by cytological methods. Cytological methods include the Cytobrush method and its modifications, as well as uterine lavage that provide good insight into uterine health with minimal invasiveness. The technique

of performing these methods as well as their advantages and disadvantages will be the main goal of this paper.

Key words: *diagnosis, reproductive performances, subclinical endometritis.*

IDENTIFIKACIJA POTPISA SELEKCIJE PROIZVODNIH I REPRODUKTIVNIH OSOBINA I STEPENA GENOMSKOG INBRIDINGA U POPULACIJI SRPSKIH HOLŠTAJN-FRIZIJSKIH KRAVA

**Marko Ristanić¹, Minja Zorc², Uroš Glavinić¹, Jovan Blagojević¹,
Milan Maletić¹, Peter Dovč², Zoran Stanimirović¹**

Kratka sadržaj

Kontrola inbridinga u populacijama farmskih životinja je veoma značajna, zbog toga što povećana stopa srodstva među životinjama dovodi do brzog gubitka genetske varijabilnosti i do štetnih fenotipskih efekata povezanih sa inbriding depresijom. Identifikovanje nedavnih potpisa pozitivne selekcije kod domaćih životinja može pružiti informacije o genomskim regionima koji su pod uticajem veštačke i prirodne selekcije i na taj način pomoći u identifikaciji korisnih mutacija i osnovnih bioloških puteva za ekonomski važne osobine. U našem istraživanju, upotrebom SNP čipa Axiom Bovine BovMDv3 sa 63 648 predefinisanih lokusa od interesa u genomu *Bos taurus*, sproveli smo identifikaciju ROH segmenata, procenjivanje stepena genomskog inbridinga (F_{ROH}), kao i identifikaciju ROH ostrva za otkrivanje regija koja su pod pritiskom selekcije u populaciji od 334 Holštajn-frizijskih (HF) krava. Većina otkrivenih ROH je bila u kategoriji dužine od 1 do 2 Mbp. Ukupna dužina svih segmenata ROH po životinji iznosi 197,92 Mbp, pri čemu je kod životinje sa najvećom ukupnom dužinom ROH (433,37 Mbp), 17 procenata autozoma prekriveno ROH. Vrednost genomskog inbridinga (F_{ROH}) kod te životinje iznosi 0,173, a kod najmanje inbridirane životinje 0,005. Genomski inbriding u istraživanoj populaciji u proseku iznosi 0,079. ROH ostrva smo identifikovali na hromozomima 1, 7, 10, 16, 22 i 26. Na hromozomu BTA1 uočena je najveća stopa ROH (45 procenata životinja) i to na markerima AX-106742409 (rs41578805), AX-106740136 (rs109562914), AX-106719581 (rs41603780), AX-185115133 (rs523828967) i AX-124379394 (rs110792335). Naši rezultati ukazuju na postojanje ROH ostrva na BTA1 veličine 2 Mbp (od 83 do 85 Mbp). Kod 45 procenata životinja iz ispitivane populacije javljaju se potpisi selekcije u vidu gena: PARL, YEATS2, KLHL24. Rezultati analize ROH segmenata ukazuju na nizak nivo nedavnog i ukupnog genomskog inbridinga u ispitanjoj populaciji HF goveda. Utvrđena je povezanost između detektovanih ROH ostrva i

¹Dr sci. vet. med, Marko Ristanić, asistent; dr sci. vet. med, Uroš Glavinić, docent; dr vet. Jovan Blagojević, istraživač pripravnik; dr sci. vet. med, Milan Maletić, vanredni profesor; dr Zoran Stanimirović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr Minja Zorc, docent; dr Peter Dovč, redovni profesor, Univerzitet u Ljubljani, Biotehnički fakultet, Katedra za stočarstvo, Ljubljana, R. Slovenija

*e-mail autora za korespondenciju: mristanić@vet.bg.ac.rs

proizvodnih i reproduktivnih karakteristika mlečnih grla, ali i regija u genomu pod pristiskom selekcije na druge ekonomski važne osobine goveda.

Ključne reči: F_{ROI} Holštajn-frizijska goveda, potpis selekcije, ROH, ROH ostrva, SNP čip

UVOD

Identifikacija molekularnih markera koji imaju ekonomski značaj kao i primena selekcije pomoću markera (*Marker Assisted Selection* - MAS) omogućena je, u poslednjih 30 godina, razvojem molekularne genetike. Prema tome, MAS je poboljšao efikasnost odgajivačkih programa kroz praćenje malog broja genetskih markera koji se koriste u genetičkim istraživanjima, što je omogućilo efikasniju selekciju (Zimin et al. 2009). MAS je postao značajan alat u selekciji poželjnih osobina kod domaćih životinja. Međutim, njegova primena i upotreba je prvobitno bila ograničena na mali broj markera i stoga nije pružila očekivana poboljšanja odgajivačkih programa (Dekkers et al. 2004). Prvobitni pristup za otkrivanje genetskih varijacija za ekonomski važne osobine na nivou celog genoma bio je mapiranje lokusa kvantitativnih osobina (*Quantitative Trait Loc-QTL*). Do danas je otkriveno i objavljeno više hiljada QTL za veliki broj osobina (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/>). Međutim, većina ovih prijavljenih lokusa otkrivena je pomoću mikrosatelitskih markera niske rezolucije (Schreiweis et al. 2005; Soller et al. 2006). Upravo iz tog razloga je, na osnovu informacija dobijenih analizama mikrosatelita, teško otkriti gene za osobine od interesa. Razvojem istraživanja u ovoj oblasti osmišljena je nova tehnologija genotipizacije markera visoke gustine, kako bi se simultano koristile informacije iz velikog broja molekularnih markera. Genom domaćeg govečeta (*Bos taurus*) je u potpunosti mapiran 2009. godine, pa je tako ova vrsta postala jedna od prvih farmskih životinja sa mapiranim genomom ukupne dužine od približno 2,8 milijardi bp (Zimin et al. 2009). Ovo otkriće molekularne genetike je omogućilo drugačiji, moderniji pristup genotipizaciji – SNP čip analizu. SNP su okupirali pažnju istraživača poslednjih godina, tako što su postali sve popularnije sredstvo u izučavanju genoma farmskih životinja, a naročito goveda (Ristanic et al. 2020). Poznate kompanije Affymetrix, Illumina i Neogen/GeneSeek su razvile više SNP čip panela namenjenih analizama kod goveda, uključujući SNP panele niske gustine (3K, 7K, 15K, 25K), srednje gustine (50K SNP) i SNP panele visoke gustine (150K, 250K, 650K, 800K). Raspoloživost velikog broja poznatih SNP i SNP čip analiza, omogućila je genetička istraživanja, kao što su: mapiranje genetskih bolesti, GWAS i genomski selekcija (Murgiano et al. 2014; Tiezzi et al. 2015; Brown et al. 2016; Boison et al. 2017). Važan faktor u održivosti selektiranih populacija mlečnih goveda predstavlja kontrola stope inbridinga i održavanje genetskog diverziteta. Za procenu stepena inbridinga, u ranijem periodu su korišćeni koeficijenti inbridinga na osnovu analize pedigreea (Luo, 1992). Pojavom savremenih metoda genotipizacije, došlo je do porasta interesovanja za korišćenje genomskih informacija u cilju preciznije procene koeficijenata inbridinga (VanRaden, 2008). Istraživanja drugih autora ukazuju na to

da karakterizacija inbridinga na osnovu dugačkih nizova homozigotnih genotipova (*Runs of Homozygosity*–ROH) predstavlja precizniju metodu merenja individualne autozigotnosti u odnosu na procenu inbridinga zasnovanu na pedigreu (Purfield et al. 2012; Ferenčaković et al. 2013a; Ferenčaković et al. 2013b, Ristanic et al. 2022). Naime, ROH osigurava bolju procenu autozigotnosti na nivou genoma i omogućava detekciju specifičnih regiona gena nasleđenih od predaka (*Gene Identity By Descent* – IBD). Analize ROH regiona mogu se koristiti prilikom pravljenja odgajivačkih planova u cilju smanjenja nepovoljnih efekata inbridinga. U nekoliko studija je ispitivana povezanost ROH sa nepovoljnim varijantama gena kod farmških životinja (Zhang et al. 2015a; Zhang et al. 2015b). Potpisi prirodne i veštačke selekcije „utisnuti“ na genomu, mogu se pratiti unazad i učiniti razumljivijim evolutivne procese koji su oblikovali genom (Rothhammer et al. 2013; Gouveia et al. 2014). Najveći značaj u razumevanju bioloških mehanizama koji leže u osnovi fenotipskih razlika uočenih između različitih vrsta farmških životinja, a koje imaju različitu namenu i koji su pod uticajem različitih uslova životne sredine da je utvrđivanje gena i genomskih regiona koji su pod uticajem selekcije (Rothhammer et al. 2013).

Cilj ovog istraživanja je bio analiza povezanosti pojedinih SNP sa stepenom inbridinga i potpisima selekcije koji se odnose na ispoljavanje proizvodnih i reproduktivnih osobina kod srpskih Holštajn-frizijskih goveda.

MATERIJAL I METODE

Uzorci i genotipizacija

Nakon ekstrakcije DNK od 334 krave HF rase, u saradnji sa IAEA i njihovom Laboratorijom za zaštitu zdravlja životinja i produkciju (Animal Production and Health Laboratory, International Atomic Energy Agency - IAEA, Seibersdorf, Vienna, Austria), na istim uzorcima je izvršena genotipizacija životinja pomoću SNP čipa Axiom Bovine BovMDv3 (ThermoFisher Scientific, USA) sa 63 648 predefinisanih lokusa od interesa u genomu *Bos taurus*. Analize su sprovedene prema ustaljenom protokolu navedene laboratorije.

Provera kvaliteta SNP čip podataka

Provera kvaliteta SNP čip podataka je izvršena pomoću softvera SNP & Variation Suite v 8.9.1 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT). Uzorci sa stopom uspešnosti genotipizacije $\leq 0,90$ su uklonjeni. Dodatno, markeri su uklonjeni ako je stopa uspešnosti genotipizacije iznosila $< 0,95$, ako su imali > 2 alela ili ako je frekvencija manje zastupljenog alela (*Minor allele frequency*– MAF) bila $< 0,01$. Podaci su zatim filtrirani da bi se uklonili markeri koji su bili u neravnoteži veze (*Linkage disequilibrium*– LD) jedan sa drugim, a ostavljajući određene markere da predstavljaju grupe koje su međusobno povezane. Ovim postupkom je ostavljeno 29 503 od 63 648 markera kod 307 životinja. Prečišćavanje MAF i LD je preskočeno za analizu ROH segmenata, te je ostalo 52 934 markera kod 307 ži-

votinju. U set podataka za analizu ROH (52 934 markera) nisu uključeni markeri sa polnih hromozoma.

Identifikacija ROH segmenata

Segmenti ROH su identifikovali korišćenjem SNP & Variation Suite v8.9.1 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT) softvera. ROH je definisan kao 25 ili više uzastopnih homozigotnih markera na segmentu minimalne dužine 1 000 kilo baznih parova (Kbp). Heterozigotni markeri nisu bili dozvoljeni i nije bilo više od pet neočitanih SNP. Algoritam softvera, kroz svaki hromozom za svaki mogući segment, preispituje ispunjavanje uslova, postavljenih pri definiciji ROH. Svaki ROH je zatim klasifikovan na osnovu njegove fizičke dužine.

Genomski koeficijenti inbridinga (F_{ROH})

Genomski koeficijent inbridinga F_{ROH} (McQuillan et al. 2008) je za svaku životinju izračunavan kao proporcija autozoma u ROH, prema formuli:

$$F_{ROH} = \frac{\sum L_{ROH}}{L_{Autosom}}$$

gde je L_{ROH} suma dužina svih segmenata ROH pojedine životinje, a $L_{autosom}$ dužina autozomalnog genoma ($L_{autosom}$ *Bos taurus* postavljen je na 2 512 082 506 bp). Sve genomske koordinate u analizi SNP čip podataka odnose se na verziju referentne sekvence kompletnog genoma *Bos taurus* UMD3.1.1. (genom *Bos taurus* https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000003055.6/).

F_{ROH} je izračunat uključujući sve klase ROH segmenata (1 do 2 Mbp, 2 do 4 Mbp, 4 do 8 Mbp, 8 do 16 Mbp, i >16 Mbp). Dodavanjem ROH segmenta pojedinih klasa, izračunali smo i $F_{ROH1-2 Mb}$, $F_{ROH2-4 Mb}$, $F_{ROH4-8 Mb}$, $F_{ROH8-16 Mb}$ i $F_{ROH > 16 Mb}$.

Detekcija ROH ostrva

Procenjena je učestalost SNP lokusa u ROH (%) i zatim je ucrtana u odnosu na položaj SNP duž autozoma pomoću dijagrama Manhattan plot korišćenjem biblioteke *Manhattan* za statistički softver R (R Core Team, 2013). Minimalni prag za detekciju ROH ostrva (*ROHisland*) je postavljen na 30 procenata, što znači da ROH mora biti prisutan u najmanje 30 procenata populacije da bi lokus bio uključen u ROH ostrvo.

REZULTATI

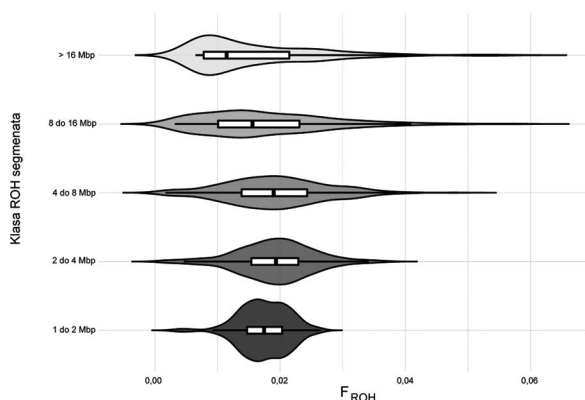
ROH

Nakon prečišćavanja SNP čip podataka, iskorišćena su 52 934 markera za identifikaciju ROH segmenata u genomima HF krava. Identifikovano je ukupno 18 549 ROH sa 60,42 ROH po životinji u rasponu od 8 do 95. ROH je klasifikovan

u pet različitih kategorija na osnovu njihove dužine: 1 do 2 Mbp, 2 do 4 Mbp, 4 do 8 Mbp, 8 do 16 i >16 Mbp. Deskriptivna statistika svake dužinske kategorije prikazana je u tabeli 1. Većina otkrivenih ROH je bila u kategoriji dužine od 1 do 2 Mbp (tabela 1). Najdužih ROH (>16 Mbp) je bilo najmanje, pri čemu kod 45 procenata životinja (n=139) nije uočen ROH u ovoj kategoriji. Prosečna dužina identifikovanih ROH je 3,28 Mbp. Najduži identifikovani ROH je bio dugačak 65,31 Mbp i nalazi se na hromozomu BTA7. Ukupna dužina svih segmenata ROH po životinji iznosi 197,92 Mbp, pri čemu je kod životinje sa najvećom ukupnom dužinom ROH (433,37 Mbp), 17 procenata autozoma prekriveno ROH. Vrednost genomskog inbridinga (F_{ROH}) kod te životinje iznosi 0,173, a kod najmanje inbridirane životinje 0,005. Genomski inbriding u istraživanoj populaciji u proseku iznosi 0,079. Za svaku dužinsku kategoriju, koeficijent inbridinga je izračunat kao proporcija autozoma svake jedinke koji je bio pokriven sa ROH iz te klase (npr. $F_{ROH>16}$) (slika 1).

Tabela 1. Dužina ROH, broj ROH i genomski inbriding (F_{ROH}) u različitim kategorijama dužina ROH po životinji

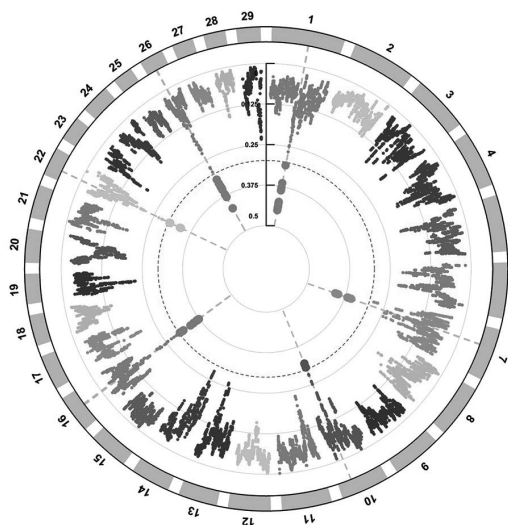
		Kategorija dužine ROH				
	Parametar	1 - 2 Mbp	2 - 4 Mbp	4 - 8 Mbp	8 - 16 Mbp	> 16 Mbp
Ukupna dužina ROH po životinji	Srednja vrednost	43,848	48,119	48,145	44,038	39,332
	Standardna devijacija	9,979	15,504	20,138	25,655	24,867
	Medijana	43,817	48,553	47,651	39,144	28,769
	Minimum	7,416	2,927	4,244	8,013	16,282
	Maksimum	66,538	93,096	119,858	144,577	141,065
Broj ROH po životinji	Srednja vrednost	30,140	17,505	8,679	3,992	1,726
	Standardna devijacija	6,723	5,488	3,550	2,286	0,933
	Medijana	30,000	18,000	8,000	4,000	1,000
	Minimum	6,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	Maksimum	45,000	35,000	21,000	12,000	5,000
Genomski inbriding F_{ROH}	Srednja vrednost	0,017	0,019	0,019	0,018	0,016
	Standardna devijacija	0,004	0,006	0,008	0,010	0,010
	Medijana	0,017	0,019	0,019	0,016	0,011
	Minimum	0,003	0,001	0,002	0,003	0,006
	Maksimum	0,026	0,037	0,048	0,058	0,056



Slika 1. Distribucija genomske inbridinga (F_{ROH}) dobijena iz različitih kategorija dužine ROH

Potpis selekcije

Da bi se ispitao efekat selekcije u populaciji HF krava, istražena je pojava segmenata ROH u genomima ispitivanih jedinki. Incidencija ROH nije bila uniformna kroz hromosome (slika 2). ROH ostrva su identifikovana na hromozomima 1, 7, 10, 16, 22 i 26. Na hromozomu 1 uočena je najveća stopa ROH (45 procenta životinja) i to na markerima AX-106742409 (rs41578805), AX-106740136 (rs109562914), AX-106719581 (rs41603780), AX-185115133 (rs523828967) i AX-124379394 (rs110792335) (slika 2). Potpisi selekcije značajni za proizvodne



Slika 2. Manhattan plot distribucije ROH ostrva na hromozomima 1, 7, 10, 16, 22 i 26. X-osa predstavlja distribuciju ROH kroz genom; Y-osa prikazuje frekvencu preklapajućih ROH koji su zajednički u ispitivanim uzorcima.

i reproduktivne karakteristike nalaze na hromozomima 10, 16, 22 i 26 i to u vidu gena *DHRS7*, *SIX6*, *NMNAT1*, *MTHFR*, *ENO1*, *BHLHE40*, *SUMF1*, *MIR146B* i *CNNM2* (tabela 2).

Tabela 2. Detektovani potpisi selekcije

Hr.	Genomska lokacija u Mbp	Životinje unutar ROH %	Geni	Prethodno objavljeni rezultati
1	83-84	44.95	<i>MAGEF1</i> , <i>MIR2284Y-3</i> , <i>EPHB3</i> , <i>LOC524771</i> , <i>THPO</i> , <i>POLR2H</i> , <i>CLCN2</i> , <i>FAM131A</i> , <i>PSMD2</i> , <i>ECE2</i> , <i>CAMK2N2</i> , <i>ALG3</i> , <i>MIR1224</i> , <i>ABCF3</i> , <i>AP2M1</i> , <i>HTR3C</i> , <i>ABCC5</i> , <i>PARL</i> , <i>MAP6D1</i>	Identifikovan potpis selekcije na genomskoj regiji 1:82 820 000-84 650 000 u lokalnoj populaciji goveda iz severne Afrike (Ben-Jemaa et al. 2020)
				Gen <i>ECE2</i> povezali su sa osetljivošću na respiratorne bolesti kod goveda rasa šarole, hereford, crveni angus, angus (Neupane et al. 2018).
1	84-85	44.95	<i>YEATS2</i> , <i>KLHL24</i> , <i>B3GNT5</i> , <i>LAMP3</i> , <i>MCCC1</i> , <i>DCUN1D1</i>	Serão et al. (2013) su otkrili asocijaciju ove regije sa rezidualnim unosom hrane (residual feed intake-RFI) kod angus i simentalске rase goveda.
7	42-43	39.74	<i>NLRP3</i>	Gen <i>NLRP3</i> asociran je rezistencijom na infekciju <i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i> kod HF goveda (Mallikarjunappa et al. 2018)
7	43-44	40.72	<i>MGC137030</i> , <i>LYPD8</i> , <i>SH3BP5L</i> , <i>ZNF692</i>	<i>LYPD8</i> je uključen u biološke procese odbrambenih odgovora na gram-negativne bakterije i povezan je sa adaptivnim odgovorima na stimulans iz okoline kao što su stres, infekcije i upale kod goveda (Pošćić et al. 2017).
10	72-73	31.92	<i>L3HYPDH</i> , <i>JKAMP</i> , <i>CCDC175</i> , <i>DHRS7</i> , <i>PPM1A</i> , <i>SIX6</i>	Gaddis et al. 2017 povezali su gene <i>DHRS7</i> i <i>SIX6</i> sa brojem embriona kod HF krava
10	73-74	31.92	<i>MNAT1</i> , <i>TRMT5</i> , <i>PRKCH</i>	<i>PRKCH</i> su povezali nagibom leđa kod HF krava (Yan et al. 2020).
16	42-43	36.81	<i>DHRS3</i> , <i>VPS13D</i> , <i>TNFRSF1B</i> , <i>MIIP</i> , <i>MFN2</i> , <i>PLOD1</i> , <i>KIAA2013</i> , <i>NPPB</i> , <i>NPPA</i> , <i>CLCN6</i> , <i>MTHFR</i> , <i>MIR12050</i> , <i>AGTRAP</i> , <i>DRAXIN</i> , <i>MAD2L2</i> , <i>FBXO6</i> , <i>FBXO44</i> , <i>FBXO2</i>	Kod krava rasa Jaroslav, Kolmogor i HF identifikovan je potpis selekcije na istoj regiji (Zinovieva et al. 2020)
				<i>MTHFR</i> je uključen u sintezu mlečnih proteina (Menzies et al., 2009).

nastavak Tabele 2.

16	43-44	37.46	<i>DISP3, ANGPTL7, EXOSC10, SRM, MASP2, TARDBP, PEX14</i>	<i>EXOSC10</i> asociran je dugovečnošću kod HF krava (Steri et al. 2020).
16	44-45	36.81	<i>DFFA, CORT, CENPS, PGD, UBE4B, LOC112441838, NMNAT1, CTN-NBIP1, PIK3CD, TMEM201</i>	<i>NMNAT1</i> asociran je reproduktivnom efikasnošću krava (Mota et al., 2017, Khatkar, et al. 2014)
16	45-46	30.29	<i>SPSB1, MIR34A, SLC2A5, CA6, ENO1, MIR2285CK, SLC45A1, LOC786597</i>	Gen <i>ENO1</i> je bio značajno povezan sa plodnošću bikova (Park et al. 2012)
22	21-22	30.62	<i>EDEM1, ARL8B, BHLHE40, ITPR1, MIR2285AM</i>	<i>BHLHE40</i> asociran je sadržajem mlečnih proteina (Singh et al. 2022)
22	22-23	34.20	<i>SUMF1, SETMAR, LRRN1</i>	Gen <i>SUMF1</i> povezan je prinosom mleka kod HF krava (Pedrosa et al. 2021)
26	21-22	37.13	<i>CHUK, CWF19L1, SCD, MIR12016, SEC31B, NDUFB8, HIF1AN, SLF2, SEMA4G, MRPL43, TWNK, LZTS2, SFXN3, TLX1, LBX1</i>	Gen <i>SCD</i> povezan je sa nezasićenim masnim kiselinama srednjeg i dugog lanca mleka u populaciji kineskih HF krava (Li et al., 2016).
26	22-23	42.02	<i>BTRC, POLL, DPCD, FBXW4, FGF8, NPM3, OGA, KCNIP2, HPS6, PPRC1, NOLC1, ELOVL3, PITX3, GBF1, NFKB2, PSD, FBXL15, CUEDC2, MIR146B, MFS-D13A, ACTR1A, SUFU</i>	Wang et al. 2016 uočili su značajno povećanje nivoa ekspresije <i>MIR146B</i> u tkivu inficirane mlečne žlezde goveda subkliničkim, kliničkim i eksperimentalnim mastitisom.
26	23-24	34.85	<i>TRIM8, ARL3, SFXN2, MIR2392, CYP17A1, AS3MT, CNNM2, NT5C2</i>	<i>CNNM2</i> povezali su prinosom mleka kod HF krava (Jiang et al., 2019)

DISKUSIJA

Nivo inbridaža u populaciji je značajan parametar praćenja i upravljanja genetskim diverzitetom. Visok nivo inbridaža uzrokuje inbridaž depresiju u

srodstvu i treba ga izbegavati kod farmskih životinja (Fernandez et al. 2002). Negativni efekti na proizvodne i reproduktivne karakteristike mlečnih krava u vezi su sa povećanjem inbridinga (Bjelland et al. 2013). Inbriding se najčešće određuje korišćenjem podataka o pedigreu. Međutim, koeficijent inbridinga zasnovan na pedigreu, poseduje određena ograničenja. Inbriding je široko prihvaćen koncept za karakterizaciju evolucije, diverziteta i opšte strukture populacije, te se može proučavati na različitim nivoima, počevši od jedinke, stada, pa do nivoa populacije (Howard et al. 2017; Ablondi et al. 2022) ili čak unutar konzorcijuma (npr. centri za veštačko osemenjavanje ili farme mlečnih goveda; Ablondi et al. 2021). Dolaskom do ovih saznanja omogućeno je bolje upravljanje diverzitetom i genetikom životinja, kontrolisanje depresije inbridinga ali i očuvanje manjih populacija. Za izračunavanje genomskog inbridinga u našem istraživanju, korišćene su genomske informacije dobijene pomoću SNP čipa srednje gustine (63 648 markera). Sa dobijenim SNP podacima, očekivane vrednosti inbridinga se zamenjuju dobijenim merenjima homozigotnosti, za koje se smatra da su precizniji način za procenu inbridinga i da bolje odražavaju nivo homozigotnosti. Posebno je važna kontrola stepena inbridinga u populacijama goveda, zbog toga što se za uzgoj koristi samo mali broj životinja iz cele populacije. U našem istraživanju, najmanje detektovanih ROH je bilo najveće dužine (>16 Mbp, nedavni inbriding) od čega 45 procenata životinja uopšte nije imalo $ROH_{>16\text{ Mb}}$, a što je približno rezultatima Doekes et al. (2019), koji u svom istraživanju kod 26 procenata ispitanih krava nisu uočili $ROH_{>16\text{ Mb}}$. Naši rezultati su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (McQuillan et al. 2008; Marras et al. 2015; Forutan et al. 2018) u kojima su kratki $ROH_{<2\text{ Mbp}}$ uočavani češće nego dugi ROH. U okviru naših nalaza srednje vrednosti broja ROH po životinji, posmatrano kroz različite kategorije (1 do 2 Mbp: 30,140; 2 do 4 Mbp: 17,505; 4 do 8 Mbp: 8,679; 8 do 16 Mbp: 3,992; >16 Mbp: 1,726, pojedinačno), u saglasnosti su sa rezultatima Marras et al. (2015) koji su utvrdili sledeće: 1 do 2 Mbp: 46,5; 2 do 4 Mbp: 17,0; 4 do 8 Mbp: 9,7; 8 do 16 Mbp: 5,9; >16 Mbp: 3,0. Prosečna vrednost genomskog inbridinga F_{ROH} u našem istraživanju izračunata je korišćenjem SVS Golden Helix softvera i iznosila je 0,079, što je nešto niže od vrednosti koje su dobili Marras et al. (2015) u populaciji italijanskih HF goveda (0,116), dok su Mekanjuola et al. (2020) koristeći SNP1101 softver i PLINK softver u populaciji kanadskih HF goveda dobili vrednost F_{ROH} 0,136 i 0,156, pojedinačno. U poređenju sa literaturnim navodima drugih autora, naši rezultati sugerišu nizak nivo nedavnog i ukupnog inbridinga u ispitivanoj populaciji HF goveda.

Određivanje nedavnih potpisa pozitivne selekcije kod domaćih životinja može pružiti informacije o genomskim regionima koji su pod uticajem veštačke i prirodne selekcije i na taj način pomoći u identifikaciji korisnih mutacija i osnovnih bioloških puteva za ekonomski važne osobine. Ustanovljeno je više različitih pristupa za otkrivanje potpisa selekcije, dok smo u ovom našem istraživanju koristili ROH kao parametar za njihovo otkrivanje. Najsavremenija metoda za analizu inbridinga u populacijama životinja su ROH. Štaviše, ROH su pogodni za otkrivanje potpisa selekcije preko identifikacije ROH ostrva. ROH ostrva se mogu

definisati kao genomski regioni sa smanjenim genetskim diverzitetom i posledično tome, visokom homozigotnošću oko odabranog lokusa koji bi mogao da sadrži ciljane regione pozitivne selekcije, a koji su pod jakim selektivnim pritiskom. U našem istraživanju, ROH ostrva su uočena na hromozomima 1, 7, 10, 16, 22 i 26, a na hromozomu 1 je detektovana najveća stopa ROH. Ostrva ROH na hromozomu BTA1 su identifikovana i u drugim populacijama goveda od strane Purfield et al. (2012), Mastrangelo et al. (2016) i Gurgul et al. (2016). Naši rezultati ukazuju na postojanje ROH ostrva na BTA1 veličine 2 Mbp (od 83 do 85 Mbp). Kod 45 procenata životinja, iz ispitivane populacije, javljaju se potpisi selekcije u vidu gena: *PARL*, *YEATS2*, *KLHL24*, a Serão et al. (2013) su otkrili asocijaciju ove regije sa rezidualnim unosom hrane (residual feed intake - RFI) kod angus i simentalske rase goveda. Gaddis et al. (2017) su otkrili povezanost gena *DHRS7* i *SIX6* sa brojem embriona kod HF krava. Menzies et al. (2009) su u svom radu opisali asocijaciju *MTHFR* sa sintezom mlečnih proteina. Khatkar et al. (2014) i Mota et al. (2017) su utvrdili vezu između *NMNAT1* gena i reproduktivne efikasnosti krava, dok su Park et al. (2012) opisali značajnu povezanost gena *ENO1* sa plodnošću bikova. Pored prethodno navedenih gena, koji se dovode u vezu sa reproduktivnim osobinama goveda, a koji su otkriveni i u našem istraživanju, pojedini autori opisuju gene povezane sa proizvodnim i zdravstvenim parametrima. Singh et al. (2022) su uočili asocijaciju gena *BHLHE40* sa sadržajem proteina mleka, dok su Pedrosa et al. (2021) otkrili povezanost gena *SUMF1* sa prinosom mleka kod krava, a Jiang et al. (2019) i Wang et al. (2016) su uočili značajno povećanje nivoa ekspresije *MIR146B* u tkivu inficirane mlečne žlezde goveda sa subkliničkim, kliničkim i eksperimentalnim mastitisom.

ZAKLJUČCI

Utvrđena je povezanost između detektovanih ROH ostrva produktivnih karakteristika mlečnih grla, ali i regija u genomu pod pritiskom selekcije na druge ekonomski važne osobine goveda. Rezultati analize ROH segmenata ukazuju na nizak nivo nedavnog i ukupnog genomskog inbridinga u ispitivanoj populaciji HF goveda. Naši nalazi, ali i nalazi drugih autora, navode na zaključak da otkriveni geni i ROH ostrva mogu biti u vezi i sa drugim proizvodnim, zdravstvenim i reproduktivnim parametrima goveda, a koji mogu služiti kao korisni markeri za savremene programe selekcije u našoj zemlji, ali i šire.

Zahvalnica:

Ovo istraživanje je finansirano od strane Međunarodne agencije za atomsku energiju (*International Atomic Energy Agency - IAEA*) iz projekta 20774, kojim rukovodi prof. dr Zoran Stanimirović.

LITERATURA

Spisak referenci (50) se može dobiti na lični zahtev od autora za korespondenciju.

IDENTIFICATION OF PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE TRAIT SELECTION SIGNATURES AND LEVEL OF GENOMIC INBREEDING IN POPULATION OF SERBIAN HOLSTEIN-FRIESAN COWS

**Marko Ristanić, Minja Zorc, Uroš Glavinić, Jovan Blagojević,
Milan Maletić, Peter Dovč, Zoran Stanimirović**

Summary

Monitoring inbreeding levels in livestock is very important considering that increasing relatedness between animals leads to rapid loss of genetic variability and negative phenotypic effects associated with inbreeding depression. Identification of positive selection signatures in domestic animals can provide information on genomic regions affected by artificial and natural selection and thus help identify beneficial mutations and biological pathways for economically important traits. Our study aimed to identify ROH segments, assess the extent of genomic inbreeding (FROH), and identify ROH islands as markers of genomic regions under selection pressure in 334 Holstein-Friesian cows (HF) using the Axiom Bovine BovMDv3 SNP chip with 63 648 predefined loci of interest in the *Bos taurus* genome. The majority of the ROH detected were in the length category of 1 to 2 Mbp. The total length of all ROH segments per animal was 197.92 Mbp, whereas in the animal with the largest total ROH length (433,37 Mbp), 17% of autosomes were covered by ROH. The level of genomic inbreeding (FROH) in the mentioned animal is 0.173 and in the least inbred animal is 0.005. The genomic inbreeding in the studied population is 0.079 on average, which indicates a low level of recent and total genomic inbreeding in the studied population of HF cattle. ROH islands were detected on chromosomes 1, 7, 10, 16, 22 and 26. The highest ROH rate (45% of animals) was observed on chromosome BTA1 on markers AX-106742409 (rs41578805), AX-106740136 (rs109562914), AX-106719581 (rs41603780), AX-185115133 (rs523828967) and AX-124379394 (rs110792335) harbouring genes: *PARL*, *YEATS2* and *KLHL24*. The ROH analysis indicate a low level of recent and total genomic inbreeding in the investigated HF population. ROH islands in the studied population of HF cows revealed putative genomic regions under selection pressure on production, reproduction and other economically important traits.

Key words: FROH, Holstein-Friesian cattle, ROH, ROH islands, selection signature, SNP array

CITOMORFOLOŠKE PROMENE SPERMATOZOIDA KOD NERASTOVA

*Ivan Stančić¹, Ivan Galić¹, Jelena Apić², Mihajlo Erdeljan¹,
Jovan Spasojević¹, Tijana Kukurić¹, Sandra Nikolić¹*

Kratak sadržaj

Intenzivna proizvodnja u svinjarstvu je nezamisliva bez adekvatne reproduktivne eksploatacije priplodnih nerastova. Reproductivna eksploatacija nerastova podrazumeva pravilno uzimanje i manipulaciju sa spermom u cilju pripreme doza za veštačko osemenjavanje. Pored adekvatne procene progresivne pokretljivosti, koncentracije i individualnih karakteristika pri razređenju sperme je neophodna evaluacija i adekvatna analiza citomorfologije spermatozoida. Citomorfološke analize spermatozoida u spermi nerastova se mogu vršiti primenom veoma jedostavnih i jeftinih analitičkih metoda kao što je supravitalno bojenje, ali i metodom pomoću CASA (engl. computer assisted sperm analyses) sistema kao super analitičke metode. Naime, obe metode ukazuju na to kakva je citomorfološka struktura pregledanog broja spermatozoida. Ovo zatim vrlo jasno upućuje na moguće probleme u manipulaciji sa semenom, nepravilnoj eksploataciji, probleme u spermatogenezi ili na prisustvo drugih patološko-infektivnih procesa. Zbog veće dostupnosti i primenljivosti, ovaj rad je baziran na primeni metode supravitalnog bojenja i oceni citomorfoloških karakteristika spermatozoida u spermi nerastova. Citomorfološke promene spermatozoida i njihova masovnost, uglavnom i u najvećem broju slučajeva, ukazuju na uzrok problema. Spermatozoidi morfološki mogu biti promenjeni, a same promene analizirane kao solitarne ili grupne malformacije. Solitarne promene uglavnom ukazuju na promene strukture spermatozoida, njihov deformitet ili odsustvo delova samog spermatozoida. Grupne malformacije se karakterišu povezivanjem potencijalno oplodno sposobnih spermatozoida u različite vidove aglomerata/aglutinata. Cilj ovog rada je bio da ukažemo kako se primenom brzih i jeftinih analiza, čak i u farmским uslovima, vrlo lako može posumnjati na reproduktivni problem kod nerastova na osnovu citomorfoloških promena. Na taj način se mogu otvoriti novi vidici za dalju dijagnostiku ili super analizu u cilju rešavanja problema.

Ključne reči: *citomorfologija, nerast, reprodukcija, spermatozoidi*

¹Dr sci. vet. med. Ivan Stančić, redovni profesor; dr vet. Ivan Galić, asistent; dr sci. vet. med. Mihajlo Erdeljan, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Jovan Spasojević, docent; dr vet. Tijana Kukurić, asistent; dr vet. Sandra Nikolić, asistent, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni Fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

²Dr Jelena Apić, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad, R. Srbija
*e-mail autora za korespondenciju: dr.ivan.stancic@gmail.com

UVOD

Intenzivna proizvodnja u svinjarstvu je nezamisliva bez adekvatne reproduktivne eksploatacije priplodnih nerastova. Reprodiktivna eksploatacija nerastova podrazumeva pravilno uzimanje i manipulaciju sa spermom u cilju pripreme doza za veštačko osemenjavanje. Kvalitet sperme nerastova zavisi od više faktora, kako onih genetskih tako i paragenetskih (Pinart and Puigmulé, 2013). Genetski faktor je pre svega preduslov za odabir kvalitetnih priplodnih nerastova, dok paragenetski faktori u velikoj meri zavise od ljudskog faktora. Korišćenje skupih i genetski superiornih nerastova za veštačko osemenjavanje ima velikog ekonomskog uticaja na savremenu, intenzivnu proizvodnju svinja (Gadea et al., 2004). Pod ovim se podrazumeva da od takvih nerastova treba dobiti maksimalan broj inseminacionih doza po ejakulatu (ili po nerastu godišnje) što i jeste glavni razlog uspešne reproduktivne eksploatacije nerastova (Apić et al. 2016.).

Osnovna procena kvaliteta ejakulata se bazira na analizi progresivne pokretljivosti spermatozoida, njihovom ukupnom broju, odnosno koncentraciji, toleratnosti na razređenje i citomorfološkoj evaluaciji. U farmskim uslovima je danas, sa opremom dostupnoj na tržištu, veoma lako odrediti osnovne parametre kvaliteta ejakulata. Određivanje progresivne pokretljivosti spermatozoida, u farmskim uslovima i dalje ostaje bazirano na subjektivnom pregledu i iskustvu tehničkog osoblja. Dobro obučeno tehničko osoblje, u nativnom ili rezređenom ejakulatu, može mikroskopskim pregledom prilično dobro oceniti progresivnu pokretljivost spermatozoida. Određivanje koncentracije tj. ukupnog broja spermatozoda u ejakulatu dostupnim spektrofotometarskim aparata relativno precizno određuje ovaj parameter. Takođe se veoma lako određuje i individualnost nerasta na stepen razređenja i vrstu razređivača, a nakon toga se, sa informacijom o progresivnoj pokretljivosti i koncentraciji lako određuje moguć broj inseminacionih doza. Tako Stančić i sar. (2012), navode da za VO, metodom klasične intracervikalne inseminacije, inseminacione doze moraju posedovati koncentraciju od $3\text{-}5 \times 10^9$ u 100 ml ejakulata, sa min. 65 procenata održive progresivne pokretljivosti tokom 48h, u rezređenju od 1:4. Međutim, veoma važnu ulogu u samom pregledu, tj. evaluaciji kvaliteta ejakulata, ima i procena prisustva morfološki promenjenih spermatozoida u uzorku. Određene abnormalnosti u morfologiji spermatozoida dozvoljene su u određenom procentu. Naime, nisu sve abnormalnosti podjednako prihvatljive u pogledu procentualne zastupljenosti.

Citomorfološke analize spermatozoida u spermi nerastova se mogu vršiti primenom veoma jednostavnih i jeftinih analitičkih metoda kao što je supravitalno bojenje, ali i metodom CASA sistema kao super analitičke metode. Naime, obe metode ukazuju na to kakva je citomorfološka struktura pregledanog broja spermatozoida. Ovo zatim jasno ukazuje na moguće probleme u manipulaciji sa semenom, nepravilnoj eksploataciji, probleme u spermatogenezi ili prisustvu drugih patološko-infektivnih procesa. Cilj ovog rada je bio da se dokaže kako se primenom brzih i jeftinih analiza, čak i u farmskim uslovima, vrlo lako može posumnjati na reproduktivni problem kod nerastova na osnovu citomorfoloških

promena i time otvoriti nove vidike za dalju dijagnostiku ili super analizu u cilju rešavanja problema.

SUPRAVITALNO BOJENJE

Bojenje *po Bloomu* je metod koji ima široku primenu u praksi. Metod je efektivan, jednostavan i jeftin, a omogućava dobru vizuelizaciju spermatozoida pa se naziva i „*live-dead*“ bojenje. Na istom preparatu se, pored normalno građenih, vide i spermatozoidi sa različitim morfološkim promenama. Za ovu metodu je potrebna nativna ili razređena sperma, histološke boje: eozin (10 % vodeni rastvor) i nigrozin (5% vodeni rastvor), staklena predmetna pločica, stakleni štapić i svetlosni mikroskop (uveličanje $\times 1000$). Na predmetnu pločicu, koja je prethodno zagrejana na 37 °C, se stavi kap sperme, a zatim se doda duplo veća kap nigrozina i troduplo veća kap eozina. Jednim potezom, napravi se tanak razmaz po predmetnom staklu, tako da on ima bledu crvenu boju. Preparat se ostavlja da se osuši. Tako suv preparat se stavlja ispod objektiva mikroskopa i posmatraju se spermatozoidi. Oni, čija glava nije obojena crveno i bledo-zelenkasto svetluca, su bili živi pre početka bojenja, dok su spermatozoidi sa crveno obojenim glavama bili mrtvi. Po završenoj proceni procentualnog odnosa živih i mrtvih spermatozoida, pristupa se evaluaciji morfološki promenjenih ćelija i abnormalnosti u populaciji živih spermatozoida. Nakon toga se mogu doneti zaključci u pravcu procene njihovog morfološkog kvaliteta.

DISKUSIJA

Citomorfološke promene spermatozoida i njihova masovnost, uglavnom i u najvećem broju slučajeva, ukazuju na put problema. Spermatozoidi mogu biti morfološki promenjeni, a same promene se analiziraju kao solitarne ili grupne malformacije. Solitarne promene uglavnom ukazuju na promenu strukture spermatozoida, njihov deformitet ili odsustvo delova samih spermatozoida. Grupne malformacije se karakterišu kao masovno vezivanje potencijalno, čak i oplodno sposobnih spermatozoida, u različite vidove aglomerata/aglutinata. Kada se sagledaju morfološke promene uglavnom se obraća pažnja na: *Defekte glave spermatozoida* – koje se ogledaju u promeni oblika, veličine ili postojanja dve glave. Uzrok ove promene je uglavnom defekt u građi i integritetu akrozoma. Međutim, ovaj oblik defekta može nastati i tokom formiranja spermatozoida u testisima, tokom boravka u epidimisu, kao i kasnije tokom manipulacije sa semenom *in vitro*. Ovo su dokazali Pursel et al. (1974), objasnivši da su koncentracija i odabir razređivača veoma bitni tokom manipulacije sa spermom *in vitro*. *Defekti srednjeg dela spermatozoida* – ovo se odnosi na vrat ili vezu glave i repa spermatozoida, gde se on može okarakterisati u svojoj promeni kao zadebljao, dupli, kratak, prelomljen i sl., a koji značajno ometa normalno kratanje spermatozoida. *Defekti repa spermatozoida* - mogu biti različiti i definisati se kao uvrnut, slomljen, dupli ili kao nedostatak celog repa. Neke anomalije repa se događaju i tokom boravka (sa-

zreivanja) u epididimisu, a neke su posledica neadekvatnog postupka tokom evaluacije kvaliteta i čuvanja sperme. *Cito/protoplazmatske kapljice* – ove promene se uočavaju uglavnom na proksimalnom ili distalnom delu repa spermatozoida i veoma su bitne u evaluaciji fertilizacionog kvaliteta samog ejakulata. Povećano prisustvo proksimalnih kapljica tj. onih bliže glavi spermatozoida odražava pojavu velikog broja mladih spermatozoida dok je broj ćelija sa distalnom kapljicom bliže kraju repa, znak da su spermatozoidi bili pri kraju procesa sazreivanja u epididimisu. Njihov povećan broj ima manje posledice na fertilnost samog ejakulata. Sve ovo govori o problemima koji se javljaju usled česte eksploatacije mladih nerastova, čestog uzimanja ejakulata od nerastova ili poremećaju u samom epididimisu. To su u svom zaključku objasnili i Henning et al., (2021) koji konstatuju da nepotpuno sazreivanje spermatozoida u epididimisu smanjuje sposobnost *in vitro* kapacitacije i destabilizuje spermatozoide kod nerastova tokom skladištenja. *Aglomeracija/Aglutinacija* – je pojava manjeg ili većeg grupisanja spermatozoida u formi glava ka glavi ili rep ka repu, i to najčešće iz više razloga koji su podeljeni na hemijske, imunološke ili infektivne. Hemijska aglutinacija je uglavnom nespecifična i uključuje različite vidove stresa kako toplotnog, tako i promene pH, promene osmotskog pritiska ili kontaminaciju teškim metalima. Stančić i sar. (2013) navode da dodavanje velikih količina razređivača nativnoj spermi, dovodi do smanjenja progresivne pokretljivosti i aglutinacije spermatozoida. Imunološki posredovana reakcija aglutinacije je relativno retka i nastaje kada određene komponente membrane spermatozoida deluju kao antigeni i senzibilišu organizam na proizvodnju antitela. Najčešći vid, pored hemijske, je infektivna aglutinacija, koja je česta pojava uzrokovana kontaminacijom sperme infektivnim agensima. Ovo su uglavnom ubikvitarne bakterije urogenitalnog trakta, fekalne bakterije ili druge afektivne nečistoće sa pojavom veće količine ćelijskog detritusa.

Citomorfološke promene značajno utiču na kvalitet ejakulata namenjenog formiranju inseminacionih doza i time dovode do loših fertilizacionih rezultata, što navode i drugi autori (Tardif et al., 1999). Oni napominju da su koncentracija spermatozoida u 1 ml ejakulata, procenat PP kao i morfologija spermatozoida parametri koji u najvećoj meri određuju fertilizacionu sposobnost ejakulata. Sa druge strane, vrednosti ovih parametara značajno variraju u zavisnosti od rase (Lauda, 1998), starosti nerastova (Stemmler et al., 1982), kao i godišnje sezone (Colenbrander and Kemp 1990). U tabeli 1 je data preporučena minimalna zastupljenost pojedinih morfoloških promena u ejakulatu.

Tabela 1. Minimalna zastupljenost citomorfoloških promena

Ukupan broj citomorfološki promenjenih spermatozoida	≤ 25%
Spermatozoidi sa promenjenom glavom	≤ 5%
Spermatozoidi sa abnormalnim akrozomom	≤ 10%
Spermatozoidi sa citoplazmatskom kapljicom	≤ 15%
Spermatozoidi sa uvrnutim repom	≤ 15%
Ostale abnormalnosti	≤ 15%

ZAKLJUČAK

Pored svega navedenog, treba naglasiti da je, osim evaluacije standardnih parametara kvaliteta ejakulata kao što su volumen, koncentracija i progresivna pokretljivost, neophodno, čak i u farmskim uslovima, uraditi citomorfološku analizu spermatozoida jednostavnim metodama bojenja kako bi se dobio bolji uvid u fertilizacioni potencijal ejakulata. Ocena procentualne zastupljenosti pojedinih abnormalnosti je jedini put ka rešenju ovih problema. Kasnije uključivanje superanaliza kao što su CASA, protočna citometrija i mikrobiološke analize daju konačnu dijagnozu i ideju o mogućem terapijskom protokolu.

LITERATURA

1. Apić J., Radović I., Stančić I., Vakanjac S., 2016. Boar and season effects on some parameters of semen fertilizing potential, *Veterinarski glasnik*, Vol. 70, Issue 5-6, pages: 163-74. DOI 10.2298/VETGL1606163A. 2. Colenbrander, B., Kemp, B. 1990. Factors influencing semen quality in pigs. *J Reprod Fertil Suppl*, 40: 105-15. 3. Gadea J, Selle's E, Marco A. 2004. The Predictive Value of Porcine Seminal Parameters on Fertility Outcome under Commercial Conditions. *Reprod Dom Anim*, 39:303-8. 4. Henning, Heiko, Anne-Marie Luther and Dagmar Waberski. 2021. A High Incidence of Sperm with Cytoplasmic Droplets Affects the Response to Bicarbonate in Preserved Boar Semen *Animals* 11, no. 9: 2570. <https://doi.org/10.3390/ani11092570>. 5. Pinart, E., Puigmulé, M. 2013. Factors Affecting Boar Reproduction, Testis Function, and Sperm Quality. In: Bonet, S., Casas, I., Holt, W., Yeste, M. (eds) *Boar Reproduction*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8_4. 6. Pursel, V. G., Johnson, L. A., Schulman, L. L. 1974. Acrosome Morphology of Boar Spermatozoa during *in vitro* Aging, *Journal of Animal Science*, Volume 38, Issue 1, January, Pages 113-6, <https://doi.org/10.2527/jas1974.381113x> 7. Stančić I., Stančić B., Dragin S., Radović I., Božić A. 2013. Sows fertility after intracervical or cervical artificial insemination (AI) in worm and cold season. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food science*, : 2 (Special issue on BQRMF) 1592-601. 8. Stančić, I., Dragin, S., Stančić, B., Harvey, R., Božić, A., Anderson, R. 2012. Effects of breed, spermatozoa concentration and storage on progressive motility of extended boar semen. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food science*, 1 (3) 287-95, Slovakia. 9. Stemmler, E.J., Kovacs, M.E., Hoekstra, W.G., Self, H.L. 1982. Der Einfluss von Spermiennormen auf die Befruchtungsleistungen von Eber. *Mh Vet Med*, 37: 467-75. 10. Tardif, S., Laforest, J.P., Cormier, N., Bailey, J.L. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology*, 52(3): 447-59.

ZNAČAJ ENZIMA LDH IZ MLEKA U DIJAGNOSTICI MASTITISA KOD KRAVA

*Jovan Stanojević, Miodrag Radinović, Marko R. Cincović,
Zorana Kovačević, Ivana Davidov, Tijana Kukurić*

Kratak sadržaj

Mastitisi predstavljaju jedno od najvažnijih obolenja visoko mlečnih krava u savremenoj proizvodnji mleka sa značajnim efektom na ekonomiku proizvodnje što se ogleda kroz smanjenje proizvodnje mleka i povećanje troškova lečenja. Pravovremena i tačna dijagnoza mastitisa je ključ uspeha u održivosti farmske proizvodnje. Iz tog razloga, danas se sve više pažnje posvećuje različitim protokolima i dijagnostičkim alatima za pravovremeno otkrivanje zapaljenja mlečne žlezde. Najzastupljeniji način otkrivanja poremećaja sekrecije mlečne žlezde je određivanje broja somatskih ćelija u mleku. Pri tome, povećan broj somatskih ćelija ne mora uvek da bude posledica zapaljenja mlečne žlezde. Laktat dehidrogenaza (LDH) je isključivo intracelularni enzim i njegova koncentracija se određuje radi otkrivanja ili praćenja oštećenja ćelija ili tkiva. Mastitis nastaje kao posledica delovanja štetne nokse, pri čemu, u zavisnosti od stepena inflamatornog odgovora, dolazi do oštećenja samih ćelija mlečne žlezde. Cilj ovog rada je bio da se ispita značaj koncentracije enzima LDH u mleku, u dijagnostici mastitisa krava. Ispitivanja su izvedena na farmama krava u Vojvodini. U ogled je bilo uključeno 60 krava holštajn-frizijske rase, podeljenih u tri jednake grupe: zdrave krave, krave sa kliničkim oblikom mastitisa i krave sa supkliničkim mastitisom. Nakon uzorkovanja mleka iz obolelih četvrti, određivana je koncentracija enzima LDH, kao i ukupan broj somatskih ćelija. Koncentracija enzima LDH ukazuje na značajnu pozitivnu korelaciju sa ukupnim brojem somatskih ćelija u mleku, pri čemu je statistički značajno viša njegova koncentracija kod krava sa kliničkim oblikom mastitisa u odnosu na krave sa supkliničkim mastitisom i zdrave krave. Značajna statistička razlika je zabeležena i između krava sa supkliničkim mastitisom i zdravih krava. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da koncentracija enzima LDH u mleku može biti dobar dijagnostički alat za rano otkrivanje i praćenje, kako kliničkih, tako i supkliničkih mastitisa krava.

Ključne reči: dijagnostika, enzim LDH, krave, mastitis

¹Dr vet. Jovan Stanojević, doktorand; dr sci. vet. med. Miodrag Radinović, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Marko R. Cincović, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Zorana Kovačević, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Ivana Davidov, vanredni profesor; dr vet. Tijana Kukurić, doktorand, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: jovan2912@email.com

UVOD

Mastitis predstavlja zapaljenje mlečne žlezde i mlečnih kanala i od velikog je ekonomskog značaja kod mlečnih krava, s obzirom da može dovesti do promene kvaliteta mleka i smanjene proizvodnje. To je fiziološki, zaštitni odgovor i reakcija na bilo koju vrstu povreda ili oštećenja tkiva vimena. Zapaljenje mlečne žlezde može biti izazvano različitim mikroorganizmima, uključujući bakterijske patogene i karakterišu ga patofiziološke promene tkiva, vimena i mleka (Sharma i sar., 2007; Cvetnić i sar., 2016).

Pravovremena i tačna dijagnostika mastitisa je najvažniji faktor u očuvanju zdravlja mlečne žlezde i održavanju profitabilne proizvodnje na farmama. Rana dijagnoza i terapija mastitisa obezbeđuju brži oporavak, povratak na normalnu proizvodnju mleka i minimalno oštećenje mlečne žlezde. Dijagnostika kliničkih mastitisa ne predstavlja problem, budući da u tim slučajevima dolazi do otoka, temperiranosti, bola i induracije u mlečnoj žlezdi, kao i do promena u mleku. Mleko se može promeniti u konzistenciji i boji, kada se primećuje prisustvo krpica, tragova gnoja ili krvi. Dijagnoza se postavlja palpacijom vimena i pregledom prvih mlazeva mleka (Bramley, 1991).

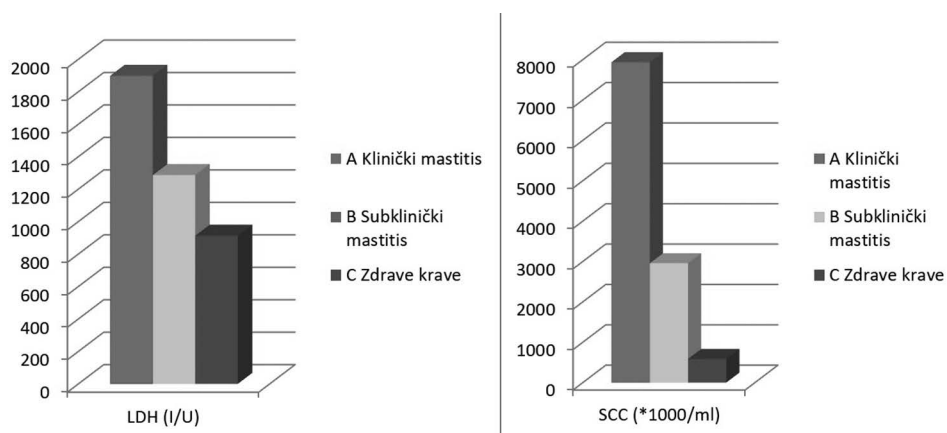
U slučajevima supkliničkih mastitisa, ne zapažaju se klinički vidljive promene na mlečnoj žlezdi, ni u mleku. Zbog toga se za otkrivanje supkliničkih mastitisa koriste metode zasnovane na određivanju promena u mleku. (Klastrup, 1985, Sender, 1986). Supklinički mastitisi se mogu dijagnostikovati na nekoliko načina direktnim i indirektnim metodama. Direktno metode predstavljaju brojanje ukupnog broja somatskih ćelija u mleku (mikroskopsko brojanje, elektronski brojač, metoda protočne citometrije – Fossomatic aparat), kao i izolaciju uzročnika, dok u indirektno metode spadaju CMT (Kalifornija mastitis test), određivanje koncentracije enzima u mleku (katalaze, lipoprotein lipaze, alfa – amilaze, lizozima, plazmina i LDH), White-side test i merenje električne provodljivosti mleka (Draminski detektor). Pored ovoga, promene u hemijskom sastavu mleka mogu biti dobri indikatori poremećaja sekrecije, koji ne moraju uvek da budu posledica infekcije. (Moyes i sar., 2014)

Laktat dehidrogenaza (LDH) je enzim koji se može naći u celom organizmu i uglavnom je unutar ćelija. Nalazi se u jetri, srcu, bubrezima, skeletnim mišićima i eritrocitima, kao i ćelijama mlečnih alveola, a katalizuje međusobno pretvaranje laktata i piruvata. Određivanje koncentracije LDH se vrši radi otkrivanja ili praćenja oštećenja tkiva. Koncentracija u tkivima je 1 500 do 5 000 puta veća od one koja se normalno nalazi u krvi. Zbog toga, čak i malo oštećenje tkiva dovodi do značajnog povećanja aktivnosti ovog enzima u krvi. Isto tako i kod oštećenja ćelija mlečne žlezde, dolazi do povećanja aktivnosti enzima u krvi, ali i u mleku (Nyman i sar., 2016).

MATERIJAL I METOD

Ogled je izveden na farmama krava u Vojvodini. U ogled je bilo uključeno 60 krava holštajn-frizijske rase, podeljenih u tri bročano jednake grupe: zdrave krave, krave sa kliničkim oblikom mastitisa i krave sa supkliničkim mastitisom. Krave su bile podeljene na osnovu kliničkog pregleda vimena i mleka, kao i upotrebe Kalifornija mastitis testa (CMT). Nakon uzorkovanja mleka iz obolelih četvrti, određivana je koncentracija enzima LDH kao i ukupan broj somatskih ćelija. Dobijeni spodaci u statistički obrađeni i prikazani grafički i tabelarno.

REZULTATI



Grafikon 1 (levo) – koncentracija enzima LDH u mleku kod krava sa kliničkim, supkliničkim mastitisom i kod zdravih krava

Grafikon 2 (desno) – broj somatskih ćelija u mleku kod krava sa kliničkim, supkliničkim mastitisom i kod zdravih krava

Tabela 1. Statistička značajnost razlika u koncentraciji enzima LDH i broju somatskih ćelija između krava sa kliničkim, supkliničkim mastitisom i zdravih krava

	LDH	SCC
A : B	P < 0.01	P < 0.01
A : C	P < 0.01	P < 0.01
B : C	P < 0.01	P < 0.01

*A – klinički mastitis, B – supklinički mastitis, C – zdrave krave

DISKUSIJA

Mastitisi predstavljaju inflamatorni odgovor mlečne žlezde na različite štetne nokse. Kao posledica oštećenja parenhima mlečne žlezde, dolazi do različitih

promena u hemijskom sastavu mleka (Moyes i sar, 2014). Te promene mogu biti indikator u dijagnostici i ranom otkrivanju poremećaja sekrecije mlečne žlezde, posebno kod supkliničkih mastitisa. Laktat dehidrogenaza je intracelularni enzim čija je koncentracija značajno viša u tkivima u odnosu na krv ili mleko. Do povećanja koncentracije ovog enzima u mleku dolazi usled oštećenja ćelija parenhima mlečne žlezde (Qayyum i sar, 2016). Mnogi autori beleže povećanje aktivnosti enzima LDH u mleku, ali i u krvi kod krava sa mastitisom (Qayyum i sar, 2016; Mahantesh i sar, 2017; Batavani i sar, 2007). U ovom radu je zabeležena statistički značajno veća koncentracija LDH u mleku krava sa kliničkim i supkliničkim mastitisom u odnosu na zdrave krave, pri čemu je najviša koncentracija zabeležena kod krava sa kliničkim mastitisom, a najniža kod zdravih krava. Ovo može biti posledica oštećenja epitelnih ćelija parenhima i izlaska enzima LDH iz intracelularnih prostora u lumen mlečnih alveola (Qayyum i sar, 2016).

Somatske ćelije (SCC) se uglavnom sastoje od polimorfonuklearnih leukocita (PMN) koji se sa drugim leukocitima i fagocitima kreću iz koštane srži do područja upale gde napadaju bakterije. Oni mogu proći između epitelnih ćelija mlečnih alveola u alveolarni lumen, čime se povećava broj somatskih ćelija (SCC) u mleku (Jones i Bailei, 2009). Iz tog razloga, broj somatskih ćelija u mleku služi kao dobar indikator u dijagnostici mastitisa mlečnih krava (O'Brien i sar, 2001). U ovom radu je zabeležen statistički značajno veći broj somatskih ćelija kod krava sa kliničkim i supkliničkim mastitisom u odnosu na zdrave krave. Takođe je potvrđena i značajna statistička razlika u broju somatskih ćelija između krava sa supkliničkim i kliničkim oblikom mastitisa.

ZAKLJUČAK

Mastitisi dovode do povećanja broja somatskih ćelija i porasta koncentracije enzima LDH u mleku. Koncentracija enzima LDH u mleku može da se koristiti kao pokazatelj oštećenja mlečne žlezde i samim tim predstavlja značajan dijagnostički alat u ranom otkrivanju mastitisa krava. Posebno je značajna aktivnost ovog enzima u dijagnostici supkliničkih mastitisa.

LITERATURA

1. Batavani, R.A., Asri, S., Naebzadeh, H. 2007. The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, University of Shiraz, 8,3, Ser. No. 20. 205. 2. Bramley AJ. 1991. Mastitis physiology or pathology? *FlemVet J.* 62(1):3-11. 3. Cvetnić, L., Samardžija, M., Habrun, B., Kompes, G., Benić, M. 2016. Microbiological monitoring of mastitis pathogens in the control of udder health in dairy cows. *Slovenian Veterinary Research*, 53(3), 131-140. 4. Jones, G. M., Bailey, T.L. 2009, Understanding the basics of mastitis. 5. Klastrup, NO. 1985. Bovine mastitis. Definition and guidelines for diagnosis. *Kieler Milchw Forsch.*;37(3):254-60. 6. Mahantesh, M., Kurjogi and Basappa, B. Kaliwal. 2017. Changes in various metabolic parameters in blood and milk of dairy cows during bovine mastitis, *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, DOI: ISSN: 2277-209X. 7. Moyes KM et al., 2014. Changes in various

metabolic parameters in blood and milk during experimental *Escherichia coli* mastitis for primiparous Holstein dairy cows during early lactation. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 5. 47. **8.** Nyman, A. K., Emanuelson, U., Waller, K.P. 2016. Diagnostic test performance of somatic cell count, lactate dehydrogenase and N-acetyl- β -d-glucosaminidase for detecting dairy cows with intramammary infection. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1440-8. **9.** O'Brien, B., Meaney, W.J., McDonagh, D., Kelly, A. 2001. Influence of somatic cell count and storage interval on composition and processing characteristics of milk from cows in late lactation. *Australian journal of dairy technology*, 56(3), 213. **10.** Qayyum, A., Khan, J.A., Hussain, R., Avais, M., Ahmad, N., Khan, M.S. 2016. Investigation of milk and blood serum biochemical profile as an indicator of sub-clinical mastitis in Cholistani cattle. *Pak Vet J*, 36(3), 275-279., DOI: 2074-7764. **11.** Sender G. 1986. Threshold value of somatic cell count in udder total milk. In: *Proceedings of the Symposium on Mastitis Control and Hygienic Production of Milk*. Finland: Espoo; p. 147-53. **12.** Sharma N. 2007. Alternative approach to control intramammary infection in dairy cows - A review. *Asian J Anim Vet Adv*. 2 (2):50-62.

ZA I PROTIV PRIMENE ANTIMIKROBNIH LEKOVA KOD KOKA NOSILJA KONZUMNIH JAJA

**Vitomir Ćupić¹, Saša Ivanović¹, Sunčica Borozan¹, Gordana Žugić²,
Indira Mujezinović³, Dejana Ćupić Miladinović¹, Jelena Aleksić¹**

Kratak sadržaj

Danas se antimikrobni lekovi u živinarstvu prvenstveno koriste za lečenje bolesti. U određenom broju zemalja, antimikrobni lekovi se primenjuju i kod koka nosilja konzumnih jaja, ali ima i onih (u koje se ubraja i naša), gde je njihova primena zabranjena. U Evropskoj uniji je odobreno 6 antimikrobnih lekova za primenu kod koka nosilja konzumnih jaja. To su: kolistin, tilozin, neomicin, oksitetraciklin, hlortetraciklin i eritromicin. Uzimajući u obzir činjenicu da se ovi lekovi često koriste neracionalno, postoje velike šanse da će se njihovi ostaci, odnosno rezidue naći ne samo u mesu živine, već i u jajima u određenom periodu nakon prestanka lečenja. Pored lekova, koje je odobrila Evropska unija, rezidue navedenih lekova u jajima mogu biti rezultat pogrešno primenjene lekovite hrane, kontaminacije hrane nekim antimikrobnim lekom za vreme mešanja, kao i „extra-label“ upotrebe lekova kod živine. Antimikrobni lekovi se distribuiraju u organizmu i deponuju u jajima, uglavnom u žumancetu, gde se obično zadržavaju duže, u odnosu na belance. Lekovi koji se slabo resorbuju iz gastrointestinalnog trakta (aminoglikozidi, aminociklitoli, polimiksini) ne mogu se utvrditi u jajima, dok rezidue nekih antimikrobnih lekova, koji se resorbuju iz digestivnog trakta mogu perzistirati u jajima i do dva meseca (npr. hloramfenikol) nakon poslednjeg tretmana. Racionalna upotreba lekova u veterinarskoj medicini ima višestruki značaj. Upotrebom svakog leka, samo onda kada je zaista neophodan (indikovan), u pravoj dozi i pravi način, ne samo da bi se smanjila potencijalna štetnost od njihove upotrebe, već bi se i povećala efikasnost i ono što je najvažnije, rizik od razvoja rezistencije kod mikroorganizama bi se značajno smanjio.

Ključne reči: antimikrobni lekovi, belance, živina, žumance, koke nosilje konzumnih jaja, rezidue

¹Dr sci. vet. med. Vitomir Ćupić, redovni profesor; dr sci. vet. med. Saša Ivanović, vanredni profesor; dr Sunčica Borozan, redovni profesor; dr sci. vet. med. Dejana Ćupić Miladinović, asistent; dr sci. vet. med. Jelena Aleksić, docent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Gordana Žugić, direktor, Agencija za lekove i medicinska sredstva, R. Srbija

³Dr sci. vet. med. Indira Mujezinović, redovni profesor, Univerzitet u Sarajevu, Veterinarski fakultet, R. Bosna i Hercegovina

*e-mail autora za korespondenciju: cpcv57@gmail.com

UVOD

Danas se u kliničkoj praksi humane i veterinarske medicine širom sveta koriste veliki broj antimikrobnih lekova. Takođe, mnogi naučnici intenzivno rade na otkrivanju i sintezi novih lekova sa širim antimikrobnim spektrom, snažnijim delovanjem i zadovoljavajućim bezbednosnim profilom. Nažalost, svedoci smo da se ovi lekovi prilično neracionalno koriste. Pored stalnog ukazivanja na sve štetne posledice, koje ovi lekovi mogu izazvati, to se nažalost i dalje dešava (Ćupić i Dobrić, 2003).

Neracionalna upotreba ovih lekova u veterinarskoj medicini, kao i potreba za kontrolom njihove upotrebe, postaju sve veći problem kada su u pitanju životinje čiji se proizvodi koriste za ishranu ljudi. U tom slučaju postoji mogućnost da minimalne količine lekova i njihovih metabolita (rezidua), koji ostaju u jestivim tkivima, odnosno u životinjskim proizvodima (meso, mleko, jaja, med) mogu da izazovu određene štetne efekte kod ljudi, kao potencijalnih konzumenata takve hrane (Adams, 2001; Giguere i sar., 2013; Ćupić i Živanov, 1990; Ćupić, 1997, Ćupić i Teodorović, 1997).

Zbog njihove toksičnosti, kako za životinje (kod kojih se primenjuju), tako i za ljude, potencijalne konzumente, Uprava za hranu i lekove (FDA), kao i Evropska Agencija za lekove (EMA), zabranile su upotrebu nekih antimikrobnih lekova kod životinja čiji se proizvodi koriste za ishranu ljudi. To su: hloramfenikol, nitroimidazoli, nitrofurani, kvinoksalini, fluorohinoloni, sulfonamidi, glikopeptidi, jonofori i cefalosporini (Payne i sar., 1999; Davis i sar., 2009; Ćupić i sar., 2011, 2019).

Upotreba antimikrobnih lekova kod koka nosilja konzumnih jaja

Upotreba antimikrobnih lekova kod koka nosilja konzumnih jaja je oduvek bila predmet brojnih rasprava. Pored onih, koji podržavaju njihovu upotrebu, uvek je bilo i onih autora, koji su protiv toga. U Republici Srbiji i nekim susednim državama ne koriste se antimikrobni lekovi za lečenje bolesti kod koka nosilja. Međutim, treba reći, da postoje i one države, ne samo u našem susedstvu, već i šre u svetu gde su ovi lekovi odobreni. Ovo se uglavnom odnosi na one antimikrobne lekove, koji se malo ili uopšte ne resorbuju iz digestivnog trakta (Goetting i sar., 2011).

Evropska unija je odobrila 6 antimikrobnih lekova, koji se mogu koristiti kod koka nosilja konzumnih jaja. To su: *kolistin*, *tilozin*, *neomicin*, *oksitetraciklin*, *hlortetraciklin* i *eritromicin*. U nekim zemljama Evropske unije, SAD, Australiji i Kanadi, odobreni su sledeći antimikrobni lekovi: *bacitracin*, *hlortetraciklin*, *linkomicin* i *spektinomycin*, te *neomicin* i *tilozin* (Australija); *hlortetraciklin*, *neomicin*, *oksitetraciklin*, i *penicilin G* (Kanada); *hlortetraciklin*, *kolistin*, *eritromicin*, *fenoksi-metilpenicilin*, *tiamulin* i *tilozin* (Irska); *kolistin*, *eritromicin*, *fenoksi-metilpenicilin*, *tiamulin* i *tilozin* (Engleska) i *bacitracin*, *eritromicin*, *higromicin B*, *nistatin* i *tilozin* (SAD) (Goetting i sar., 2011).

Iako koke nosilje, nose jaja svaki dan, svakom jajetu je potrebno nekoliko dana da se razvije u organizmu jedinki (a nekim komponentama jajeta i nekoliko meseci). Smatra se da je period od 10 do 14 dana pre nošenja jaja (ovo je period intenzivnog razvoja žumanca) najpogodniji za deponovanje ostataka (rezidua) lekova u jajima. Upravo u ovom periodu, najveća količina lipoproteina iz jetre cirkulacijom stiže u jajnik, odnosno jajovod, gde učestvuje u završnoj fazi izgradnje žumanceta. Ako se jedinke leče u ovom periodu, onda su šanse da se lipoproteini kontaminiraju ostacima lekova najveće (Goetting i sar., 2011).

U zavisnosti od fizičko-hemijskih svojstava, lekovi se u različitim koncentracijama distribuiraju u organizmu i deponuju u žumancu i belancu. Najveći broj lekova (verovatno zbog dužeg razvoja žumanca) postiže veće koncentracije u žumancetu, nego u belancu. Vremenski period zadržavanja ostataka pojedinih antimikrobnih lekova u jajima se takođe razlikuje (Goetting i sar., 2011).

Tako je poznato da se lekovi, koji se malo resorbuju iz gastrointestinalnog trakta (aminoglikozidi, aminociklitoli, polimiksini), ne mogu utvrditi u jajima. Sa druge strane, ostaci nekih antimikrobnih lekova duže perzistiraju i mogu se detektovati u jajima i do dva meseca (npr. hloramfenikol) nakon poslednjeg tretmana (Goetting i sar., 2011).

U ovom radu biće ukratko dat pregled farmakokinetike aminoglikozida, amfenikola i tetraciklina, sa posebnim osvrtom na mogućnost deponovanja ovih lekova u jajima.

Osnovne karakteristike aminoglikozida, amfenikola i tetraciklina

Aminoglikozidi

Aminoglikozidi (kao aminociklitoli) deluju na Gram-negativne i neke Gram-pozitivne, ali ne i na anaerobne bakterije. Veoma se slabo resorbuju iz digestivnog trakta kod svih životinja i ljudi. Nakon peroralne primene, ovi lekovi se kod sisara uglavnom izlučuju izmetom. Kod ptica se aminoglikozidi nakon peroralne primene takođe eliminišu izmetom (Ćupić i sar, 2019; Botsoglou i Fletouris, 2001; Adams, 2001; Brown i Riviere, 1991)

Zbog slabe resorpcije iz digestivnog trakta, retko se mogu utvrditi rezidue ovih lekova u jajima nakon peroralne primene. Kada se aminoglikozidi aplikuju parenteralno za lečenje sistemskih infekcija, glavni put eliminacije ovih lekova kod sisara su bubrezi.

Međutim, kod sisara i ptica, sistemska primena je ograničena zbog toksičnih efekata ovih lekova (nefrotoksičnost i ototoksičnost). Iako kod ptica nema podataka o farmakokinetici sistemski primenjenih aminoglikozida i ovde se očekuje nefrotoksično delovanje, jer se smatra da je i kod njih glavni put eliminacije preko bubrega (Bennett i sar., 2001).

Ukoliko se aminoglikozidi primene kod koka nosilja, im ili sc, gentamicin i dihidrostreptomycin se deponuju u žumancetu i belancetu, a rezidue duže perzistiraju u žumancetu (Roudaut, 1989b; Filazi i sar., 2005). Eksperimentalno je

utvrđeno da vremenski period perzistiranja rezidua gentamicina u jajima, nakon parenteralne primene (im, sc) može da iznosi od 3 do 5 dana u belancetu, odnosno 7-12 dana u žumancetu, što zavisi od aplikovane doze. Iz navedenog se vidi da gentamicin duže perzistira u žumancetu, nego u belancetu. Kada se ovaj ili neki drugi aminoglikozidni lek (npr. neomicin) živini daje peroralno (preko vode za piće), ne može se utvrditi u jajima (Goetting i sar., 2011).

Amfenikoli

Amfenikoli efikasno deluju protiv rikecija, hlamidija, anaerobnih i Gram-pozitivnih aerobnih, kao i crevnih bakterija. Glavni predstavnici ove grupe antimikrobnih lekova su hloramfenikol, tiamfenikol i florfenikol. Kako hloramfenikol, može da izazove ireverzibilnu supresiju kostne srži kod ljudi, njegova upotreba je u mnogim zemljama zabranjena ili ograničena kod životinja, koje se koriste za ishranu ljudi (Ćupić i sar., 2003, 2019). Amfenikoli se daju živini, peroralno u hrani ili vodi za piće (Bishop, 2001; Papich i Riviere, 2001; Botsoglou i Fletouris, 2001; Dorrestein i sar., 1984).

Nakon peroralne primene kod živine, resorpcija je brza, ali nepotpuna. Brzo se distribuiraju po celom organizmu, a putevi izlučivanja variraju u zavisnosti od leka. Studije sprovedene na većini vrsta sisara su dokazale da se hloramfenikol metaboliše u jetri i izlučuje putem mokraće i žuči. Putevi izlučivanja hloramfenikola kod ptica nisu opisani. Kod živine se tiamfenikol eliminiše preko žuči i bubrega. Florfenikol i njihov metabolit florfenikol-amin se u značajnim količinama deponuju u jetri i bubrezima (Anadon i sar., 1994a; Bennett i sar., 2001).

Ispitivanje eliminacije amfenikola kod koka nosilja je sprovedeno samo u malom broju studija. Utvrđeno je da se ostaci ovih lekova, mogu naći u žumancetu i belancetu nekoliko dana (4-5), pa sve do preko 72 dana (hloramfenikol), odnosno do 10 dana (tiamfenikol), nakon peroralne primene (Goetting i sar., 2011).

Tetraciklini

Tetraciklini su tipični predstavnici antimikrobnih lekova širokog spektra delovanja. Koriste se za preveniranje i lečenje bolesti, kao i (u nekim zemljama) za stimulaciju rasta životinja čiji se proizvodi koriste za ishranu ljudi (Giguere i sar., 2013). Oni deluju protiv velikog broja Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, mikoplazmi, hlamidija i rikecija. Živini se najčešće daju peroralno (u hrani ili vodi za piće) (Botsoglou i Fletouris, 2001; Chopra i Roberts, 2001).

Generalno, tetraciklini se umereno resorbuju iz digestivnog trakta kod sisara, ali je resorpcija nepotpuna kod ptica. Ovi antimikrobni lekovi imaju visok afinitet za divalentne i trovalentne jone (kalcijum, gvožđe, magnezijum, cink), koji im sprečavaju resorpciju, ako su prisutni u hrani ili digestivnom sistemu (Anadon i sar., 1994b; Botsoglou i Fletouris, 2001).

Kada se tetraciklini resorbuju, distribuiraju se po celom organizmu i deponuju u jetri i bubrezima. Tetraciklini se takođe deponuju i u jajima kod koka no-

silja. Posle primene, rezidue ovih lekova se brže pojavljuju u belancetu, nego u žumancetu. Veće koncentracije se postižu u žumancetu. Postignuti nivoi rezidua, kao i stepen njihovog smanjenja u jajima, zavise od načina primene, doze i leka koji se primenjuje (Frazier i sar., 1995; Yoshida i sar., 1973).

Kada se primeni u istoj dozi i na isti način, doksiciklin se deponuje u jajima u većim koncentracijama od tetraciklina, a tetraciklin postiže veće koncentracije od oksitetraciklina. Varijacije u dužini perzistiranja ostataka tetraciklina u jajima, direktno zavise od razlika u resorpciji leka. Doksiciklin se može utvrditi u jajima skoro mesec dana nakon prestanka uzimanja leka, dok se nakon sličnog režima doziranja, ostaci oksitetraciklina mogu utvrditi u periodu od 3 do 4 dana, a hlortetraciklina do 6 dana nakon primene (Nogawa i sar., 1981; Roudaut i sar., 1989).

ZAKLJUČAK

Široka i neracionalna upotreba lekova kod životinja, čiji se proizvodi koriste za ishranu ljudi (pored svih drugih štetnih efekata) neminovno dovodi do povećanja rizika od zaostajanja određene količine ovih lekova u hrani životinjskog porekla. Kako se ostaci antimikrobnih lekova mogu deponovati i u jajima, posebnu pažnju treba posvetiti upotrebi ovih lekova kod živine, odnosno koka nosilja konzumnih jaja.

U Evropskoj uniji je odobreno 6 antimikrobnih lekova, koji se mogu koristiti u terapiji kod kokošaka nosilja konzumnih jaja. To su: *neomicin, eritromicin, tilozin, oksitetraciklin, hlortetraciklin i kolistin*.

U Republici Srbiji i nekim susednim državama ne koriste se antimikrobni lekovi za lečenje koka nosilja. Međutim, kako u susedstvu, tako i dalje ima zemalja, koje su odobrile primenu antimikrobnih lekova kod koka nosilja konzumnih jaja. Ovo se uglavnom odnosi na one antimikrobne lekove koji se malo ili uopšte ne resorbuju iz digestivnog trakta.

Imajući sve ovo u vidu, postavlja se pitanje, da li mi znamo šta se dešava na terenu i da li se zaista poštuje zabrana upotrebe antimikrobnih lekova kod koka nosilja. Pretpostavljamo da se zabrana ne poštuje u potpunosti i to je upravo bio povod za ovu temu, odnosno ovaj rad.

Zbog toga predlažemo da se dobro razmisli o ovom problemu i eventualno odobri neki od lekova koji su odobreni u EU, pre svega onih koji se ne resorbuju iz digestivnog trakta.

LITERATURA

1. Adams HR. 2001. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa State University Press/Ames. 8th Edition. 2. Anadon A, Bringas P, Martinez-Larranaga M.R. & Diaz MJ. 1994a. Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in the chicken. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 17: 52-58. 3. Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Diaz MJ, Bringas P, Fernandez MC, Fernandez-Cruz, ML, Iturbe J.

& Martinez, MA. 1994b. Pharmacokinetics of doxycycline in broiler chickens. *Avian Pathology*. 23: 79–90. **4.** Bennett M, Elliott J, Sommerville LM. & Taylor MA. 2001. Drugs used in the treatment of bacterial, fungal, viral, and protozoal infections. In *The Veterinary Formulary*, 5th edn. Ed. Bishop, Y. 135– 218. Pharmaceutical Press, Cambridge. **5.** Bishop Y. 2001. *The Veterinary Formulary*, 5th edn, p 692. Pharmaceutical Press, London. **6.** Botsooglou NA. & Fletouris D.J. 2001. Drug Residues in Food. Marcel Dekker, Inc., New York. **7.** Brown SA. and Riviere J.E. 1991. Comparative pharmacokinetics of aminoglycoside antibiotics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 14: 1–35. **8.** Chopra I. and Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65: 232–260. **9.** Ćupić V. 1997. Zaostaci lekova u jestivim tkivima životinja. Sitoprint, Subotica. **10.** Ćupić V, Teodorović V, Simić I. 1997. Ostaci lekova u namirnicama animalnog porekla. Veterinarski fakultet u Beogradu i Društveno preduzeće „Unifarm” Šabac. **11.** Ćupić V, Dobrić S. 2003. Sadašnje stanje i perspektive u razvoju antimikrobnih lekova. *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 2: 36-42. **12.** Ćupić V, Živanov D. 1990. Sporedna i neželjena dejstva lekova. *Veterinarski glasnik*. 46:513-517. **13.** Ćupić V, Muminović M, Kobal S, Velev R. 2019. Pharmacology for students of veterinary medicine. Belgrade, Sarajevo, Ljubljana, Skoplje. Naučna KMD, Beograd. **14.** Ćupić V, Silva Dobrić S, Saša Ivanović S, Saša Vasilev S, Romel Velev R, Ćupić Miladinović D. 2019. Neracionalna primena veterinarskih lekova – rizik za javno zdravlje. Zbornik sažetaka radova 14. Kongresa farmakologa i 4. Kongresa kliničke farmakologije Srbije. Novi Sad, 18. – 21. 09. 2019. str. 117. **15.** Ćupić V, Dobrić S, Antonijević B, Čelebićanin S. Nove preporuke o zabrani korišćenja lekova u veterinarskoj medicini. Zbornik sažetaka radova. 13. Kongres farmakologa i 3. Kongres kliničke farmakologije Srbije, Palić, 5-8, 10. 2011. **16.** Davis J, Smith GW, Baynes RE, Tell LA, Webb AI, Riviere JE. 2009. Update on drugs prohibited from extralabel use in food animals. *J. Am Vet Med Assoc*. 235: 528-534. **17.** Dorrestein GM, Vangogh H. & Rinzema JD. 1984. Pharmacokinetic aspects of penicillins, aminoglycosides and chloramphenicol in birds compared to mammals – a review. *Veterinary Quarterly*. 6: 216–224. **18.** Filazi A, Sireli UT. & Cadirci O. 2005. Residues of gentamicin in eggs following medication of laying hens. *British Poultry Science*. 46: 580– 583. **19.** Frazier DL, Jones MP. & Orosz SE. 1995. Pharmacokinetic considerations of the renal system in birds: part II. Review of drugs excreted by renal pathways. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 9: 104–121. **20.** Goetting VK, Lee KA, Tell LA. 2011. Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy*, 34:521-556. **21.** Giguere S, Prescott JF, Dowling MP. 2013. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Fifth Edition. Iowa State University Press/Ames. **22.** Nogawa H, Nagura S, Tsuchiya M. & Yonezawa S. 1981. Residues of tetracycline antibiotics in eggs laid by hens given drinking water medicated. Annual Report of the National Veterinary Assay Laboratory. 18: 25–30. **23.** Papich MG. & Riviere JE. 2001. Chloramphenicols and derivatives, macrolides, lincosamides, and miscellaneous antimicrobials. In *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8th edn. Ed. Adams, H.R., pp. 868– 917. Iowa State University Press, Ames, IA. **24.** Payne MA. et al.: 1999. *JAVMA*. 215: 28-32. **25.** Roudaut B. 1989b. Residues of aminoglycosides antibiotics in eggs after medication of laying hens. *British Poultry Science*. 30: 265–271. **26.** Roudaut B, Moretain JP. & Boisseau J. 1989. Excretion of tetracycline and chlortetracycline in eggs after oral medication of laying hens. *Food Additives and Contaminants*. 6: 71–78. **27.** Yoshida M, Kubota D, Yonezawa S, Nakamura H, Yamaoka R. & Yoshimura H. 1973. Transfer of dietary chlortetracycline into eggs and its disappearance from eggs and from the liver. *Japanese Poultry Science*. 10: 261–268.

THE APPLICATION OF ANTIMICROBIAL DRUGS IN LAYING HENS: FOR AND AGAINST

**Vitomir Ćupić, Saša Ivanović, Sunčica Borožan, Gordana Žugić,
Indira Mujezinović, Dejana Ćupić Miladinović, Jelena Aleksić**

Summary

Today, antimicrobial drugs are primarily used for the prevention and treatment of poultry diseases, and often for growth stimulation in broilers. In a certain number of countries, antimicrobial drugs are also applied to laying hens, but there are also those, including our country, where their use is prohibited. In the European Union, 6 antimicrobial drugs have been approved for use in laying hens. These are: colistin, tylosin, neomycin, oxytetracycline, chlortetracycline and erythromycin.

Taking into account the fact that these drugs are often used irrationally, there are great chances that their residues will be found not only in poultry meat, but also in eggs in a certain period after the cessation of treatment. In addition to drugs approved by the European Union, residues of the mentioned drugs in eggs can be the result of wrongly applied medicated feed, contamination of feed with some antimicrobial drug during mixing, as well as "extra-label" use of drugs in poultry. Antimicrobial drugs are distributed in the body and deposited in eggs, mainly in the yolk, where they usually stay longer, compared to the albumen. Drugs that are poorly absorbed from the gastrointestinal tract (aminoglycosides, aminocyclitols, polymyxins) cannot be determined in eggs, while the residues of some antimicrobial drugs, which are absorbed from the digestive tract, can be detected up to two months (e.g. chloramphenicol) after the last treatment. The rational use of drugs in veterinary medicine has multiple importance. The use of each drug, only when it is really necessary (indicated), in the right dose and the right way, not only to reduce the potential harm from their use, but also to increase the effectiveness, and most importantly, the risk of developing resistance in of microorganisms would be significantly reduced.

Key words: albumen, antimicrobial drugs, laying hens, poultry, residues, yolk

ULOGA DIJAMETRA ADIPOCITA U REGULACIJI METABOLIZMA LIPIDA U PERIPARTALNOM PERIODU KOD VISOKOMLEČNIH KRAVA

*Radiša Prodanović, Ivan Vujanac, Jovan Bojkovski, Sreten Nedić,
Sveta Arsić, Ljubomir Jovanović, Danijela Kirovski*

Kratak sadržaj

Poseban značaj u istraživanjima vezanim za metabolizam visokomlečnih krava, pridaje se ispitivanju uloge dijametra adipocita u regulaciji metabolizma lipida u peripartalnom periodu. Tokom perioda zasušenja, metabolizam je pod jakim uticajem insulina, dominiraju anabolički procesi i postoji opasnost da nastane suficit energije i uvećanje telesne mase životinja na račun uvećanja depoa masti i/ili veličine masnih ćelija. Pouzdano je utvrđeno da adipociti većeg dijametra imaju jače izraženu lipolitičku aktivnost i osetljivost na delovanje lipolitičkih hormona. Prekomerno nakupljanje masti u telesnim depoima i/ili nastala rezistencija tkiva na insulin, imaju za posledicu intenziviranje procesa lipolize i priliv slobodnih masnih kiselina u ćelije jetre koji prevazilazi njihov metabolički kapacitet. Posledica je izostanak pune kontrole mobilizacije masti iz telesnih depoa i lipogeneze u ćelijama jetre, što se posebno ispoljava u ranom postpartalnom periodu. Nasuprot tome, kod krava kod kojih se u periodu zasušenja, adipociti ne optereće prekomernim količinama lipida, ove ćelije imaju sposobnost da akumuliraju veće količine lipida u postpartalnom periodu. One tako imaju aktivnu ulogu u postizanju adekvatne ravnoteže između intenziteta lipogeneze i lipolize. Promene u veličini adipocita koje su kod visokomlečnih krava najvećim delom uslovljene ishranom i/ili energetske statusom životinja, su odgovorne za regulaciju metabolizma lipida na nivou masnog tkiva u peripartalnom periodu.

Ključne reči: *adipociti, dijametar, krava, metabolizam*

UVOD

U ispitivanjima koja su obavljena u proteklom periodu dokazano je da kod visokomlečnih krava, pre svega holštajn rase, u peripartalnom periodu nastaju veoma značajne promene u energetske metabolizmu (Bell, 1995; Ingvarsten, 2006). Naročito se ističu izrazite promene u metabolizmu masnog tkiva, koje do-

¹Dr sci. vet. med. Radiša Prodanović, docent; dr sci. vet. med. Ivan Vujanac, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Jovan Bojkovski, redovni profesor; dr sci. vet. med. Sreten Nedić, asistent; dr vet. Sveta Arsić, asistent; dr sci. vet. med. Ljubomir Jovanović, docent; dr sci. vet. med. Danijela Kirovski, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

e-mail autora za korespondenciju: prodanovic@vet.bg.ac.rs

vode do povećanja koncentracije masnih kiselina u krvnoj plazmi, kao i nakupljanja masti u ćelijama jetre (McNamara, 1995; Vernon, 2005). Sve to ukazuje na pojačanu mobilizaciju masti iz telesnih depoa, koje treba da posluže kao dopunski izvor energije u periodu oko teljenja (Drackley i sar., 2001). Kada je količina energije koja je potrebna za uzdržne potrebe i proizvodnju mleka jednaka količini energije iz hraniva i telesnih depoa, uspostavlja se fiziološki negativan bilans energije. U slučaju da je potrebno više energije, nego što se dobija iz hrane i telesnih rezervi, nastaje patološki negativan bilans energije (Jorritsma i sar., 2003). Krajnji rezultat patološkog negativnog bilansa energije je prekomerno nakupljanje masti u ćelijama jetre, što neretko, predstavlja uzrok bolesnih stanja koja su obeležje peripartalnog perioda (Grummer i sar., 2010; Šamanc i sar., 2011). Međutim, još uvek je otvoreno pitanje zašto u slučaju izrazitog nedostatka energije, organizam visokomlečnih krava, iako raspolaže značajnim količinama jedinjenja bogatih energijom, nije u mogućnosti da ih koristi, već se ona mobilišu iz primarnog depoa (masno tkivo) i transportuju u druga telesna tkiva (jetra, bubrezi, mišići i drugo) stvarajući alternativne depoe štetne po zdravlje životinja. Upravo je ova nepoznanica bila predmet istraživanja u okviru našeg rada kako bi se što je moguće više doprinelo rasvetljavanju složene etiopatogeneze ovog fenomena.

Uzroci zamašćenja jetre su kompleksni i mnogobrojni (Reid i sar., 1986; Bobe i sar., 2004; Šamanc i sar., 2010). Čini se da od svih, do sada poznatih činilaca, gojaznost krava u zasušenju predstavlja jedan od najznačajnijih. To je prvenstveno zbog toga što je kod takvih životinja intenzitet lipomobilizacije u pozitivnoj korelaciji sa količinom masti u telesnim depoima, dok je kod krava optimalne telesne kondicije to skoro uvek u korelaciji sa energetske potrebama (Rukkwamsuk i sar., 1999; Dann i sar., 2006; Douglas i sar., 2006; Šamanc i sar., 2008). Za ovo postoji više tumačenja, ali se najviše ističe da se prilikom enormnog povećanja količine masnog tkiva, istovremeno i proporcionalno, povećava i veličina masnih ćelija (Rosen i MacDougald, 2006; Hausman i sar., 2009). To može da bude razlog što se u kritičnom periodu oko teljenja pojačava lipolitička aktivnost i/ili osetljivost ovih ćelija na delovanje lipolitičkih činilaca (McNamara i Hillers, 1986; De Koster et al., 2016), a smanjuje prema glukozu i insulinu (Rukkwamsuk i sar., 1999). Ako se ima u vidu činjenica da je uloga adipocita u lučenju leptina i proinflammatornih citokina (Chilliard i sar., 2001; Ohtsuka i sar., 2001; Looor i sar., 2006) depo specifična, a za njih se zna da inhibitorno utiču na apetit i osetljivost tkiva na insulin, onda postaje jasnije zašto kod ugojenih krava izostaje puna kontrola mobilizacije masti iz telesnih depoa i lipogeneze u ćelijama jetre.

PROMENA DIAJMETRA ADIPOCITA U PERIPARTALNOM PERIODU

Rezultati ispitivanja dijametra adipocita u subkutanom masnom tkivu kod ugojenih i krava sa optimalnom telesnom kondicijom, dobijeni u mnogobrojnim istraživanjima, su najbolja potvrda prethodno iznetih shvatanja (De Koster et al., 2016; Depreester et al., 2018). Kod ugojenih krava, u antepartalnom periodu, dijametar adipocita je skoro dvostruko veći u poređenju sa vrednostima dobijenim

kod krava optimalne telesne kondicije. Međutim, u postpartalnom periodu, dijаметar adipocita je približno isti, s tim da kod ugojenih krava dolazi do smanjenja dijametra u odnosu na antepartalni period, a kod krava optimalne telesne kondicije se dijаметar značajno povećava. Ovi rezultati zaslužuju posebnu pažnju, kako sa teorijskog tako i praktičnog aspekta, zbog toga što ukazuju na razlike u regulaciji prometa masti kod krava u periodu oko teljenja u zavisnosti od stanja uhranjenosti, kao što su u svojim eksperimentima dokazali mnogi autori (Schoenberg i sar., 2012; De Koster i sar., 2016). Može se reći da je paradoksalno to, što je kod krava optimalne telesne kondicije dijаметar adipocita značajno veći postpartalno u odnosu na vrednosti u antepartalnom periodu i to je potpuno u suprotnosti u odnosu na njihov energetska status. Prema svemu sudeći, kod krava optimalne telesne kondicije adipociti imaju sposobnost da akumuliraju manje ili veće količine lipida i tako igraju aktivnu ulogu u regulaciji prometa ovih jedinjenja, pogotovo u uslovima kada nastaju izrazite promene u energetska metabolizmu. Ako se uzmu u obzir nivoi ekspresije proteina insulinskog receptora i transportnih molekula za glukozu u telesnim tkivima dobijenim u istim fazama ispitivanja, onda se može oceniti da kod krava optimalne telesne kondicije nema ograničenja u pogledu korišćenja energetska prekursora (Ji i sar., 2012). Takođe, u prilog navedenoj tvrdnji o očuvanoj anaboličkoj ulozi insulina u metabolizmu masti kod krava optimalne kondicije u ovom periodu, govore i vrednosti izračunatih i izvedenih parametara (AUC_{NEFA}) testa opterećenja glukozom (Prodanović i sar., 2016). Kod ugojenih krava, kod kojih se adipociti još u antepartalnom periodu ispune mastima do krajnjih granica, značajno je povećana ekspresija gena za apoptozu (Peng, 2011; Mann, 2022) o čemu svedoči i njihova masovna destrukcija (adipoliza) u ranom postpartalnom periodu. Zbog toga se njihova uloga isključivo svodi na nekontrolisano otpuštanje masnih kiselina. Nasuprot tome, kod krava optimalne kondicije je u ranom postpartalnom periodu, značajno povećana ekspresija gena za proliferaciju adipocita (Contreras i sar., 2017). Zbog toga adipociti u tom istom periodu kod krava optimalne telesne kondicije imaju presudnu ulogu u postizanju adekvatne ravnoteže između intenziteta lipogeneze i lipolize, ali ne samo u odnosu na trenutne energetske potrebe, već i na mogućnosti jetre i drugih tkiva da masne kiseline koriste kao izvor energije. U svakom slučaju, navedeni rezultati upravo potvrđuju ranije izneta gledišta nekih autora da su promene u veličini adipocita kod visokomlečnih krava najvećim delom uslovljene ishranom i/ili energetska statusom životinja. One su odgovorne za regulaciju metabolizma lipida na nivou masnog tkiva u peripartalnom periodu (McNamara, 1995; Rukkhwamsuk i sar., 1999; Chilliard i sar., 2001).

DIJAMETAR ADIPOCITA I ZAMAŠĆENJE ČELIJA JETRE

Danas je opšte prihvaćeno da ugojenost krava u periodu zasušenja i stepen osetljivosti tkiva na insulin, pre i posle teljenja, imaju ključni uticaj na sposobnost krava da se prilagode na negativan bilans energije koji nastaje na početku laktacije. Dokazano je da se sa približavanjem partusa kod ugojenih krava smanjuje

osetljivost tkiva na insulin. Blagi stepen rezistencije nastaje već na sredini perioda zasušenja, a najizraženija odstupanja nastaju u poslednjim danima graviditeta i neposredno posle partusa kada se stepen insulinske rezistencije pojačava (De Koster i sar., 2016; Prodanović i sar., 2016). Sve to dovodi do neadekvatne adaptacije životinja na visoku mlečnost. Pored promena u korišćenju glukoze, nastaju izrazite promene u metabolizmu masnog tkiva, praćene porastom koncentracije masnih kiselina u cirkulaciji, što predstavlja neposrednu opasnost za morfološki i funkcionalni integritet jetre. Drugim rečima, promene u insulinskoj regulaciji metaboličkih funkcija kod ugojenih krava stvaraju povoljne uslove da se proces lipomobilizacije odvija intenzivnije nego kod krava optimalne telesne kondicije i u skladu sa količinom masti u telesnim depoima, a ne sa stvarnim energetske potrebama organizma. Već je istaknuto da se kod ugojenih krava zbog prekomernog nakupljanja masti u telesnim depoima istovremeno i proporcionalno povećava i veličina masnih ćelija. To je razlog što se u kritičnom periodu oko teljenja pojačava lipolitička aktivnost i osetljivost ovih ćelija na delovanje lipolitičkih hormona (Mann, 2022). Zbog toga izostaje puna kontrola mobilizacije masti iz telesnih depoa i lipogeneze u ćelijama jetre. Prema svemu sudeći, masno tkivo je jedno od glavnih mesta homeoretske kontrole u periodu oko teljenja i mnoge strategije ishrane krava su upravo osmišljene sa ciljem kontrole metaboličke aktivnosti masnog tkiva (Rukkwamsuk i sar., 1999; Grummer i sar., 2010; Mann, 2022).

U vezi sa navedenim činjenicama, mogu se razmatrati i rezultati ispitivanja sadržaja ukupnih lipida u ćelijama jetre u peripartalnom periodu. Kao što je poznato, jetra je organ u kome se odvija proces lipogeneze pa zbog toga u peripartalnom periodu ima ključnu ulogu u regulaciji energetskeg metabolizma. Da bi ostvarila ove i mnogobrojne druge funkcije, veoma je važno da u ovom periodu bude očuvan njen morfološki integritet (Bobe i sar., 2004; Prodanović i sar., 2016). Kod visokomlečnih krava, masna infiltracija i degeneracija hepatocita je jedini patološki proces koji narušava njihovu funkcionalnu sposobnost u periodu oko teljenja. Kao što je navedeno, od velikog broja mogućih etioloških činilaca, čini se da je gojaznost krava u periodu zasušenja i/ili osetljivost masnog tkiva na insulin jedan od najvažnijih. U svetlu rezultata dobijenih u poslednjoj deceniji, jasno se vidi da su ugojene krave daleko podložnije nastajanju poremećaja od kojih je centralni i najvažniji problem zamašćenje jetre. Kod ugojenih krava u najužem periodu oko teljenja, redovno se ustanovljavaju značajno veći stepeni zamašćenja jetre u poređenju sa kravama optimalne telesne kondicije u istim periodima ispitivanja. U prilog tome mogu da posluže i vrednosti albuminemije i bilirubinemije dobijene u istim fazama ispitivanja kod ovakvih jedinki (Šamanc i sar., 2011; Prodanović i sar., 2012). Mada kod ugojenih i krava optimalne telesne kondicije, dolazi do porasta u koncentraciji NEFA u krvi u tom periodu (od 10. dana antepartalno do 14. dana postpartalno), često se ne ustanovljava značajna razlika u njihovoj koncentraciji u krvi između ove dve grupe krava (De Koster i sar., 2016; Prodanović i sar., 2016). Opet, malo je verovatno da je samo razlika u intenzitetu lipomobilizacije uzrok većeg stepena zamašćenja jetre kod ugojenih

krava. Verovatno je da postoje i drugi razlozi za to. Prodanović i sar. (2016) su na osnovu rezultata testova opterećenja glukozom izneli stav da je kod ugojenih krava smanjena osetljivost perifernih tkiva, masnog i mišićnog, na insulin. Ako se posmatraju bazalne vrednosti insulinemije u sva četiri perioda ispitivanja onda se može videti da kod svih krava uključenih u ogled, dobijene vrednosti slede očekivani fiziološki trend, ali su one kod ugojenih krava značajno veće osim 28. dana antepartalno, kada razlika nije statistički značajna. Ako se u obzir uzimaju vrednosti glikemije dobijene u istim fazama ispitivanja kao i ekspresija proteina insulinskih receptora u telesnim tkivima, onda se može proceniti da je kod ugojenih krava korišćenje energetske prekursora ograničeno (Prodanović i sar., 2016). To neminovno dovodi do toga da iz sistemske cirkulacije u ćelije jetre pristižu veće količine NEFA, pogotovo onda kada je njihova koncentracija u krvi značajno veća od fiziološke vrednosti (Drackley i sar., 2001). Međutim, to isto može da se dogodi i kada je koncentracija NEFA u granicama fizioloških vrednosti. Tako, na primer, na deset dana antepartalno kada je koncentracija NEFA približno ista kod obe grupe krava, kod ugojenih krava je još u ovom periodu ustanovljen veći stepen zamašćenja jetre nego što je to bio slučaj kod krava optimalne telesne kondicije (Prodanović i sar., 2016). U isto vreme, kod ugojenih krava je ustanovljena značajno veća koncentracija insulina i glukoze u krvi, što potvrđuje tezu da kod ugojenih krava zbog rezistencije tkiva na insulin postoje svi uslovi da značajno veće količine NEFA mogu da pristižu i prekomerno opterete ćelije jetre. To neminovno dovodi do zastoja u prometu masti i njihovog progresivnog nakupljanja u ćelijama jetre.

ZAKLJUČAK

Prekomerno nakupljanje masti u telesnim depoima, o čemu svedoči značajno veći dijametar adipocita kod ugojenih krava, predstavlja poremećaj koji može da bude odgovoran za nekontrolisanu mobilizaciju masti u ranom postpartalnom periodu. Ako se tome doda i podatak da kod ugojenih krava postoji određen stepen rezistencije perifernih tkiva na insulin, onda postaje jasnije zašto se kod ovih životinja u masnom tkivu postpartalno intenzivnije odvija proces lipolize, a u ćelijama jetre NEFA dospevaju u količinama koje prevazilaze njihov metabolički kapacitet. Praktično rečeno, po sredi su dva povezana mehanizma. Prvo, adipociti kod ugojenih krava postpartalno veoma malo mogu da doprinose uravnoteženju prometa masti, a sa druge strane, zbog rezistencije tkiva na insulin značajno veće količine ovih jedinjenja dospevaju u ćelije jetre.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Bell A.W., 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J AnimSci* 73:2804–19.
2. Bobe G., Young J.W., Beitz D.C. 2004. Invited Review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci* 87:3105–24.
3. Chilliard Y., Bonnet M., Delavaud C., Faulconnier Y., Leroux C., Djiane J. et al, 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol* 21:271–95.
4. Contreras G.A., Strieder-Barboza C., Raphael W. 2017. Adipose tissue lipolysis and remodeling during the transition period of dairy cows. *J Anim Sci Biotechnol.* 5, 8:41.
5. Dann H.M., Litherland N.B., Underwood J.P., Bionaz M., D'Angelo A., McFadden JW et al, 2006. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *J Dairy Sci* 89:3563–77.
6. De Koster J., Van den Broeck W., Hulpio L., Claeys E., Van Eetvelde M., Hermans K. et al, 2016. Influence of adipocyte size and adipose depot on the in vitro lipolytic activity and insulin sensitivity of adipose tissue in dairy cows at the end of the dry period. *J Dairy Sci.* 99:2319-28.
7. Depreester E., De Koster J., Van Poucke M., Hostens M., Van den Broeck W., Peelman L. et al, 2018. Influence of adipocyte size and adipose depot on the number of adipose tissue macrophages and the expression of adipokines in dairy cows at the end of pregnancy. *J Dairy Sci.* 101:6542-55.
8. Douglas G.N., Overton T.R., Bateman H.G., Dann H.M., Drackley J.K. 2006. Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source, affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows. *J. Dairy Sci* 89:2141–57.
9. Drackley J.K., Overton T.R., Douglas G.N. 2001. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 84:100-12.
10. Grummer R.R., Wiltbank M.C., Fricke P.M., Watters R.D., Silva-Del-Rio N. 2010. Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J Reprod Dev.* 56 Suppl: S22–28.
11. Hausman G.J., Dodson M.V., Ajuwon K., Azain M., Barnes K.M., Guan L.L. et al, 2009. Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J Anim Sci* 87:1218–46.
12. Ingvarstsen K.L. 2006. Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Anim Feed Sci Technol.* 126:175–213.
13. Ji P, Osorio J.S., Drackley J.K., Looor J.J.. 2012. Overfeeding a moderate energy diet prepartum does not impair bovine subcutaneous adipose tissue insulin signal transduction and induces marked changes in peripartal gene network expression. *J Dairy Sci.* 95:4333-51.
14. Looor J.J., Dann H.M., Janovick Guretzky N.A., Everts R.E., Oliveira R., Green C.A. et al, 2006. Plane of nutrition prepartum alters hepatic gene expression and function in dairy cows as assessed by longitudinal transcript and metabolic profiling. *Physiol Genomics* 27:29–41.
15. Mann S. 2022. Symposium review: The role of adipose tissue in transition dairy cows: Current knowledge and future opportunities. *J Dairy Sci.* 105:3687-701.
16. McNamara J.P. 1995. Role and regulation of adipose tissue metabolism during lactation. *J Nutr Biochem* 6:120–9.
17. McNamara J.P., Hillers J.K. 1986. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 2. Lipolysis response to milk production and energy intake. *J Dairy Sci* 69:3042–50.
18. Ohtsuka H., Koiwa M., Hatsugaya A., Kudo K., Hoshi F., Itoh N. et al, 2001. Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. *J Vet Med Sci* 63:1021–25.
19. Peng J.I. 2011. Transcriptional adaptation of adipose tissue in dairy cows in response to energy overfeeding. Dissertation. Urbana, Illinois.
20. Prodanović R., Kirovski D., Šamanc H., Vujanac I., Ivetić V., Savić B., Kureljušić B. 2012. Estimation of herd-basis energy status in clinically healthy Holstein cows: practical implications of body condition scoring

and shortened metabolic profiles. *African J Agricultural Res* 7:418–25. **21.** Prodanović R., Korićanac G., Vujanac I., Djordjevic A., Pantelić M., Romić S. et al, 2016. Obesity-driven prepartal hepatic lipid accumulation in dairy cows is associated with increased CD 36 and SREBP-1 expression. *Res Vet Sci.* 107:16-9. **22.** Reid I.M., Roberts C.J., Treacher R.J., Williams L.A. 1986. Effect of body condition at calving on tissue mobilization, development of fatty liver, and blood chemistry of dairy cows. *Anim Prod* 43:7–15. **23.** Rosen E.D., Mac Dougald O.A. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev mol Cell Biol.* 7:885–96. **24.** Rukkwamsuk T., Wensing T., Geelen M.J. 1999. Effect of overfeeding during the dry period on the rate of esterification in adipose tissue of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 82:1164–9. **25.** Schoenberg K.M., Ehrhardt R.M., Overton T.R. 2012. Effects of plane of nutrition and feed deprivation on insulin responses in dairy cattle during late gestation. *J Dairy Sci* 95:670–82. **26.** Šamanc H., Kirovski D., Jovanović M., Vujanac I., Bojković-Kovačević S., Jakić-Dimić D. et al, 2010. New insights into body condition score and its association with fatty liver in Holstein dairy cows, *Acta Veterinaria – Belgrade.* 60:525–40. **27.** Šamanc H., Kirovski D., Jovanović M., Vujanac I., Prodanović R., Kuruc A. et al, 2008. Mogućnost preveniranja masne jetre u peripartalnom periodu. *Vet glasnik* 62:13-24. **28.** Šamanc H., Kirovski D., Stojić V., Stojanović D., Vujanac I., Prodanović R. et al, 2011. Application of the metabolic profile test in the prediction and diagnosis of fatty liver in Holstein cows. *Acta Vet-Belgrade.* 61:543-53. **29.** Vernon R.G. 2005. Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J Dairy Res.* 72:460–9.

TEMATSKO ZASEDANJE IV
PLENARY SESSION IV

ULOGA VETERINARSKE SLUŽBE U
RAZVOJU LOVSTVA
ROLE OF VETERINARY SERVICES IN
THE DEVELOPMENT OF HUNTING

NAŠA ISKUSTVA U PRIMENI BIOSIGURNOSNIH MERA U FAZANERIJAMA

Milutin Đorđević¹, Oliver Radanović², Branislav Pešić¹

Kratak sadržaj

Fazanerije predstavljaju farmske objekte poluzatvorenog tipa, sa nekoliko proizvodnih celina koje su ciklično povezane i u kojima se gaje jedinke različitih starosnih kategorija. Lokacija fazanerija, istovremeni uzgoj različitih starosnih kategorija unutar ekonomskog dvorišta, uzgoj jedinki u objektima poluzatvorenog tipa, potencijalni uticaj različitih patogenih faktora iz okruženja, definišu fazanerije sa aspekta biosigurnosti kao objekte visokog zdravstvenog rizika. Zbog toga je za uspešnu farmsku proizvodnju fazanske divljači potrebno kontinuirano sprovođenje biosigurnosnih mera u svim fazama tehnološkog postupka proizvodnje. Najvažnije biosigurnosne mere koje se sprovode u fazanerijama su dezinfekcija i deratizacija. U radu su prikazani dosadašnji rezultati efekata sprovođenja navedenih biosigurnosnih mera u fazanerijama.

Ključne reči: biosigurnosne mere, deratizacija, dezinfekcija, fazanerije

Poligonski lov fazanske divljači, atraktivnost lova fazana u otvorenim lovištima, uz potrebu za očuvanjem optimalne brojnosti populacije u prirodi, uticao je na povećanje proizvodnje veštačkim uzgojem u fazanerijama. Osnova uspešnosti veštačkog uzgoja fazana u farmским uslovima je strogo poštovanje tehnoloških normativa i kontinuirano sprovođenje biosigurnosnih mera, kako bi proizvedene jedinke bile u maksimalnoj kondiciji i dobrog zdravstvenog statusa (Đorđević, 2009).

Fazanska divljač predstavlja najbrojniju i najproduktivniju lovnu vrstu ptica, kako u Srbiji, tako i u lovištima širom sveta, zahvaljujući visokoj adaptibilnosti na različita staništa i sve promene koje se dešavaju u prirodi. U prilog ovim činjenicama idu i literaturni podaci koji ukazuju da je porast brojnosti fazanske divljači koja se ispušta u lovišta nastao usled povećanog interesovanja lovaca za lov ove vrste ptica, ali i povećanog zahteva tržišta za kvalitetnim mesom divljači (Downie 2012, Woodard 1983).

¹Dr sci. vet. med. Milutin Đorđević, redovni profesor; dr vet. Branislav Pešić, doktorand, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Oliver Radanović, stručni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, R. Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: milutin@vet.bg.ac.rs

Fazan (*Phasianus colchicus*) je široko rasprostranjena vrsta divljači iz reda *Galliformes*. On potiče iz predela srednje Azije, ali je još u vreme starog Rima do net u Evropu, gde se brzo adaptirao na postojeće uslove i raširio u velikom broju po celoj Evropi. Naseljava pretežno šumske i livadske pojaseve, često se sreće i u poljoprivrednim kulturama, a takođe i u priobalnim delovima gde pronalazi obilje hrane.

Fazanerije predstavljaju farmske objekte poluzatvorenog tipa koji se koriste za reprodukciju, uzgoj i čuvanje fazana do momenta puštanja u lovišta. Fazanerije uglavnom imaju zaokružen ciklus proizvodnje, sa različitim starosnim kategorijama životinja unutar ekonomskog dvorišta i sastoje se od proizvodnih celina i pratećih objekata koje će u daljem delu rada biti posebno definisane.

Tehnologija farmskog uzgoja fazana je kompleksan postupak koji se odvija kroz ciklični niz, počevši od proizvodnje jaja u selekcionisanim matičnim jatima, njihovog skladištenja u posebnim prostorijama, leženja u inkubatorima i valjanostima, odgoja novoizleženih jedinki u specijalnim prostorijama za odrastanje fazančića od prvih dana do uzrasta kada su najpogodniji za privikavanje na život u prirodi, zavisno od pravca proizvodnje, preko ishrane i preventivnih mera zdravstvene zaštite. Sama biosigurnost u fazanerijama podrazumeva sprovođenje određenih mera čiji je cilj sprečavanje ili redukcija potencijalnih kontakata patogenih uzročnika određenih bolesti sa jedinkama koje se nalaze u fazaneriji.

Da bi se definisao pravilan biosigurnosni protokol i sprovele biosigurnosne mere neophodno je poznavati tehnološki postupak proizvodnje i biologiju fazana, uključujući i bolesti koje se najčešće javljaju kod ove populacije. Farmski uzgoj fazana podrazumeva istovremeno držanje različitih starosnih kategorija fazana u velikom broju na malom prostoru, što u praksi, za razliku od fazana u prirodi, gde postoji ravnoteža između organizma sa dobrim imunskim sistemom i relativno malog broja patogenih uzročnika bolesti, predstavlja veliki zdravstveni rizik. Koncentracija velikog broja jedinki na relativno maloj površini i zatvoreni prostor kao stresor utiču na slabljenje imuniteta, što dovodi do povećanog rizika za pojavu bolesti unutar same populacije i često rezultira masovnim uginućima i velikim ekonomskim štetama.

Kao rizični putevi za unošenje patogena, posmatrano uopšte, definisani su radnici ili posetioci fazanerija, vozila i transportna sredstva, aktivnost divljih životinja pre svega divljih ptica i glodara koji su često u blizini fazanerija, kao i unošenje jata ili određenog broja jedinki nepoznatog zdravstvenog statusa u ekonomska dvorišta ili u same proizvodne celine fazanerija. Zato se kao najvažnije biosigurnosne mere definišu, mere kontrole saobraćaja, mere izolovanja živine od zaražene opreme i zaraženih životinja, mere regulacije brojnosti populacija insekata i glodara, dezinfekcija i dobar higijenski status fazanerije i ekonomskog dvorišta.

Patogeni uzročnici bolesti se prenose sa mesta na mesto nošeni đubretom, prašinom, perima, putem vazduha ili preko ljudi, putem opreme, vozila za transport, životinjama i drugim pticama. Imajući na umu da smo definisali vlasni-

ke objekata, posetioce i radnike, kao faktore biološkog rizika, u cilju pravilnog sprovođenja biosigurnosnih mera neophodno je da članovi porodice koji su angažovani na poslovima u okviru fazanerije, kao i svi zaposleni, svakodnevno nose opranu odeću i čistu obuću i da ukoliko poseduju privatne posede ne gaje živinu u svojim gazdinstvima. Svi posetioci fazanerije moraju se prijaviti i evidentirati na prijemu tj. centrali pre ulaska u objekte. Ni jednom posetiocu, uključujući i predstavnike organa službe, inspekcije i drugih nadležnih organa ne dozvoljavati da uđu u proizvodnu celinu objekta, same objekte i druge prostorije ukoliko nemaju čistu odeću, dezinfikovane kombinizone, oprane i dezinfikovane čizme i kapu, uz opravdani razlog ulaska, vodeći računa o stepenu zdravstvenog rizika. Važno je posebno definisati obavezu čišćenja i dezinfekcije čizama pre ulaska i po izlasku iz proizvodnih celina objekta.

Fekalni otpad iz fazanerija predstavlja veliki epidemiološko-epizootiološki rizik i kao takav je jedan od najodgovornijih za širenje bolesti između proizvodnih celina u okviru fazanerije. Ukoliko u okviru ekonomskog dvorišta postoji veći broj proizvodnih celina potrebno je da za svaki postoje pripremljene posebne čizme, a u njihovom nedostatku, potrebno je pre ulaska u svaki objekat promeniti navlake za obuću.

Za radnike i ostala angažovana lica obavezno je kupanje pre napuštanja fazanerije, u cilju sprečavanja potencijalnog širenja patogenih uzročnika na druge farmske objekte ili namirnice. Ukoliko postoji mogućnost, ograničiti rad zaposlenih radnika na samo jednu proizvodnu celinu u okviru fazanerije, uz posebne mere zabrane posete različitih objekata od strane radnika u okviru istog ekonomskog dvorišta, kao i poseta objektima i farmama u okviru drugih gazdinstava. Ukoliko nije moguće obezbediti radnike koji rade samo u objektu gde se nalazi matično jato, u objektima za mlade fazančiče i objektima za odgoj fazana u volijerama, radnici jutarnji ciklus poslova uvek počinju od najmlađe kategorije i završavaju ga kod starijih kategorija. To isto važi i za popodneve poslove.

Unutar same fazanerije, zabranjeno je posećivati različite starosne kategorije, naročito posećivati mlade kategorije nakon posete starijim. Ukoliko posete nije moguće izbeći pre posete mladim jedinkama, obavezno promeniti odeću i okupati se. U savremenim objektima za odgoj fazana praktikuje se da radnici nose odeću različitih boja u cilju kontrole kretanja unutar proizvodnih celina fazanerija.

Oprema u unutrašnjosti proizvodnih celina, kao i ostala oprema koja se koristi u okviru fazanerija, predstavlja izuzetno važan faktor zdravstvenog rizika, te je stoga potrebno tokom rada sa istom preduzeti niz principa u cilju zadovoljenja standarda dobre proizvođačke prakse. Jedan od najvažnijih principa u postupku manipulacije sa opremom je izbegavanje pozajmljivanja opreme između proizvodnih celina unutar fazanerije, kao i između različitih fazanerija. Ukoliko je to krajnje neophodno i ne može se izbeći, potrebno je da se pre unošenja opreme sa strane ona temeljno očisti, opere i dezinfikuje.

Ukoliko je to organizaciono moguće, ograničiti ulazak vozila u ekonomsko dvorište fazanerije, uz obavezno posedovanje parkinga van ekonomskog dvorišta za zaposlene i posetioce. Sva vozila koja ulaze u ekonomsko dvorište farme treba pre ulaska da budu dezinfikovana i da prođu kroz funkcionalnu dezobarijeru.

Kutije i kartonke za jaja koje se unose u ekonomsko dvorište moraju takođe biti dezinfikovane, pri čemu je važno napomenuti da se ne praktikuje višekratno korišćenje kartonki za jaja. Svim vlasnicima fazanerija se preporučuje poslovanje sa kompanijama koje takođe sprovode biosigurnosne mere.

Pored prethodno definisanih faktora biološkog rizika, važno je napomenuti da su i same životinje veoma značajne u segmentu očuvanja biosigurnosti. Stoga je u cilju povećanja biosigurnosti na fazanerijama potrebno sprečiti svaki potencijalni kontakt fazana u veštačkom odgoju sa divljim životinjama. U postupku useljavanja novih matičnih jata, njih isključivo useljavati u prethodno pripremljene objekte, vodeći računa da su novouseljena jata poznatog zdravstvenog statusa i da ih prati zdravstvena dokumentacija izdata od ovlašćene veterinarske službe sa područja odakle dolaze.

Takođe je neophodno redovno uklanjati uginule jedinke, uz sve mere detekcije uzroka uginuća. Fekalni otpad, koji se svakodnevno produkuje, je medijum koji može nositi patogene uzročnike i zbog toga je neophodno njegovo redovno uklanjanje zavisno od tehnološkog postupka proizvodnje, kao i pravilno pakovanje na dovoljnoj udaljenosti, uz poštovanje svih standarda skladištenja i manipulacije.

Radi pravilnog i uspešnog sprovođenja biosigurnosnih mera, potrebno je odrediti osobu zaduženu za praćenje i sprovođenje biosigurnosnih mera u proizvodnim objektima. Osnova uspešnosti je dobro definisan biosigurnosni program/protokol i pravilno vođenje evidencije o svim sprovedenim merama biosigurnosti. Jednom mesečno je potrebno dokumentovati kompletnu proceduru, uz napomenu da se sva dokumentacija čuva najmanje tri godine kao sastavni deo biosigurnosnog programa.

Pored definisanih opštih mera u cilju sprečavanje prisustva ili smanjenja rizika od patogenih uzročnika, moraju se posebno definisati i sve biosigurnosne mere koje su vezane za građevinsko-tehničke karakteristike objekata i sam tehnološki postupak proizvodnje.

Na prvom mestu, to je pravilan izbor lokacije za izgradnju fazanerije, poštovanje građevinsko-tehničkih standarda prilikom izgradnje objekata, prilagođavanje brojnosti matičnog jata i pilića u uzgoju realnim proizvodnim kapacitetima objekata, sprovođenje programa dobre farmske i dobre proizvođačke prakse, sa posebnim aspektom na kontinuirano sprovođenje standardne sanitacione procedure i programa kontrole štetnih organizama, kao i merama preventivne zdravstvene zaštite koje se primenjuju u ovoj proizvodnji.

Imajući u vidu da se na fazanerijama istovremeno gaje različite starosne kategorije fazana i da se radi o objektima poluzatvorenog tipa, tokom čitavog ciklusa proizvodnje postoji veliki zdravstveni rizik od pojave različitih virusnih, bak-

terijskih, gljivičnih infekcija, kao i parazitskih infestacija. Iz navedenog razloga je neophodno kontinuirano sprovođenje mera standardne sanitacione operativne procedure u skladu sa donetim biosigurnosnim protokolom.

Jedna od najvažnijih operativnih mera sanitacione procedure je preventivna dezinfekcija, koja predstavlja kontinuiranu meru i sastavni je deo tehnološkog postupka proizvodnje u svim proizvodnim celinama. Pojava sve veće rezistentnosti bakterija na antibiotike ukazuje da se kontrola bakterijskih infekcija u narednom periodu ne može oslanjati na upotrebu antibiotika. Osim toga i visoki standardi vezani za rezidue u delu koji se odnosi na proizvodnju mesa divljači u potpunosti isključuju primenu antibiotika.

Zbog svega iznetog, neophodno je poboljšati kontrolu i preveniranje bakterijskih, virusnih, mikoloških i parazitskih infekcija, kontinuiranom primenom biosigurnosnih mera koje ispoljavaju širok spektar delovanja, koristeći lekovita sredstva samo kada je neophodno.

Osnova preventivnih mera usmerenih na sprečavanje pojave bolesti u fazanerijama se zasniva na održavanju ekspozicije mikroorganizmima ispod infektivne doze ili njihovim održavanjem na niskom nivou, tako da imunski sistem organizma može da se izbori sa infektivnim agensom, bez pojave bolesnog stanja, tj. bez pojave kliničkih znakova bolesti. Navedeno se postiže svođenjem kontakta između prijemljivih životinja i patogenih mikroorganizama na najmanju moguću meru. Redukcija brojnosti potencijalno prisutnih patogena se u terenskim uslovima postiže kontinuiranim sprovođenjem osnovnih higijenskih mera, definisanih biosigurnosnim protokolom koje smo prethodno naveli, uz redovnu primenu sanitacionih mera koje obavezno uključuju dezinfekciju opreme, površina i vazduha unutar proizvodnih celina, kao i prilikom ulaska u ekonomsko dvorište u delovima koji se odnose na zaposlene, posetioce i transportna sredstva. Takođe su od značaja i higijenske mere u postupku manipulacije sa hranom i njenim pravilnim skladištenjem i zaštitom kroz redovno sprovođenje programa kontrole štetočina.

Fazanerije su najčešće specijalizovani, poluzatvoreni, farmski objekti, sa okruženim ciklusom proizvodnje, poseduju volijeru za matična jata, prostoriju za skladištenje jaja, prostoriju za skladištenje hrane, prostoriju za ostala sredstva i opremu, prostoriju za zaposlene, inkubatorsku stanicu, prostorije za odgoj mladih fazana i volijere sa ispustima gde se vrši odgoj fazančića do momenta ispuštanja u lovište.

Volijere za odgoj matičnih jata fazana su poluzatvorene celine, sastavljene najčešće od zidanog objekta i volijere koji predstavljaju jedinstvenu celinu, u kojima se drže matična jata u cilju produkcije jaja, sa odnosom polova u rasponu od 1:5 do 1:7, zavisno od prakse, sa površinom poda po jedinki od 5-10 m². One su sa strane ograđene pletenom žicom, a odozgo mogu biti otvorene ili natkrivene žicom, pri čemu se sa biosigurnosnog aspekta, uvažavajući sve rizike koje donose divlje ptice i pernata divljač iz prirode, preporučuje natkrivanje volijera žicom. Prosečna visina volijera se kreće od 2,2 do 3,0 m. Savremena praksa zah-

teva prilikom izbora mreža, da se koriste mreže veličine okaca 2x2 ili 3x3 cm, sa obaveznim ukopavanjem žice u zemlju od najmanje 50 cm. U unutrašnjosti volijere nalaze se hranilice, pojilice i nadstrešnice, sa pratećim zidanim objektom. U najvećem broju fazanerija, pod volijera je od zemlje koja je zasejana detelinom, suncokretom ili sirkom. Po završetku proizvodnog ciklusa, u svakoj volijeri ponaosob je neophodan odmor od najmanje 6 meseci pre naseljavanja novog jata. Navedeno se postiže postojanjem većeg broja volijera u okviru fazanerije i držanjem matičnog jata samo u jednoj od njih, dok se druge čuvaju za prihvata fazančića ili su u fazi „odmora“. Jedna od važnih biosigurnosnih mera koja se preporučuje u volijerama je dezinfekcija zemljišta. Potrebno je da se svake godine cela površina volijere preore, tretira krečom u prahu, a 5-7 dana nakon tretmana, površina se preorava ponovo i zemljište priprema za setvu detelinom, suncokretom ili sirkom. Ono što je važno napomenuti je činjenica da se u cilju prevencije praktikuje mikrobiološki pregled zemljišta, koji zavisno od rezultata može usloviti i primenu dezinfekcije zemljišta primenom određenih hemijskih sredstava po posebnom postupku, uvažavajući činjenicu da visok procenat organske materije u zemljištu umanjuje efekat dezinfekcionog sredstva. Absorpcioni potencijal zemljišta, sa aspekta neophodnih količina radnog rastvora dezinficijensa po kvadratnom metru zemljanog poda, takođe ima veliki uticaj na efekat sprovedene dezinfekcije u volijerama. Žičani delovi volijere, nadstrešnice i zidanog objekta, se po iseljavanju starog jata i pred prijem novog jata detaljno mehanički čiste i dezinfikuju nekim od hemijskih dezinficijensa, koji nemaju korozivna dejstva. Hranilice i pojilice se iznose iz volijera, mehanički čiste, peru i potom dezinfikuju slično kao i u uzgoju živine, uz napomenu da se površine oko hranilica i pojilica dezinfikuju u kontinuitetu u toku procesa proizvodnje, sa posebnom pažnjom da sistem napajanja bude funkcionalan (npr. nipl-pojilice) i da nema curenja vode oko pojilica. Preporuka je da hranilice budu od plastike i treba izbegavati hranilice od drveta, koje može biti dobar medijum za pojavu i razvoj patogenih uzročnika, a čišćenje, pranje i dezinfekcija drveta mogu imati smanjene efekte.

Jedna od posebno važnih proizvodnih celina su inkubatorske stanice. Fazanke počinju sa pronosjenjem jaja krajem aprila i početkom maja i period nošenja traje približno oko mesec dana. Jaja se iz volijera sakupljaju nekoliko puta u toku dana a pre skladištenja se odbacuju mala, velika i jaja nepravilnog oblika. Sakupljena i odabrana jaja se smeštaju u posebnu prostoriju sa temperaturom od 10-14 °C i relativnom vlažnošću od 65-75 procenata. Preporuka je da se jaja drže u horizontalnom položaju i da se dva puta dnevno okreću za 180°. Izmena vazduha u prostoriji za skladištenje jaja je obično na principu prirodne ventilacije. Jaja u skladištu ostaju 5-10 dana (preporuka do 7 dana) i slažu se u kartonske kutije, koje se koriste za transport jaja u živinarstvu. Sva jaja sakupljena za inkubiranje se dezinfikuju formaldehidnim parama, po posebnoj proceduri u trajanju od 30 minuta. Sama inkubatorska stanica se sastoji od prostorije za smeštaj inkubatora i prostorije u kojoj je smešten valjaonik za izleganje fazančića. Inkubatori mogu, sa aspekta vazduha, funkcionisati na dva principa: sa stajaćim i sa strujećim vazduhom. Preporuka su inkubatori koji rade na principu strujanja vazduha, gde

se pomoću ventilatora obezbeđuje stalno strujanje sa konstantnim održavanjem temperature unutar inkubatora. Pre ulaganja prvog nasada, obavlja se dezinfekcija kasete i inkubatora formaldehidnim parama u trajanju od 30 minuta, a zatim se inkubator dobro provetri. Danas postoje nove grupe dezinficijensa koje takođe mogu uspešno da se koriste u dezinfekciji unutrašnjosti inkubatora primenom tzv. metoda hladnog/toplog zamagljivanja, sa sredstvima koja ispoljavaju dobar antimikrobni efekat i bez korozivnog efekta. Inkubator se drži u prostorijama na temperaturi od 15 do 25 °C, a treba izbegavati uticaj direktne sunčeve svetlosti i promaje na inkubator. U slučaju povećanih temperatura, prostorija se mora rashlađivati. Funkcionalnost termometara za praćenje temperature u unutrašnjosti inkubatora je jedan od ključnih faktora funkcionalnosti inkubacije jaja. Jaja se inkubiraju na temperaturi od 37,5 °C, sa preporukom da se stavljaju u inkubator u kome je već postignuta preporučena temperatura. Relativna vlažnost u inkubatoru je 55 procenata. Novi tipovi inkubatora imaju automatski sistem za kontrolu temperature i relativne vlažnosti tokom inkubiranja, kao i sisteme za okretanje jaja, čime se obezbeđuju prirodni uslovi inkubiranja. Nakon 21 dana provedenog u predvaljaoniku/inkubatoru, jaja se prebacuju u valjaonik/izvodnik, smešten u zasebnoj prostoriji, gde ostaju do 24/25/26 dana, zavisno od tehnologije i terenskih iskustava. Prednost u izleganju pilića u valjaoniku je činjenica da u njemu nema okretanja jaja, da se izbegava kontaminacija drugih pilića izmetom izleglih pilića i izbegava se kontaminacija samog inkubatora. Izvedeni pilići mogu ostati u valjaoniku jedan dan nakon izleganja, kao što ostaju jedan dan ispod majke nakon izleganja. Nakon izleganja, valjaonik se detaljno čisti, pere i dezinfikuje, čekajući novu partiju. Ostaci neizležanih jaja iz valjaonika se prikupljaju i neškodljivo uklanjaju skladištenjem u jamu grobnicu ili odnošenjem od strane zoohigijenske službe.

Standardan način držanja fazanskih pilića do 6 nedelje starosti u objektima za odgoj zasniva se na podnom ili baterijskom sistemu držanja.

U podnom sistemu, objekti su u unutrašnjosti podeljeni u bokseve i odvojeni žicom. Pod objekata je posut piljevinom, hoblovinom ili mešavinom hoblovine i peska u debljini sloja od 3-4 cm. Danas se polako kreće sa primenom peletirane seckane slame ili peletirane mešavine seckane slame, hoblovine i peska. Navedeni materijali imaju dobar absorpcioni potencijal. Ako nema peska u podnoj prostirci on se posebno stavlja uz hranilice, zbog toga što je neophodan fazančićima za normalnu regulaciju varenja. Mora se posebno istaći da je fazan svaštojed, pri čemu u njegovoj ishrani dominira hrana biljnog porekla (64 procenta), zatim hrana animalnog porekla (25 procenata) i hrana mineralnog porekla (11 procenata). Biljnu hranu čine zeleni mekani delovi biljaka, semena i plodovi korova, drveća i poljoprivrednih kultura. Hranu animalnog porekla čine insekti (adulti i njihove larve), mekušci i leševi sitnih glodara, što posebno ima značaj u veštačkom uzgoju fazana. Fazani rado uzimaju minerale, posebno kamenčiće ili krupni pesak, koji pomažu mišićnom delu želuca u postupku varenja hrane. U podnom sistemu uzgoja fazančića, unutrašnjost svakog boksa se zagreva veštačkom kvokom (identična tehnologija sa gajenjem pilića u tom uzrastu). Boksevi sa veštač-

kim kvočkama su građeni u dva niza, a komunikacija između prostorija se obavlja hodnicima, koji se po potrebi mogu zatvoriti. U vreme naseljavanja pilića, temperatura u prostorijama mora iznositi 35-36 °C. Prilikom definisanja temperature ispod veštačke kvočke ili drugih grejnih tela, važno je pratiti ponašanje pilića. Zbijeni pilići ukazuju na potrebu povećanja temperature, a pomeranje pilića ispod kvočke ukazuje na potrebu da se temperatura smanji. Ravnomeran raspored ispod kvočke ukazuje da je temperatura optimalna. Na prostorije u kojima se nalaze boksevi za podni uzgoj pilića se nadovezuju ispusti sa nadstrešnicom, ograđeni pletenom žicom, koji su često povezani sa volijerama. Kada su fazančići stari oko dve nedelje, otvaraju se izlazi između prostorija sa veštačkim kvočkama i ispusta.

U baterijskom/kaveznom sistemu uzgoja fazančića, kavezi/baterije su postavljeni u više etaža (najčešće 3-5). Površina jedne etaže je uobičajeno oko 2,60 m², kapaciteta 150 fazančića. Konstrukcije kaveza su od nerđajućeg metala. Prvog dana naseljavanja, optimalna temperatura prostorije je 27 °C, a u baterijama 35 °C, sa tim da se svakog dana, temperatura u bateriji snižava za po jedan stepen u narednih sedam dana. Režim osvetljenja je celodnevni.

Pre useljavanja, oba tipa objekata za odgoj fazančića, se moraju mehanički očistiti, oprati, dezinfikovati i okrečiti. Žičani delovi ograda/ispusti, zidani delovi i nadstrešnice, se mehanički čiste i dezinfikuju nekim od hemijskih dezinficijensa koji nemaju korozivna svojstva. Hranilice i pojilice se iznose, rasklapaju ukoliko je to moguće, mehanički čiste, peru i potom dezinfikuju slično kao i u uzgoju živine. Prostirka koja se unosi u objekte se dezinfikuje i mora biti suva. U postupku dezinfekcije prostirke visoku efikasnost je pokazao rastvor natrijumbikarbonta koji se prska po prostirci a zatim ostavlja da se osuši, čime se izbegava pojava gljivica. U novije vreme se za dezinfekciju prostirke i zemljanih površina koristi formalin prema posebnom tehnološkom postupku, uz sve mere opreza.

Kada fazančići imaju šest nedelja, otvaraju se vrata koja vode iz ispusta u volijere. One su istih građevinskih karakteristika kao volijere za držanje matičnog jata. U njima fazančići ostaju do momenta ispusta u lovišta. Zemljište ispusta se priprema identično kao i u volijerama za držanje matičnog jata. Sve strane volijere su ograđene pletenom žicom, a gore je zatvorena žičanom mrežom istih tehničkih karakteristika, kao i volijera za odgoj matičnog jata. Visina središnjih stubova u volijerama je 3-5 m, a ostalih 2,0-2,5 m. Površina zemljanog poda volijere je od 1 do 3 m², po jedinki, zavisno od starosti i zasejana je kukuruzom, suncokretom, sirkom ili nekom drugom biljnom kulturom. U odgoju fazančića u volijerama, primenjuje se princip "popuštanja površine" za korišćenje, zavisno od starosti fazančića, vodeći računa o optimalnoj površini po jedinki.

U cilju praćenja efekata dezinfekcije i deratizacije, kao ključnih biosigurnosnih mera, na fazanerijama smo organizovali terenska ispitivanja efekata određenih metoda i sredstava koja se koriste za sprovođenje dezinfekcije i deratizacije, vodeći računa o njihovoj aplikativnosti.

Iskustva i značaj primene dezinfekcije na fazaneriji

Uspešnost farmske proizvodnje fazanske divljači je kontinuirano sprovedenje preventivne dezinfekcije kao biosigurnosne mere u svim fazama tehnološkog postupka proizvodnje. Proizvodne celine u kojima se vrši proizvodnja jaja, uzgoj matičnog jata, proizvodnja i uzgoj fazančića predstavljaju idealan medijum za pojavu i razvoj patogenih mikroorganizama. Među njima se posebno ističu uzročnici kokošije kuge, salmoneloze, tuberkuloze i kokcidioze, kao bolesti koje su velika pretnja objektima u kojima se vrši uzgoj fazana. Ne sme se izgubiti iz vida, da mikroorganizmi vremenom postaju otporni i da nepravilna, nekontrolisana i prekomerna primena dezinficijensa može dovesti do pojave rezistencije, koja se teško može kontrolisati. Ističemo posebne mere opreza prilikom sprovođenja preventivne dezinfekcije, kao mere koja se svakodnevno sprovodi na fazanerijama. Pored toga što se ona mora sprovoditi u kontinuitetu treba posebno voditi računa da se na oko mesec dana radi tzv. rotacija različitih hemijskih grupa dezinficijensa koji se koriste, kako bi se prevenirala rezistencija. Takođe se danas posebno vodi računa o poštovanju radnih koncentracija rastvora i načinu njihove aplikacije, kao i o poštovanju principa da se radni rastvori pripremaju neposredno pre aplikacije.

U toku terenskih istraživanja, nakon završetka i pre početka novog proizvodnog ciklusa svi objekti-proizvodne celine i oprema u njima su shodno definisanom biosigurnosnom protokolu, mehanički očišćeni korišćenjem standardne opreme (metle, četke i sl.) od vidljivih nečistoća i oprani toplom vodom (do 56 °C). Nakon završenog mehaničkog čišćenja i sanitarnog pranja svih objekata sprovedeno je krečenje svih zidova, dok su podovi tretirani 2 % vodenim rastvorom dezinficijensa na bazi persirćetne kiseline motornom prskalicom. Oprema (hranilice, pojilice, baterije, kasete za jaja) je dezinfikovana potapanjem u 2 % vodeni rastvor dezinficijensa na bazi persirćetne kiseline. Zemljane površine u volijerama tretirane su 3 % vodenim rastvorom dezinficijensa na bazi persirćetne kiseline korišćenjem motorne prskalice. Dezinfekcija inkubatora i valjaonika je, nakon čišćenja i pranja vršena formalinskim parama (na 1 m³ prostora korišćeno je 60 ml formaldehida i 40 g hipermangana). Kartonske kutije za transport jaja (kartonke) i slama-prostirka su dezinfikovani formalinskim parama. Urađena je fumigacija slame pre unošenja u objekat za držanje matičnog jata i objekat za uzgoj fazančića od 2 do 6 nedelja starosti. Formalinske pare su ostavljane da deluju 30 minuta, a zatim su prostorije, inkubatori, valjaonici, skladišta za kartonke, kao i prostorije u kojima je rađena fumigacija slame dobro provetravane.

Utvrđivanje mikrobiološkog statusa je vršeno na površinama u proizvodnim celinama i to: na zidovima i podovima, na opremi (hranilice, pojilice, kasete za jaja, baterije), na kartonkama za jaja i u prostoriji za skladištenje jaja, u unutrašnjosti inkubatora i valjaonika, zatim na zemljanim površinama volijera i prostirke. Svi uzorci su uzimani metodom slučajnog izbora i sa svake površine je uzimano po 5 briseva. Za utvrđivanje mikrobiološkog statusa su uzimani brisevi sa navedenih površina korišćenjem komercijalnih sterilnih briseva koji se pred-

hodno nakvašeni sterilnim fiziološkim rastvorom. Pomoću plastičnog šablona (10x10cm) uzimani su brisevi uvek sa iste površine koja je odabrana metodom slučajnog izbora pre i 30 minuta nakon urađene dezinfekcije. Brisevi zemljanih površina unutar ispusta volijera su uzimani pomoću nazuvica koje su stavljane na obuću prilikom ulaska u volijeru i skidane pre izlaska iz nje. Uzorkovanje zemljišta iz volijera je vršeno sa 5 cm dubine radi detekcije prisustva anaeroba. Provera mikrobiološkog statusa proizvodnog objekta matičnog jata je urađena pre početka pronosjenja jaja. Brisevi su uzeti sa: površina hranilica, pojilica, zidova i poda objekta za smeštaj matičnog jata, kao i zemljišta u volijeri pomoću nazuvica prema prethodno definisanoj proceduri. Pre i nakon sprovedene fumigacije, uzeto je po 5 uzoraka slame u cilju provere njenog bakteriološkog i mikološkog statusa. Iz prostorije za skladištenje jaja, uzeti su brisevi sa površina zida i poda unutrašnjosti objekta i brisevi sa kasete i kartonki za jaja. Iz inkubatorske stanice su uzeti brisevi sa površina zida i poda prostorije u kojoj su smešteni inkubatori, kao i brisevi unutrašnjosti svakog inkubatora i kasete za jaja. Iz prostorije u kojoj su smešteni valjaonici, uzeti su brisevi sa površina zida i poda prostorije u kojoj su smešteni valjaonici, sa unutrašnjosti svakog valjaonika, kao sa kasete za jaja unutar svakog valjaonika U objektima za uzgoj fazančića do 2 nedelje starosti, uzeti su brisevi sa površina zidova i poda prostorije i sa površina praznih baterija. U objektima za smeštaj fazančića od 2-6 nedelja starosti, kao i u objektima od 6 nedelja starosti do ispuštanja u lovište, uzeti su brisevi sa površina zidova, hranilica i pojilica, kao i zemljišta u volijeri pomoću nazuvica prema prethodno definisanoj proceduri.

Nakon uzorkovanja, brisevi su stavljani u ručni frižider i transportovani do laboratorije. U laboratorijskim uslovima je vršeno utvrđivanje brojnosti bakterija, ispitivane su kulturalne osobine i vršena je detekcija enterobakterija, salmonela, anaeroba, gljivica i plesni. Obrada briseva je rađena tako što su oni homogenizovani nekoliko minuta u 10 ml fiziološkog rastvora uz dodatak 1% peptona i zatim su pravljena razređenja. Ukupan broj bakterija je rađen u seriji razređenja od 1:10 do 1:10 000 000 na podlozi za ukupan broj bakterija. Detekcija enterobakterija je vršena na hranljivom agaru sa dodatkom 5% ovčije krvi, Brilliant zelenom laktoza žučnom bujonu, Endo agaru i McConkey agaru za enterobakterije. Potencijalno prisustvo salmonela je određivano na podlogama za preobogaćenje – puferisana peptonska voda (Bio Merieux, Francuska) i vršena je inkubacija 18-24 h na 37 °C. Zatim je 0,2 ml suspenzije prebačeno na podlogu za selektivno obogaćenje Rappaport Vasilliadis (HiMedia) na 41,5 °C i Selenit cistein bujon na 37 °C u toku 18-24h. Nakon inkubacije, 0,1 ml tečne kulture je zasejano na XLD, McConkey agaru i Brillijant zelenom agaru (HiMedia). Podloge su potom inkubirane na 37 °C u trajanju od 24h nakon čega su pregledane na prisustvo kolonija koje odgovaraju *Salmonella spp.* Identifikacija bakterija je rađena ispitivanjem kulturalnih, makro i mikro-morfoloških osobina i biohemijskih aktivnosti primenom standardnih i komercijalnih testova. Za potvrdu identifikacije korišćen je BBL Crystal sistem (Becton Dickinson, USA). Utvrđivanje prisustva anaerobnih bakterija je vršeno na Tarozzi bujonu i Zeissler agaru tako što su uzorci zemlje (1 g

uzorka u 9 ml fiziološkog rastvora) zasejani u razređenju od 1:100 – 1:1 000 000 na sulfitnom agaru (HiMedia). Konačna identifikacija anaerobnih bakterija rađena je sa BBL Crystal Anaerobes ID Kit (Becton Dickinson, USA).

Ukupan broj i determinacija gljivica i plesni su urađeni na Sabouraud agaru u seriji razređenja od 1:10 do 1:10 000 000.

Tokom terenskih ispitivanja, od koliformnih bakterija su izolovane *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* i *Enterococcus spp.*, a od saprofitnih najveći broj su činile različite vrste *Bacillus spp.*, *Micrococcus spp.* i α -hemolitičnih *Streptococcus spp.*

Na osnovu dobijenih rezultata, koji su prikazani u tabeli 1. uočava se da je došlo do smanjenja broja bakterija kod svih uzoraka nakon urađene dezinfekcije preparatima na bazi persirćetne kiseline i formaldehida. Nakon sprovedene dezinfekcije, u brisevima nije utvrđeno prisustvo koliformnih bakterija, osim kod briseva skinutih sa kartonki za jaja, gde je i ukupan broj bakterija i nakon dezinfekcije ostao visok. Navedena pojava se objašnjava primenom loše prakse u prethodnom periodu, gde je primenjivana višekratna upotreba kartonki za jaja. U skladu sa navedenim, kroz definisani biosigurnosni protokol zabranjena je višekratna primena kartonki za jaja. Saprofitne bakterije koje su izolovane iz briseva nakon urađene dezinfekcije su uglavnom bile pripadnici roda *Bacillus*. Navedeni rezultati se objašnjavaju pojavom da pripadnici roda *Bacillus* u nepovoljnim uslovima sredine formiraju spore koje su znatno otpornije na delovanje primenjenog dezinfekcionog sredstva od vegetativnih oblika. U skladu sa navedenim, neophodno je sprovoditi higijenske mere, sa kontinuiranom dezinfekcijom u cilju smanjenja broja mikroorganizama, a time se smanjuje rizik od pojave potencijalnih patogena. Površine na kojima je bilo moguće kvalitetno sprovesti mere mehaničkog čišćenja i sanitarnog pranja su nakon dezinfekcije prema prethodno definisanoj proceduri dale najbolje rezultate i na njima nije utvrđeno prisustvo bakterija ili je ono utvrđeno samo sporadično.

Tabela 1. Rezultati bakteriološke pretrage

Mesto uzimanja uzoraka	Prosečan broj bakterija pre dezinfekcije	Prosečan broj bakterija posle dezinfekcije
Objekat za smeštaj matičnog jata:		
Zid objekata	3×10^6 saprofiti	4×10^3 saprofiti
Pod objekta	2×10^8 saprofiti	3×10^4 saprofiti
Hranilice	5×10^7 saprofiti	4×10^3 saprofiti
Pojilice	3×10^6 saprofiti	0
Prostirka	mali broj, saprofiti	0
Zemljište volijere	3×10^6 koliforma, saprofiti	3×10^3 saprofiti
Prostorija za skladištenje jaja:		
Zid objekta	7×10^5 saprofiti	2×10^1 saprofiti

nastavak Tabele 1.

Pod objekta	4×10^6 saprofiti	3×10^2 saprofiti
Kaseta za jaja	3×10^5 koliformi, saprofiti	1×10^2 saprofiti
Kartoni za jaja	7×10^5 koliformi, saprofiti	3×10^3 koliformi, saprofiti
Jaja	1×10^3 saprofiti	0
Inkubatorska stanica:		
Zid objekta	2×10^5 saprofiti	1×10^2 saprofiti
Pod objekta	3×10^6 saprofiti	2×10^2 saprofiti
Unutrašnjost inkubatora	4×10^3 saprofiti	0
Kasete za jaja	3×10^5 koliformi, saprofiti	0
Valjaonici:		
Zid objekta	3×10^5 saprofiti	4×10^1 saprofiti
Pod objekta	2×10^6 saprofiti	4×10^2 saprofiti
Unutrašnjost valjaonika	5×10^2 saprofiti	0
Kasete za jaja	2×10^4 saprofiti	0
Objekat za smeštaj fazančića do 2 nedelje starosti:		
Zid objekta	6×10^6 saprofiti	3×10^3 saprofiti
Pod objekta	4×10^7 saprofiti	4×10^3 saprofiti
Površine praznih baterija	2×10^4 saprofiti	1×10^2 saprofiti
Objekat za smeštaj fazančića 2 - 6 nedelja starosti:		
Zid objekta	2×10^6 saprofiti	4×10^3 saprofiti
Pod objekta	3×10^7 saprofiti	2×10^4 saprofiti
Hranilice	5×10^7 koliformi, saprofiti	2×10^4 saprofiti
Pojilice	3×10^6 saprofiti	0
Zemljani pod volijere	3×10^5 koliformi, saprofiti	4×10^3 saprofiti
Objekat za smeštaj fazančića starijih od 6 nedelja:		
Zid objekta	7×10^5 saprofiti	3×10^2 saprofiti
Pod objekta	2×10^6 saprofiti	3×10^4 saprofiti
Hranilice	3×10^7 saprofiti	6×10^4 saprofiti
Pojilice	3×10^4 saprofiti	2×10^2 saprofiti
Zemljani pod volijere	4×10^6 koliformi, saprofiti	3×10^3 saprofiti

U tabeli 2. se može videti da je nakon sprovedene dezinfekcije uočen značajan pad broja plesni. Nalaz malog broja gljivica i plesni pre dezinfekcije u inkubatoru i valjaoniku se može objasniti samim materijalom od kojih su napravljeni, a

koji po svojim karakteristikama i uz adekvatno održavanje nisu pogodni za rast gljivica i plesni. Površine zidova i podova u objektima u kojima je smešteno matično jato su shodno tehnološkom postupku stvarale određene probleme u realizaciji mehaničkog čišćenja i sanitarnog pranja zbog prisustva životinja. Dodatni problem je uočen pri korišćenju hranilica od drvenih materijala i nesprovođenju svakodnevnog pranja i dezinfekcije hranilica i pojlica. U toku kontrole, nakon sprovedene dezinfekcije, ustanovljeno je i dalje prisustvo značajnog broja plesni iz roda *Aspergillus*, dok je iz briseva uzetih nakon dezinfekcije utvrđeno pretežno prisustvo vrste *Aspergillus flavus*, uz značajno smanjenje prisustva ostalih pripadnika ovog roda. Ovo se, između ostalog, može objasniti većom otpornošću spora *Aspergillus spp.* i prethodno definisanim problemima. Uvođenjem svakodnevnog pranja i dezinfekcije pojilica postignuti su zadovoljavajući rezultati u redukciji brija mikroorganizama, a problem prisustva mikroorganizama i nakon sprovedene dezinfekcije na drvenim hranilicama mora biti rešen njihovim isključivanjem iz upotrebe i primenom hranilica od materijala koji se lako mogu prati i dezinfikovati.

Tabela 2. Rezultati mikološke pretrage

Mesto uzimanja uzoraka	Prosečan broj gljivica i plesni pre dezinfekcije	Prosečan broj gljivica posle dezinfekcije
Objekat za smeštaj matičnog jata:		
Zid objekta	2×10^6 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	4×10^3 <i>Aspergillus spp.</i>
Pod objekta	3×10^7 <i>Aspergillus spp.</i>	3×10^3 <i>Aspergillus spp.</i>
Hranilice	4×10^5 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	2×10^3 <i>Aspergillus spp.</i>
Pojilice	2×10^3 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	>100 <i>Aspergillus spp.</i>
Prostirka	7×10^8 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	4×10^2 <i>Aspergillus spp.</i>
Zemljani pod volijere	5×10^4 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	4×10^2 <i>Aspergillus spp.</i>
Prostorija za skladištenje jaja:		
Zid objekta	>100 <i>Mucor spp.</i>	0
Pod objekta	>100 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	0
Kaseta za jaja	6×10^5 <i>Penicillium spp. Aspergillus spp.</i>	0
Kartoni za jaja	8×10^7 <i>Penicillium spp. Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	5×10^4 <i>Aspergillus spp.</i>
Jaja	3×10^3 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	0
Inkubatorska stanica:		
Zid objekta	>100 <i>Mucor spp.</i>	0
Pod objekta	>100 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	0
Unutrašnjost inkubatora	>100 <i>Mucor spp.</i>	0

nastavak Tabele 2.

Kasete za jaja	5×10^4 <i>Penicillium spp. Aspergillus spp.</i>	0
Valjaonici:		
Zid objekta	>100 <i>Mucor spp.</i>	0
Pod objekta	>100 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	0
Unutrašnjost valjaonika	>100 <i>Mucor spp.</i>	0
Kasete za jaja	2×10^2 <i>Mucor spp.</i>	0
Objekat za smeštaj fazančića do 2 nedelje starosti:		
Zid objekta	4×10^4 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	>100 <i>Mucor spp.</i>
Pod objekta	4×10^5 <i>Aspergillus spp.</i>	>100 <i>Aspergillus spp.</i>
Površine praznih baterija	2×10^5 <i>Aspergillus spp.</i>	0
Objekat za smeštaj fazančića 2 - 6 nedelja starosti:		
Zid objekta	5×10^6 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	2×10^3 <i>Aspergillus spp.</i>
Pod objekta	5×10^7 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	4×10^3 <i>Aspergillus spp.</i>
Hranilice	1×10^6 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	7×10^2 <i>Aspergillus spp.</i>
Pojilice	4×10^3 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	0
Zemljani pod volijere	5×10^4 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	3×10^3 <i>Aspergillus spp.</i>
Objekat za smeštaj fazančića starijih od 6 nedelja:		
Zid objekta	3×10^6 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	2×10^3 <i>Aspergillus spp.</i>
Pod objekta	3×10^8 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	6×10^4 <i>Aspergillus spp.</i>
Hranilice	4×10^5 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	1×10^3 <i>Aspergillus spp.</i>
Pojilice	2×10^4 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	0
Zemljani pod volijere	1×10^8 <i>Mucor spp. Aspergillus spp.</i>	3×10^4 <i>Aspergillus spp.</i>

Iskustva i značaj primene deratizacije na fazaneriji

Lokacije na kojima se nalaze fazanerije, se najčešće nalaze u ruralnim područjima, okružene su poljoprivrednim površinama ili šumskim kompleksima, a često se u njihovoj neposrednoj okolini nalaze i neobrađene ili neuređene površine koje su obrasle korovskim biljem, rastinjem i drugom divljom vegetacijom. Navedene površine predstavljaju idealno polje za pojavu i razvoj različitih vrsta predatora među kojima se posebno ističu lisice, lasice, kune, tvorovi, šakali, ptice grabljivice i posebno glodari (miševi i pacovi), kao izvora ekološkog, ekonomskog i zdravstvenog rizika. Problem navedenih predatora je konstantan, vodeći računa da se radi o objektima poluzatvorenog tipa, gde su dominantne površine volijere, koje su na otvorenom. Za njihovu funkcionalnost, sa aspekta zaštite od predatora, je ključna pravilno postavljena ograda i stalna ispravnost žičanih mreža, sa ciljem fizičke zaštite objekta od uticaja pojedinih predatora, koji mogu napraviti

velike štete. Posebno mesto sa aspekta zdravstvenog i ekonomskog rizika u zoni fazanerijske divljači, koji često mogu biti rezervoari i vektori mnogih bolesti fazanske divljači, a takođe svojim direktnim aktivnostima na jajima, pilićima i odraslim jedinkama mogu oštetiti jaja, ubiti mlade piliće, kao i odrasle jedinke. Poznato je da su mišoliki glodari vektori velikog broja bolesti, a fazani se, najčešće konzumacijom njihovog fecesa, kontaminirane hrane od strane glodara ili konzumacijom uginulih glodara mogu inficirati patogenim uzročnicima mnogih bolesti među kojima se ističu: salmoneloza, tuberkuloza, kokošja kuga, Gamboro bolest, kolera, kociidioza i aktinomikoza. Poznato je da je salmoneloza često oboljenje koje prati fazanerijske i kao takva nameće obavezu redovne kontrole zdravstvenog statusa objekta na prisustvo ovih bakterija. Takođe, imajući u vidu da salmonela predstavlja značajan uzrok bakterijskih gastroenteritisa ljudi i da je odgovorna za 24 procenata *food-borne* bolesti uzrokovanih od strane poznatih patogena u US (Tauxe, R. 2002) možemo reći da je njen značaj veliki. Hrana poreklom od životinja predstavlja glavni izvor infekcija ljudi, pa se mora voditi računa da meso fazana može biti izvor salmoneloze. *Salmonella* pripada familiji *Enterobacteriaceae*. To su gram negativni štapići koji su pokretni i fakultativni su anaerobi. Bakterije rastu kao butirozne kolonije na običnom agaru, na optimalnoj temperaturi od 37 °C. Kontrola i bolja eliminacija zoonotskih patogena u koje spada i *Salmonella* je prioritet današnje farmske proizvodnje fazana, zbog toga što dovodi do pada proizvodnje samih jedinki. Ako se meso takvih jedinki koristi u konzumu može se posledično bolest preneti i na ljude. Pored opasnosti da obole ljudi, salmonelozne infekcije na fazanerijama mogu značajno da utiču i na ekonomsku isplativost farmskog gajenja fazana. Ekonomske štete se ogledaju u tome da dolazi do pada nosivosti, pilići mogu da uginjavaju, a odrasle jedinke su slabe kondicije i lošeg eksterijera. Prevencija unosa zoonotskih agenasa u primarnu proizvodnju u velikoj meri zavisi od sprovođenja biosigurnosnih mera na fazanerijama.

U saradnji sa patnerskom insitucijom koja je nadležna za poslove deratizacije na lokaciji fazanerijske izvršeno je izlovljavanje glodara pomoću žičanih klopki - živolovki. Kao mamac su korišćeni parafinski blokovi bez otrova u kojima se nalazilo različito zrnelje i semenke, sa dodatkom određenih atraktanata. Klopke su



Slika 1. Raspored klopki na fazaneriji

bile postavljene u 3 zone po 4 klopke. Prva zona su bili rubni delovi ekonomskog dvorišta, druga zona oko samih objekata i treća zona je bila u samim objektima, bez prisustva fazana.

Klopke su pregledane svakodnevno. U slučaju da se nešto uhvati u klopku ona je odnošena u vivarijum gde je životinja držana do početka ispitivanja (najviše 3 dana), a svaki dan su joj davani hrana i voda.

Pre disekcije svaka životinja je prvo omamljena etrom, izmerena joj je masa i anestetizirana pentobarbitalom i dozi od 40-60 mg/kg intraperitonealno. Anestetiziranim životinjama je izmerena ukupna dužina (od vrha njuške do vrha repa), dužina tela sa glavom i dužina repa. Životinje su pričvršćivane na leđa na dasku za disekciju, udovi su fiksirani i pravljen je rez duž medijalne strane sve do grudne kosti.

Za analizu prisustva salmonele je uziman feces iz zadnjeg dela creva, a uzimani su i drugi uzorci za analize koji nisu tema ovog rada. Leševi obrađenih životinja su pakovani u plastične kese i čuvani u zamrzivaču za tu namenu sve do transporta u kafileriju gde su uništeni. Jedinke su na osnovu mase kategorisane u 3 starosne kategorije i to: juvenilne sa masom do 100g, subadultne sa masom između 100 i 200g i adultne jedinke sa masom iznad 200. Za izolaciju *Salmonella spp.* uziman je 1 g fecesa. Uzorak se primarno obogaćuje u neselektivnoj tačnoj podlozi (BWR), inkubira se na 37 °C tokom 18h. Nakon toga se izvodi sekundarno obogaćenje na selektivnoj podlozi RV (*Rappaport-Vassiliadis*) inkubira se na 41,5 °C tokom 24h. Selektivna izolacija i identifikacija se vrši na ksiloza lizin dezoksiholat (XLD) agaru i inkubira tokom 24h na 37 °C. Druga selektivna podloga se inkubira u skladu sa uputstvom proizvođača (BGA, Rambach). Sumnjive kolonije se presejavaju na hranljivi agar. Potvrđivanje i identifikacija se vrši biohemijskim nizom.

U periodu od januara do avgusta, ukupno su izlovljene 24 jedinke sivog pacova *Rattus norvegicus*. Od tog broja, 13 jedinki je bilo muškog (54,16 procenta) i 11 jedinki ženskog pola (45,84 procenta). Starosna struktura izlovljenih jedinki je sledeća: juvenilnih jedinki je 5 (2 ženke i 3 mužjaka), subadultnih jedinki 6 (4 ženke i 2 mužjaka) i adulta 13 jedinki (5 ženki i 8 mužjaka). Po zonama postavljenih klopki, sve jedinke su izlovljene u zoni rubnih delova ekonomskog dvorišta. Od ukupno analizirane 24 jedinke, pozitivnih je bilo 4 (16,6 procenta) i u pitanju su bile adultne jedinke (3 mužjaka i 1 ženka). U sva 4 slučaja, u pitanju je bila *Salmonella enteritidis*. Uzimajući u obzir ukupan broj izlovljenih jedinki i površinu samog ekonomskog dvorišta, može se reći da se radi o srednjoj infestiranosti glodarima. Kako su sve izlovljene jedinke uhvaćene u prvoj zoni tj. u rubnim delovima oko ekonomskog dvorišta, vidi se da su biosigurnosne mere dobro sprovedene, a sve to iz razloga striktnog poštovanja biosigurnosnog protokola tri godine unazad od momenta uvođenja. Sama starosna struktura i odnos polova izlovljenih jedinki odgovaraju statusu divlje populacije glodara za to doba godine. Imajuću u vidu da su samo 4 od 24 izlovljene jedinke bile pozitivne na *Salmonella enteritidis* i da te jedinke nisu uhvaćene, u i oko, samih proizvodnih celina fazane-

rije, možemo da konstatujemo da glodari u budućem periodu, ukoliko se nastavi sa poštovanjem biosigurnosnog protokola neće biti put unosa salmonela i ostalih patogenih uzročnika u fazaneriju.

ZAKLJUČAK

Veliki potencijali u budućem razvoju lovnog turizma, povećana tražnja za mesom fazanske divljači, kao i povećane potrebe inostranog tržišta za fazanima iz veštačkog uzgoja, otvaraju prostor za proširenje postojećih proizvodnih kapaciteta i buduću izgradnju novih, za veštački uzgoj fazana. Vodeći računa da se u skladu sa prethodno definisanim postulatima radi o specijalizovnim farmskim objektima, koji se nalaze na rizičnim lokacijama, koje karakteriše poluzatvoreni sistem uzgoja, sa koncentracijom velikog broja jedinki različitih starosnih kategorija na malom prostoru, smatramo da je dobro poznavanje tehnološkog postupka proizvodnje i pravilno definisanje svih zdravstvenih rizika ključni uslov za proizvodnju jedinki optimalne kondicije i dobrog zdravstvenog statusa. Zadatak mesno-nadležne veterinarske službe u cilju postizanja uspešne proizvodnje na fazanerijama je da kroz kontinuirano praćenje proizvodnih rezultata i zdravstvenog statusa jedinki u skladu sa donetim programom mera zdravstvene zaštite u saradnji sa vlasnicima, doslednim sprovođenjem mera biosigurnosti, smanji zdravstveni rizik u fazanerijama na minimum. Pojava bolesti u ovakvim objektima se često odlikuje masovnim uginućima i završava se loše po vlasnike. Zbog toga veterinarska struka svojim autoritetom mora da nametne obavezu vlasnicima fazanerija da kontinuirano sprovede biosigurnosne mere u skladu sa donetim biosigurnosnim protokolima.

Vlasnicima fazanerija, u cilju ekonomične proizvodnje, uzgoja fazanske divljači optimalne kondicije i dobrog zdravstvenog statusa se preporučuje da u saradnji sa mesno-nadležnim veterinarskim organizacijama, zavisno od tehnološkog postupka proizvodnje definišu biosigurnosne protokole za svoje fazanerije i prema njima odrede biosigurnosne mere koje se moraju sprovesti u kontinuitetu.

LITERATURA

1. Đorđević, M. 2009. Biosigurnosne mere u fazanerijama, Zbornik radova XIX savetovanje, Dezinfekcija, dezinskcija i deratizacija u zaštiti životne sredine. 2. Pavlović, I., Ilić, Ž., Miljković, B., Spalević, Lj., Maslić-Strizak, D. 2010. Značaj veštačkog odgoja pernate lovne divljači u cilju očuvanja biodiverziteta u lovištima. *Ecologica*, 17, 333-6. 3. Downie, A., Zoe A. 2012. Hunter Pheasant Breeding & Care, http://www.allandoopheasantry.com/pheasant_breeding_and_care.html 4. Woodard, A., Vohra, P., Denton, V. 1983. *Game Bird Breeders Handbook*, Hancock House Publishers, Blaine, W.A. 5. Tauxe, R. 2002. Emerging food-borne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 78:31-41. 6. Gratz, N.G. 1994. Rodents as carriers of disease. In: Buckleand, A.P., Smith R.H. (eds.), *Rodent pests and their control*. CAB International, Oxford, England. 85-108. 7. Leirs, H., Lodol J., Knorr M. Factors corre-

lated with the presence of rodents on outdoor pig farms in Denmark and suggestions for management strategies. 2004. NJAS-Wag J. Life Sci. 52:133-43.

OUR EXPERIENCES IN THE APPLICATION OF BIOSECURITY MEASURES IN PHEASANTRIES

Milutin Đorđević, Oliver Radanović, Branislav Pešić

Summary

Pheasantries are semi-closed production facilities with several production units that are cyclically connected and in which individuals of different age categories are reared. The location of the pheasantries, the simultaneous breeding of different age categories within the economic yard, the breeding of individuals in semi-closed facilities, the potential influence of various pathogenic factors from the environment, defines pheasants from the aspect of biosecurity as facilities of high health risk. Therefore, for successful farm production of pheasant game, it is necessary to continuously implement biosecurity measures in all stages of the technological production process. The most important biosecurity measures implemented in farm facilities are disinfection and rodent control. This paper presents the previous results of the importance of the implementation of the mentioned biosecurity measures on pheasantries.

Key words: *biosecurity measures, disinfection, pheasantries, rodent control*

VETERINARSKO-FORENZIČKA ISPITIVANJA UGINULE DIVLJAČI

Vladimir Nešić, Dajana Davitkov

Kratak sadržaj

Veterinarska forenzika je naučna disciplina koja se bavi vezom i primenom veterinarsko-medicinskih činjenica u pravnim problemima. Mada se najvažniji podaci u ovoj oblasti dobijaju na osnovu izvršenog postmortalnog ispitivanja, ova nauka je multidisciplinarna sa veoma važnom ulogom specijalista različitih profesija iz oblasti toksikologije, balistike, entomologije i DNK tehnologije.

Veterinari mogu da budu uključeni u sudski postupak kao svedoci, stručni svedoci ili veštaci. Osnovna uloga veterinara-forenzičara u sudskim postupcima je da obezbedi neophodne dokaze u cilju donošenja odluka tokom vođenja sudskog spora. Najvažnije je da dokazi budu prikupljeni na nepristrasan način, tako da ne dođe do pogrešne interpretacije rezultata. Veterinari-forenzičari takođe imaju veliku odgovornost u uspostavljanju prihvatljivosti dokaza i obezbeđivanju ispravne dokumentacije i evidencije dokaza. Zadatak sudsko-veterinarskog veštaka je da na osnovu svog znanja i iskustva donese stručno ispravno mišljenje zasnovano na dostupnim dokazima i u skladu sa aktuelnim stručnim i naučnim stanovištima. Za uspešno predstavljanje dokaza i nalaza, sve ove aktivnosti i izlaganja moraju da budu prihvaćene od strane suda.

U radu su izneti osnovni principi i najčešće tehnike koje se koriste u ispitivanjima u okviru veterinarske forenzike, a koje se odnose na divljač. Osim postmortalnog pregleda, kao najvažnijeg aspekta pregleda uginule divljači, u radu su opisane i metode interpretacije rendgenskih snimaka kod sumnje na ustrel/prostrel, analiza dlake u cilju identifikacije vrste divljači, upotreba i korišćenje DNK analiza u slučajevima ilegalnog lova, kao i prihvatljivost ovih dokaza pred sudom. Ovo je od velike važnosti, naročito kada se uzme u obzir da su, prema Krivičnom zakoniku Republike Srbije, predviđene stroge sankcije (novčana kazna do zatvorske kazne u trajanju od tri godine) za učinioc krivičnog dela nezakonitog lova, kao i ubijanja i mučenja životinja.

Ključne reči: divljač, forenzika, krivolov, obdukcija, zakonska regulativa

Značaj forenzičkih istraživanja u oblasti zaštite divljači

Najčešći razlog za istragu, kada su u pitanju forenzička istraživanja u oblasti zaštite divljači, odnosi se na zlostavljanje životinja, krivolov i trgovinu životinja. Najveći problem predstavlja nezakonit lov zaštićenih vrsta, retkih ili ugro-

¹Dr sci. vet. med. Vladimir Nešić, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Dajana Davitkov, asistent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija
e-mail autora za korespondenciju: nesic@vet.bg.ac.rs

ženih vrsta, ubijanje životinja radi prodavanja pojedinih delova njihovog tela ili uzimanje divljih životinja radi ilegalne proizvodnje, odnosno prodaje i transporta zaštićenih vrsta bez dozvole. Kada su u pitanju ove kriminalne radnje, uvek je neophodno da se identifikuje vrsta životinje, zatim da se utvrdi njeno poreklo, uzrok smrti ili povrede pronađene na telu životinja i naravno, ukoliko je to moguće, kako pronaći počinitelja krivičnog dela.

Veterinarska forenzika je naučna disciplina koja se bavi vezom i primenom veterinarsko-medicinskih činjenica u pravnim problemima. Mada se najvažniji podaci u ovoj oblasti dobijaju na osnovu izvršene obdukcije, ova nauka je multidisciplinarna sa veoma važnom ulogom specijalista različitih profesija iz oblasti toksikologije, balistike, entomologije i DNK tehnologije.

Forenzička medicina koja se se odnosi na identifikaciju divljih životinja, u poređenju sa identifikacijom u humanoj medicini, zahteva mnogo veći spektar različitih metoda i mogućnosti detekcije. Osnovna razlika je u tome, što u navodnim zločinima koji se odnose na divljač, uglavnom nedostaje "žrtva" koja bi predstavljala bitan dokazni materijal koji pomaze u istrazi. Takođe, lista životinjskih vrsta je u odnosu na analizu uzoraka poreklom od ljudi mnogo duža (Johnson i sar., 2014). Iz tih razloga, forenzička ispitivanja često zahtevaju analizu različitih tipova uzoraka u cilju kontrole populacija i zaštite životinjskih vrsta koje su prisutne na određenoj teritoriji (Kitpipit i sar., 2013). Veličina populacije je od primarnog značaja za naučnike i ljude koji se bave očuvanjem vrsta zbog njihovog velikog uticaja na ekologiju i samim tim na potencijal varijabilnosti bilo koje populacije životinja.

Veterinari mogu da budu uključeni u sudski postupak kao svedoci, stručni svedoci ili veštaci. Osnovna uloga veterinara-forenzičara u sudskom postupku je da sudu obezbedi neophodne dokaze u cilju donošenja odluka tokom vođenja sudskog spora. Najvažnije je da dokazi budu prikupljeni na nepristrasan način, tako da ne dođe do nekorektne interpretacije rezultata. Veterinari-forenzičari takođe imaju veliku odgovornost u uspostavljanju prihvatljivosti dokaza i obezbeđivanju ispravne dokumentacije i evidencije dokaza. Zadatak sudsko-veterinarskog veštaka je da na osnovu svog znanja i iskustva, donese stručno ispravno mišljenje zasnovano na dostupnim dokazima. Za uspešno predstavljanje dokaza i nalaza, sve ove aktivnosti i izlaganja moraju da budu prihvaćene od strane suda.

Na ovom mestu su izneti osnovni principi i tehnike koje se koriste u ispitivanjima u okviru veterinarske forenzike, sa posebnim akcentom na one koje se odnose na divljač. Ovo je od velike važnosti, naročito kada se uzme u obzir da su, prema Krivičnom zakoniku Republike Srbije, predviđene oštre sankcije (novčana kazna i do tri godine zatvora) za učinioce krivičnog dela nezakonitog lova, kao i ubijanja i mučenja životinja.

Metode i uzorci za forenzička ispitivanja

Vrsta i tip uzorka koji se koriste u ispitivanjima koja se odnose na krivolov i druge kriminalne radnje koje ugrožavaju divljač, zavise od vrste životinje i mogu

da variraju od delova tela životinje, predmeta sa kojim je životinja bila u kontaktu ili telesnih tečnosti. Naravno, u zavisnosti od vrste uzorka zavisi i koje će se procedure vršiti u forenzičkoj laboratoriji.

Za morfološke analize i analizu DNK najčešće se koriste standardni biološki uzorci poreklom od divljih životinja kao što su: dlaka, koža, feces, urin, rogovi i unutrašnji organi. Mogu se takođe koristiti i uzorci kao što su kosti, krzno, perje, vuna, ali i tragovi koje životinje ostavljaju (otisci u zemlji, pljuvačka ili krv) (Iyengar, 2013).

Svi tzv. biomaterijali poreklom od divljači, moraju se čuvati na odgovarajući način. Neophodno je imati instrukcije za sav materijal koji se nađe na "mestu zločina". Ukoliko želimo da utvrdimo uzrok smrti i radimo patohistološka ispitivanja, neophodno je uzorke staviti u dovoljnu količinu formalina (da bi se izvršila njihova adekvatna fiksacija). Ukoliko je to moguće, uvek je poželjno uzimati dvostruke uzorke i staviti ih u etanol, ako nismo u mogućnost da ih zamrznemo. Za DNK analize uzorci se čuvaju na -70 °C. Takođe, ukoliko se utvrdi da je životinja uginula usled bolesti nepoznate etiologije, uvek je najbolje uzeti i bris pluća, punu krv (ako je moguće, tj ako je prisutna), urin, dlaku, kao i sadržaj želuca i creva, a kod ptica jaja, odnosno žumance jajeta (Cooper i Cooper, 2007).

Kada su u pitanju uzorci kao što su dlaka, pero, skarifikat kože ili pektoralna muskulatura, za DNK analize se uzorci stavljaju u alkohol, a za toksikološka ispitivanja u zamrzivač. Uzorci kao što su mozak, jetra, bubrezi i reproduktivni organi se za sve vidove analiza moraju čuvati na temperaturi zamrzivača.

Najčešće metode koje se koriste u forenzičkim istraživanjima su:

1. Forenzička obdukcija – najvažnija metoda u cilju određivanja uzroka smrti životinje;
2. Morfološka analiza – uglavnom prvi korak tokom ispitivanja vrste (mikroskopski izgled dlake, izgled fecesa, anatomske karakteristike kostiju);
3. Balistika – cilj je da se povežu projektili iz vatrenog oružja koji su pronađeni u leševima životinja ili čaure koje su pronađene na mestu krivolova sa oružjem koje je pronađeno kod osumnjičenog;
4. Toksikologija – u slučajevima sumnje na trovanje divljači;
5. Molekularno-genetičke metode – neophodne u preciznoj identifikaciji delova tela ili proizvoda životinjskog porekla, a pomažu i da se ustanovi geografsko poreklo jedinke; koriste se i u cilju identifikacije osobe koja je držala oružje ili lažna CITES dokumenta tokom krijumčarenja.

Forenzička obdukcija

Obdukcija se definiše kao plansko otvaranje i sistematski pregled leša s ciljem da se ustanovi uzrok, vrsta i mehanizam uginuća. Protokol o izvršenoj obdukciji, sačinjen u forenzičke svrhe, se razlikuje od izveštaja sa uobičajene ob-

dukcije. Najvažniji princip forenzičkog postmortalnog ispitivanja je striktno pridržavanje standardne procedure.

U obdukcionom protokolu treba da budu navedeni anamnestički podaci, vrsta, starost, pol, telesna građa i stanje uhranjenosti, kao i postmortalne promene na lešu. Ovi podaci su posebno važni u slučajevima kada je uzrok smrti sporan, kao što je u slučaju trovanja. U protokolu treba da se zabeleže i podaci sa evidencione markice, kao i imena lica koja prisustvuju obdukciji (veterinarski inspektor, lovočuvari, zainteresovane strane). Prilikom spoljašnjeg i unutrašnjeg pregleda leša, neophodno je da se pregledaju svi organski sistemi i da se opišu sve promene, čak i one koje se u standardnoj obdukciji ocenjuju kao nebitne. Takođe i sve ono što je prema obducentu nepromenjeno, treba da bude opisano. Svi opisi prilikom vršenja spoljašnjeg i unutrašnjeg pregleda leša treba da budu koncizni, pisani na maternjem jeziku, bez upotrebe stručne terminologije zbog toga što protokol o obavljenoj obdukciji treba da bude razumljiv i osobama koje nisu stručne. Zaključci o uzroku uginuća se zasnivaju na relevantnim činjenicama, a ako su dvosmisleni, treba da budu razmotrene i druge mogućnosti. Pre podnošenja, izveštaj treba da se detaljno prekontroliše, da bi se izbegle protivrečnosti.

Od velike je važnosti, da sve što je od forenzičkog značaja bude fotografisano i priloženo uz obdukcioni protokol. Da bi se otklonila sumnja, preporučljivo je da se pored predmeta stavi i njegova oznaka ili broj slučaja za koji je predmet vezan. Takođe je bitno da se prilikom fotografisanja, zajedno sa predmetom od forenzičkog značaja, snimi i referentni predmet, na osnovu koga bi se mogla proceniti veličina fotografisanog predmeta (lenjir ili sl.).

Kod rana nanetih vatrenim oružjem, radiografski snimci mogu značajno da pomognu u pronalaženju zaostalih projektila u telu. Kako oni mogu da predstavljaju veoma važan dokazni materijal, treba da sadrže broj slučaja i datum kada su snimljeni.

Od velike pomoći sudu mogu da budu i dijagrami koji opisuju položaj rane zajedno sa putanjom projektila, posebno ako je uz njih dat i detaljan opis nalaza. Promene treba da budu opisane u odnosu na određene anatomske tačke i to pre nego što se obdukcijom naruše odnosi između opisivanih i referentnih tačaka.

Značaj pridržavanja standardne procedure se posebno ogleda u tome što, u većini slučajeva, između obavljanja obdukcije i pokretanja sudskog spora protekne mnogo vremena. Ukoliko su nalazi sa obdukcije potpuno i pedantno dokumentovani posle pregleda, veterinaru je znatno olakšano da se podseti detalja u vezi sa slučajem ako bude zatraženo njegovo svedočenje na sudu.

Morfološki pregled dlake, kostiju i fecesa

Svrha morfološkog pregleda dlake je da se pronađe poreklo nepoznatog uzorka dlake na osnovu dobro definisanih morfoloških i genetskih osobina, karakterističnih za određenu taksonomsku grupu. Širina znanja koja je neophodna za morfološku identifikaciju dlake je obimna, zbog velikog broja mogućih

pripadnika različitim taksonomskim grupama. Forenzički značaj pregleda dlake ima ulogu ne samo da napravi razliku između dlake sisara u taksonu, već i da prepoznaje druge strukture koje mogu podsećati na dlaku kao što su veštačka vlakna u perikama, veštačko krzno, biljne vitice i pipci insekata.

Dlaka svih sisara se sastoji od proteina keratina. Hemijska građa i glavne strukturalne karakteristike su slične kod svih sisara, ali se one u manjoj ili većoj meri ipak razlikuju u zavisnosti od taksona. Dlaka sisara je sastavljena od tri osnovna sloja: spoljašnjeg dela-kutikule, unutrašnjeg korteksa i medule (srži) koja je postavljena centralno (Tridico, 2014).

Identifikacija porekla dlake ima veliku ulogu u forenzičkim ispitivanjima, paleontologiji, zooarheologiji i ekologiji. Boja i dimenzije dlake su veoma varijabilne karakteristike i njihova korist pri identifikaciji je jako ograničena. Ove osobine zavise od starosti životinje i godišnjeg doba, kao i delova tela na kojima se one nalaze. Jedino mikrostruktura dlake ima ulogu u identifikaciji porekla zbog svog karakterističnog izgleda za svaku vrstu životinje (De Marinis i Asprea, 2005). Kada su u pitanju forenzička ispitivanja dlake, ona se ne primenjuju toliko često iako mogu biti dobar dokazni materijal u cilju utvrđivanja ilegalnog transporta zaklanih životinja, krivolova, različitih vidova prevara u kožnoj industriji, sledljivosti predatora i njihovih žrtava.

Dlaka predstavlja vrlo značajan dokazni materijal kada su u pitanju forenzička ispitivanja upravo zbog njene velike otpornosti na delovanje spoljašnjih faktora. Osim morfološkog ispitivanja dlake, moguće je za identifikaciju vrste koristiti i jedarnu i mitohondrijalnu DNK. Analiza dlake je i od ogromnog značaja zbog svog potencijala u detekciji i kontroli dopinga. Ona omogućava detekciju jednokratne aplikacije ili dugotrajnog korišćenja sredstava za doping, kao i mogućnost razlikovanja endogeno proizvedenih i egzogeno unetih steroidnih hormona (Shen i sar., 2009).

Kada je u pitanju procena vrste životinje na osnovu morfoloških karakteristika i izgleda kostiju, ona se i dalje koristi posebno u oblastima arheozoologije. Tako se smatra da su se danas toliko usavršili ovi kriterijumi da se može samo na osnovu morfoloških karakteristika kosti i zuba životinje napraviti razlika između kože i ovce koje su dosta bliske životinjske vrste. Smatra se da se starost procenjuje na osnovu srašćivanja dugih kostiju, ali kod životinja kao što su koza i ovca do potpunog formiranja i srašćenja kostiju dolazi već posle četvrte godine. Zato ovo za sve životinje koje su starije od toga, predstavlja ogromno ograničenje (Zeder i Pilaar, 2010).

Tragovi koji se često mogu naći u prirodi i uzeti na neinvazivan način su upravo tragovi fecesa, pera ili jaja divljih životinja. Ovi uzorci mogu da pomognu da se identifikuje prisustvo neke retke vrste, da se determiniše pol, utvrdi način ishrane ili da se utvrdi genetička varijabilnost, struktura populacije kao i sistem parenja (Waits i Paetkau, 2005). Međutim, iako se morfološki pregled fecesa često koristi u cilju identifikacije vrste, neka ispitivanja su dokazala da veoma često, čak i eksperti greše kada je pitanju na primer razlika između fecesa

pojedinih vrsta kao što su kuna zlatica (*Martes martes*) i lisica (*Vulpes vulpes*). Takođe, utvrđeno je da je greška veća ukoliko je pronađeni feces oskudan. Iz tog razloga se smatra da je za identifikaciju vrste uvek bolje koristiti različite metode i to iz različitih vrsta uzoraka.

Balistika

Svake godine veliki broj životinja uginjava usled povreda nastalih dejstvom projektila vatrenog oružja. Iako je u određenim situacijama upucavanje dozvoljeno i ne predstavlja ilegalnu radnju, postoji mogućnost prekoračenja granica zakona pri upotrebi vatrenog oružja.

Sve rane na telu moraju biti pregledane i fotografisane. Obavezno je pregledati životinju u celosti, zbog toga što postoji mogućnost da je životinja pretrpela i neke druge povrede na telu koje mogu biti posledica dejstva tupe sile. Koža upucane životinje mora biti pažljivo pregledana zbog mogućnosti prisustva većeg broja rana i podliva. Neophodno je da se urade rendgenski snimci celog tela u cilju lociranja projektila i utvrđivanja prisustva povreda na unutrašnjim organima. Ukoliko je životinja upucana nekoliko puta, rendgensko snimanje neće biti u mogućnosti da utvrdi redosled upucavanja. Da bi se lakše pronašao projektil i prevazišla dvodimenzionalnost rendgenskog snimka potrebno je telo snimiti u obe projekcije (dorzoventralna i lateralna). Rendgensko snimanje može pomoći za određivanje puta projektila što je od posebnog značaja u slučajevima kada je projektil napustio telo životinje.

Rendgenski snimci mogu pomoći i da se postavi sumnja na to koja je vrsta oružja korišćena (sačmarica, vazдушna puška, pištolj, karabin). U retkim situacijama je moguće da nasilno lomljenje kostiju dovede do rana usled stvaranja otvorenih preloma i dejstva same kosti. Ovakve rane mogu biti pogrešno opisane kao rane od vatrenog oružja. Rendgensko snimanje u ovim situacijama može potvrditi da vatreno oružje nije korišćeno.

U najvećem broju slučajeva, ulazne rane će biti prekrivene dlakom ili perjem ili zaprljane zemljom i krvlju. Iz tog razloga je najbolje obrijati dlaku i iščupati perje da bi se rane na adekvatan način pregledale. U zavisnosti od položaja životinje ili kretanja (letenje, trčanje, skakanje) rane na koži ne moraju biti direktno iznad unutrašnjih povreda koje se mogu naći na obdukciji. Posebnu pažnju treba obratiti na pregled izlazne rane zbog toga što fragmenti kosti često dovode do veće destrukcije tkiva nego sam projektil.

Karakteristike ulazne i izlazne rane zavise od velikog broja faktora. U velikom broju slučajeva, ulazne rane su manjeg promera od prečnika projektila. Dlaka, debris i prljavština mogu biti uvučene u unutrašnjosti ulazne rane. Najveći broj ulaznih rana poseduje crvenu od crveno-braon zonu na koži koja se naziva abrazioni prsten. Do stvaranja abrazionog prstena dolazi usled stvaranja trenja tokom prolaska metka kroz kožu. Ukoliko je ispaljeni projektil imao veliku brzinu pri ulasku u tkivo, neće doći do formiranja abrazionog prstena. Umesto

njea mogu se javiti sitne promene na koži u vidu proreza koje su locirane oko ivica ulazne rane.

Veličina zone, intenzitet i izgled čađi oko ulazne rane zavise od više faktora među kojima su najvažniji udaljenost oružja od mete, kalibar oružja, sastav baruta, ugao ulaska projektila u telo, zaprljanost krvlju i odlakanost kože. Ovakva zaprljanost kože se naziva projektilna brisotina.

Tačkasto tetoviranje na koži ustreljenih životinja uzrokovano je barutom. Ovakav tip promena oko ulazne rane nije moguće obrisati. Barutna tetovaža je premortalni fenomen čiji izgled zavisi od vrste baruta koja se koristi. Ukoliko do upucavanja dođe postmortalno, barutna tetovaža je sive do žute boje. Tetoviranje kože može nastati i ne-barutnim česticama i jednostavno se razlikuje od barutne tetovaže. Do ne-barutnog tetoviranja dolazi kada projektil na svom putu udari u posredničku metu kada dolazi do fragmentacije predmeta i urezivanja komadića predmeta u kožu.

Izgled barutne tetovaže mogu promeniti insekti koji se hrane na telu životinje. Promene do kojih dovode insekti uglavnom imaju linearan obrazac koji ukazuje na put hranjenja insekta. Na delovima tela koji su prekriveni većom količinom dlake može doći do krvarenja u dlačnim folikulima koji mogu ličiti na barutnu tetovažu.

Kada su u pitanju rane nanete projektilom koji je ispaljen sa velike daljine, u predelu glave, one mogu imati zvezdast ili nepravilan oblik. Ovakve rane nastaju na kostima i često se mogu zameniti sa izlaznim ranama ili sa kontaktnim ulaznim ranama. Međutim, na kontaktnim ranama i ranama iz neposredne blizine na ivicama rane se mogu uočiti velike količine čađi. U ovim situacijama, zrna baruta se utiskuju u tkivo.

Na svom putu kroz telo životinje, projektil udara u tkiva, deformiše se i često fragmentiše na sitne delove. Takođe, tkiva apsorbuju određenu količinu energije koju projektil sa sobom nosi. Sve ove pojave utiču na karakteristike izlazne rane. One su uglavnom veće od ulaznih i nepravilnog su oblika (sem kod ustrelina iz apsolutne blizine) upravo zbog veće dejstvene površine projektila nastale zbog njegovog obrtanja, deformacije, segmentacije i potiskivanja delova tkiva ispred prednjeg dela projektila. Ukoliko je koža na mestu izlaska projektila zategnuta, ivice izlazne rane su nepravilnije i obrnuto. U retkim situacijama, usled velike zategnutosti kože na mestu izlaska projektila, izlazna rana može biti manja od ulazne. Oblik i veličina izlazne rane nisu u korelaciji sa vrstom projektila koji se koristi.

Ivice izlazne rane su neravne, nagnječene, podlivene krvlju, češće posuvraćene upolje, ponekada sa tkivnim komadićima ili vlaknima koja delimično izlaze iz ustreline.

Toksikološka ispitivanja

U veterinarskoj forenzici trovanja divljači predstavljaju veoma široko polje istraživanja. Unošenje otrovnih supstanci u organizam se najčešće odvija putem

hrane, ali je moguće i perkutanim putem i preko vode za piće. Prema poreklu, trovanja se dele na trovanja hemijskim supstancama i trovanja otrovnim biljem. U praksi, veterinar-forenzičar može da se susretne sa različitim slučajevima, od namernog trovanja, kao i sekundarnog izlaganja vrsta koje primarno nisu bile cilj, preko slučajnog izlaganja divljači pesticidima dozvoljenim za upotrebu u poljoprivredi, pa do slučajeva koji uključuju sveobuhvatno zagađenje životne sredine. Za forenzička ispitivanja, najveći značaj imaju supstance koje se koriste za namerno trovanje divljači.

Kada su životinje direktno otrovane, stavljanjem određene otrovne supstance u mamac, govorimo o primarnim trovanjima. Sekundarno trovanje nastaje kada se lešinari hrane drugim životinjama koje su primarno otrovane. Identifikacija sadržaja voljke ili želudačnog sadržaja može da se koristi kod utvrđivanja da li se radi o primarnom ili sekundarnom trovanju. Makroskopsko upoređivanje svarenog tkiva sa drugim leševima nađenim u blizini može da pomogne u utvrđivanju redosleda trovanja.

Postoji nekoliko faktora koji mogu da navedu veterinara-forenzičara da posumnja na trovanje. Sumnja na trovanje se postavlja ako su nađene mrtva životinja ili više mrtvih životinja na jednom mestu, posebno ako su različitih vrsta, u naizgled dobroj uhranjenosti.

U nekim slučajevima, veterinari-forenzičari mogu da pronađu otrovan mamac ili da imaju dobre pretpostavke na osnovu znanja o pesticidima koji se najčešće koriste u tom području. U svakom slučaju, neophodno je da se izvrši kompletna forenzička obdukcija u cilju uzimanja uzoraka za hemijsko-toksikološke analize i isključivanja eventualno drugog uzroka uginuća. Veoma su važni i podaci iz anamneze i kod nekih trovanja su klinički simptomi karakteristični, dok je obdukcioni nalaz obično negativan. Uvek kada se sumnja na trovanje, osoblje koje učestvuje u obdukciji, kao i radnici na terenu treba da preduzmu mere predostrožnosti kako bi se izbeglo slučajno izlaganje ljudi toksinu. Uzorci treba da se prikladno pakuju, a analize na prisustvo toksina treba da se izvrše što je moguće brže. Kompletno uzorkovanje tkiva kod sumnje na trovanje podrazumeva uzimanje uzoraka želudačnog sadržaja, sadržaja iz tankih creva, jetre, bubrega, mozga i masnog tkiva.

Kod uginuća nastalih namernim ili slučajnim trovanjem, na osnovu izvršene obdukcije se postavlja samo sumnja na trovanje. Međutim, za utvrđivanje odgovornosti lica okrivljenih za namerno trovanje divljači, neophodno je hemijsko-toksikološkim analizama da se dokaže toksična supstanca. Analize u cilju identifikacije specifičnih toksičnih supstanci su relativno skupe, što treba da se uzme u obzir u slučajevima kada kazne za zagađivanje životne sredine iznose manje od troškova analiza.

Najčešća trovanja u našoj sredini se odnose na primenu kreozana, strihnina, antikoagulantnih rodenticida, karbamata i organofosfata. Mnoge od ovih hemikalija su bile ili su još uvek u upotrebi u poljoprivredi i mogu da se nabave kako preko različitih distributera, tako i preko ilegalnih izvora.

Kod životinja otrovanih kreoanom (dinitroortofenol, dinitrocresol), pesticidom koji se nekad koristio u vinogradarstvu, klinički simptomi se ispoljavaju veoma brzo nakon unošenja toksina u vidu vrlo visoke temperature i posledičnog uginuća. Kako je kreoan intenzivno limun-žute boje, nalaz stranog sadržaja ove boje na telu i u digestivnom traktu, kao i izostanak patomorfoloških promena koje bi mogle da dovedu do uginuća, upućuje na sumnju da se radi o trovanju, koje se obavezno potvrđuje hemijsko-toksikološkom analizom.

Kod trovanja strihninom, obdukcioni nalaz je takođe negativan, a sumnja na trovanje se postavlja na osnovu vrlo karakterističnih simptoma u vidu ekscitiranosti i bolnih tetaničnih grčeva, što se obavezno potvrđuje hemijsko-toksikološkom analizom.

Trovanja antikoagulantnim rodenticidima, usled blokiranja sinteze vitamina K, dovode do spontanih krvarenja, pri čemu se na obdukciji konstatuju masivna krvarenja, različitog oblika i veličine na svim unutrašnjim organima i serozama.

Hipersalivacija i mišićni tremor ukazuju na vrlo verovatno trovanje antiholinesteraznim toksinima (karbamati i organofosfati).

Molekularno genetičke metode u službi forenzike

Tipovi DNK markera koji se danas koriste u cilju identifikacije životinjske vrste u forenzičkim ispitivanjima su mnogobrojniji nego oni koji se koriste u humanoj forenzici. Mikrosateliti (engl. *Short Tandem Repeat - STR*) i jednonuklearni polimorfizam (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms - SNP*) se koriste u pretpostavci identifikacije, određivanju pedigrea, kao i u dokazivanju pripadnosti uzorka određenoj populaciji. Mitohondrijalna DNK (mtDNK) se najčešće koristi za specijsku identifikaciju.

Tokom forenzičke istrage, jedini dokazni materijal često mogu da budu dlake poreklom od pasa. Kao što je slučaj sa dlakama kod ljudi, kod pasa one takođe sadrže male količine genomske DNK i detektibilne koncentracije mtDNK. Mitohondrijalna DNK je ekstrahromozomalna, cirkularna i nasleđuje se od majke. Zbog vrlo visokog stepena degradacije jedarne DNK, a zbog čestih gubitka korena dlake koji se ne može uvek naći na mestu zločina forenzičari su se fokusirali na primenu efikasnije ekstrakcije DNK iz dlake koju su pronašli na mestu zločina.

DNK analiza omogućava, ne samo identifikaciju vrste iz određenog uzorka, već i identifikaciju vrsta ukoliko je u pitanju mešoviti uzorak (prisutna DNK dve ili više jedinke). Ova metoda se bazira na analizi kontrolnog regiona mtDNK koji se odnosi na dužinu polimorfizama među vrstama. Specijes specifični PCR fragmenti različitih veličina mogu se lako razdvojiti na agaroznom gelu i pojedinačno izolovati za kasnije sekvenciranje i specijsku identifikaciju. Dva najčešća razloga zbog kojih se mtDNK uzima kao metoda za identifikaciju vrsta su sledeći: 1) u svakoj ćeliji se nalaze stotine i hiljade kopija mtDNK, pa se samim tim obezbeđuje veća koncentraciju DNK i smanjuje mogućnost da se dobiju nevalidni

rezultati zbog degradacije DNK i 2) najčešće se koriste univerzalni prajmeri koji amplifikuju nukleotidnu sekvencu (Karlsson i Holmlund, 2007). Takođe, velika prednost mtDNK je u tome što se mitohondrijalni lokusi već koriste u molekularnoj taksonomiji i filogeniji, pa o tome postoji dosta podataka u naučnoj literaturi. Takođe je činjenica da postoje univerzalni prajmeri koji se mogu primeniti na bilo koji uzorak nepoznatog porekla i možemo očekivati odgovarajuće rezultate (Johnson i sar., 2014). Najčešće korišćeni mitohondrijalni lokusi u molekularnoj taksonomiji i filogeniji su citohrom b gen i citohrom oksidaza 1 gen (Coghlan i sar., 2012).

Danas se smatra da postoji mogućnost analiza DNK iz različitih tkiva ili bri-seva bez prethodne izolacije DNK. Izostavljanje ovog koraka ima veliki broj pozitivnih strana. Vreme koje je potrebno da se uradi DNK profil smanjuje se skoro za dva sata, nema menjanja ependorf epruveta tokom procesa pa se i smanjuje mogućnost unosa strane DNK. Takođe je prednost i u tome što se smanjuje cena samog procesa i ne postoji potreba za kupovinom komercijalnih kitova za izolaciju. Najbitnije je i upravo to što se povećava senzitivnost testa, bez potrebe da se poveća broj ciklusa amplifikacije.

Sam proces izolacije DNK, doprinosi značajnom gubitku (20-70 procenata) DNK domaćina i dovodi u opasnost mogućnost da se u uzorak unese strana DNK. Direktna PCR izbegava potrebu za izolacijom DNK, već se ispitivani biološki materijal direktno unosi u PCR epruvete bez prethodnog koraka ekstrakcije ili prečišćavanja (Templeton i sar., 2013). U slučajevima kada je prisutna mala količina DNK ili se sumnja da je DNK oštećena, može se vršiti određivanje nukleotidne sekvence amplikona koristeći tehniku pirosekvenciranja. Ova tehnika se bazira na činjenici da se tokom sinteze DNK oslobađa pirofosfat. Kaskada enzimskih reakcija omogućava da se detektuje svetlost tokom DNK sinteze. Prednosti pirosekvenciranja su: tačnost, fleksibilnost, mogućnost paralelnog ispitivanja uzoraka i mogućnost lake automatizacije.

Dekodiranje celog genoma je bio ekstremno dug i težak proces koristeći Sanger sekvenciranje. Mogućnost paralelnog sekvenciranja, koji se još naziva sekvenciranje nove generacije, je unapredilo ovaj proces i omogućilo sekvenciranje celih genoma u roku od nekoliko nedelja za razumnu količinu novca (Renfree i sar., 2011).

Proces masovnog i paralelnog sekvenciranja omogućava identifikaciju ponavljajućih DNK sekvenci i vodi ka značajnom skraćenju vremena za identifikaciju novih STR lokusa i drugih visoko informativnih markera kao što je SNP (Freire-Aradas i sar., 2012). Novodetektovani STR lokusi kasnije mogu biti karakterizovani na osnovu svog polimorfizma, broja alela, heterozigotnosti, povezanosti i drugih relevantnih forenzičkih parametara koji se moraju uzeti u obzir (Johnson i sar., 2014).

Osim klasičnih uzoraka, danas se u forenzičkim ispitivanjima sve više koriste adhezivne trake koje mogu da se koriste za uzimanje uzoraka sa različitih fabričkih materijala, kože ili bilo koje druge površine. Razvoj direktnog protokola

DNK lize je danas u velikoj meri unapredio dosadašnje metode. On je doprineo smanjenju cene izolacije DNK i smanjio broj koraka tokom izolacije, što je posledično dodatno smanjilo mogućnost kontaminacije uzorka.

LITERATURA

1. Asprea, A., De Marinis, A., 2005. The diet of the badger *Meles meles* (Mustelidae, Carnivora) on the Apennines (Central Italy). *Mammalia*, 69 (1):89-95.
2. Coghlan, M., White, N., Parkinson, L., Haile, J., Spencer, P., Bunce, M. 2012. Egg forensics: An appraisal of DNA sequencing to assist in species identification of illegally smuggled eggs, *Forensic Science International: Genetics*, 6, 2:268-73.
3. Cooper, J., Cooper, M. 2007. *Introduction to Veterinary and Comparative Forensic Medicine*, Blackwell Publishing Ltd.
4. Freire-Aradas, Fondevila, M i sar. 2012. A new SNP assay for identification of highly degraded human DNA. *Forensic Science International: Genetics*, 6:341-9.
5. Iyengar, A. 2013. Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: A review, *Journal for Nature Conservation* 22 (3).
6. Johnson, R., Wilson-Wilde, L., Linacre, A. 2014. Current and future directions of DNA in wildlife forensic science, *Forensic Science International: Genetics*, 10:1-11.
7. Karlsson, A., Holmlund, G. 2007. Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing, *Forensic Science International*, 173, 1:16-20.
8. Kitpipit, T., Thanakiatkrai, P., Chotigeat, W. 2013. Direct PCR-FINS: Wildlife species identification without DNAextraction, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4:364-5.
9. Renfree, M. i sar. 2011. Genome sequence of an Australian kangaroo, *Macropus eugenii*, provides insight into the evolution of mammalian reproduction and development, *Genome Biology*, 12:R81.
10. Shen, M., Xiang, P., Yan, H., Shen, B., Wang, M. 2009. Analysis of anabolic steroids in hair: Time courses in guinea pigs, *Steroids*, 74, 9, 773-8.
11. Templeton, J., Ottens, R., Paradiso, V., Handt, O., Taylor, D., Linacre, A. 2013. Genetic profiling from challenging samples: direct PCR of touch DNA, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 4:224-5.
12. Tridico, S., Houck, M., Kirkbride, P., Smith, M., Yates, B., 2014. Morphological identification of animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls, *Forensic Science International*, 238;101-7.
13. Waits, L., Paetkau, D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection, *The Journal of Wildlife Management*, 69, 4:1419-33.
14. Zeder, M., Pilaar, S. 2010. Assessing the reliability of criteria used to identify mandibles and mandibular teeth in sheep, ovis, and goats, *Journal of Archaeological Science*, 37:225-42.

ISPITIVANJE PRISUSTVA PARVOVIRUSA I CIRKOVIRUSA U POPULACIJAMA DIVLJIH SVINJA I ŠAKALA

*Andrea Radalj¹, Nenad Milić¹, Isidora Prošić¹, Aleksandar Živulj²,
Damir Benković³, Jakov Nišavić¹*

Kratak sadržaj

Divlje svinje i zlatni šakali su rasprostranjene vrste divljači, a ujedno i rezervoari velikog broja virusa. Infekcija svinja izazvana svinjskim cirkovirusima 2 i 3 (PCV2 i PCV3) je povezana sa multisistemskim sindromom kržljivosti prasadi, pneumonijom, reproduktivnim problemima, sindromom dermatitisa i nefropatije svinja, a virus se može naći i kod asimptomatski inficiranih jedinki. Cirkovirus pasa (CCV) je identifikovan i kao uzročnik vaskulitisa, hemoragične dijareje i granulomatoznog limfadenitisa pasa, a tačna uloga navedenog virusa u infekcijama, kako pasa tako i divljih mesojeda, još uvek predstavlja predmet velikog broja ispitivanja i smatra se da se može prenositi između ovih populacija životinja. Poznato je da svinjski parvovirus 1 (PPV1) izaziva infekciju kod domaćih i divljih svinja koja se karakteriše pobačajima, rađanjem mumificirane prasadi i sterilitetom, a zahvaljujući molekularnim dijagnostičkim metodama otkriveni su i drugi parvovirusi svinja (PPV2-PPV7) sa još uvek neutvrđenim patogenim potencijalom. Parvovirus pasa (CPV) je uzročnik jednog od najvažnijih virusnih oboljenja ove vrste životinja i on, pored gastroenteritisa, dovodi do sistemske infekcije. Uzorci organa, poreklom od odstreljenih divljih svinja i šakala, su ispitivani primenom PCR u skladu sa protokolima uspostavljenim u Laboratoriji za virusologiju, Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Ispitani su zbirni uzorci slezine i limfnih čvorova poreklom od 102 divlje svinje pri čemu je detektovano prisustvo PCV2, PCV3, PPV1, PPV2, PPV5 i PPV7 u 18,9, 13,2, 24,5, 73,6, 3,8 i 41,5 procenata uzoraka, tim redom, a utvrđen je i veliki broj mešovutih infekcija. U zbirnim uzorcima slezine i limfnih čvorova, poreklom od 42 šakala, detektovano je prisustvo CCV u 38,1 i CPV u 19 procenata uzoraka. Navedeni rezultati predstavljaju jedan od prvih nalaza PCV3, PPV5, PPV7 i CCV u uzorcima poreklom od divljih životinja u Srbiji i ovo ispitivanje se nadovezuje na naše ranije studije predstavljajući osnovu za dalja planirana istraživanja koja se odnose na genetsku karakterizaciju detektovanih virusa.

Ključne reči: cirkovirusi, divlje svinje, parvovirusi, PCR, šakali

¹Dr sci. vet. med. Andrea Radalj, docent; dr sci. vet. med. Nenad Milić, redovni profesor; dr vet. Isidora Prošić, istraživač saradnik; dr sci. vet. med. Jakov Nišavić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za mikrobiologiju, Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Aleksandar Živulj, Veterinarski specijalistički institut "Pančevo", Pančevo, R. Srbija

³Spec. dr vet. Damir Benković, Veterinarski specijalistički institut "Sombor", Sombor, R. Srbija

e-mail adresa autora za korespondenciju: andrea.zoric@vet.bg.ac.rs

UVOD

Divlja svinja (*Sus scrofa*) predstavlja jednu od najrasprostranjenijih vrsta sisara širom sveta. Biološke osobenosti ove vrste životinja pogoduju njihovoj brojnosti, pri čemu klimatske promene i neki drugi humani faktori igraju važnu ulogu u ekspanziji divljih svinja u nova područja (Nišavić i sar. 2021a). Navedene životinje su rezervoari velikog broja virusa, a prelaze velike distance što je značajna komponenta dinamike infektivnih oboljenja u prirodi (Adlhoch i sar. 2010; Nišavić i sar., 2021a,b; Park i sar. 2021). Domaćinstva sa tradicionalnim pristupom uzgoju svinja, uobičajena u Srbiji, predstavljaju idealan izvor hrane za divlje svinje, a nizak nivo biosigurnosti omogućuje transmisiju patogena između ovih populacija životinja (Milićević i sar. 2016; Nišavić i sar. 2021a; Nišavić i sar. 2022). U proteklih nekoliko decenija, brojnost populacije zlatnih šakala (*Canis aureus*) se značajno uvećala tako da danas ove životinje zauzimaju velika područja širom jugoistočne Evrope, ali i delove centralne Evrope (Arnold i sar. 2012). Zlatni šakali su važni rezervoari različitih patogena značajnih za veterinarsku medicinu, međutim, njihov značaj i rasprostranjenost kod ovih životinja na novim teritorijama, su slabo opisani (Gowtage-Sequeira, 2004).

Parvovirusi su najmanji animalni DNK virusi koji izazivaju infekcije različitih vrsta domaćih i divljih životinja i svrstani su u familiju *Parvoviridae*. Oni imaju linearni jednolančani molekul DNK unutar kapsida ikosaedrične simetrije bez spoljašnjeg omotača. Parvovirusi su veoma otporni u spoljašnjoj sredini što olakšava njihovo indirektno prenošenje na osetljive životinje, a izlučuju se putem fecesa i drugih sekreta (Nišavić i sar. 2021a). Neka od najvažnijih parvovirusnih oboljenja su izazvana psećim parvovirusom (CPV), virusom panleukopenije mačaka (FPV) kao i parvovirusima svinja (PPV), gde se naročito ističe svinjski parvovirus 1 (PPV1) (Buonavoglia i sar. 2001; Nišavić i sar. 2021a; Radalj i sar. 2022). Navedeni virus izaziva infekciju kod domaćih i divljih svinja koja se karakteriše pobačajima, rađanjem mumificirane prasadi i posledičnom pojavom steriliteta (Csagola i sar. 2012). Poslednjih godina su, zahvaljujući primeni molekularnih metoda, otkriveni i drugi parvovirusi svinja (PPV2-PPV7) sa još uvek neutvrđenim patogenim potencijalom (Kim i sar. 2021; Nišavić i sar. 2021a). U cilju detekcije parvovirusa u populacijama divljih svinja, adekvatne uzorke predstavljaju uzorci limfatičnog tkiva ili parenhimatozni organi odstreljenih životinja (Nišavić i sar. 2021a,b). Parvovirus pasa izaziva jedno od najznačajnijih virusnih oboljenja ove vrste životinja pri čemu je bolest naročito izražena kod štenadi i mladih pasa dovodeći do pojave gastroenteritisa i teške sistemske infekcije (Buonavoglia i sar. 2001). Transmisija CPV je dokazana i među različitim vrstama životinja u divljini, kao i između domaćih i divljih životinja (Van Arkel i sar. 2019; Urbani i sar. 2020). Pogodne uzorke za analizu prisustva CPV u populacijama šakala predstavljaju: feces, slezina, jetra kao i deo tankog creva (Radalj i sar. 2022).

Cirkovirusi svinja 1, 2, 3 i 4 (PCV1-PCV4) i cirkovirus pasa (CCV) su svrstani u familiju *Circoviridae* za čije predstavnike je karakterističan genom sačinjen od molekula cirkularne, jednolančane i pozitivno orijentisane DNK. Cirkovirus

svinja 2 je veoma rasprostranjen patogen divljih i domaćih svinja, odgovoran za različite sindrome, jednim imenom nazvane cirkovirusno oboljenje svinja (engl. *Porcine Circovirus Associated Disease*, PCVAD) (Weissenbacher-Lang i sar. 2020; Nišavić i sar. 2021a). Navedeno oboljenje uključuje multisistemski sindrom krležljivosti prasadi, pneumoniju, reproduktivne probleme i sindrom dermatitisa i nefropatije. Virus se lako širi u populaciji svinja i to uglavnom direktnim kontaktom, a dugotrajno se izlučuje putem respiratornih sekreta, fecesa i urina (Nišavić i sar. 2021a; Radalj i sar. 2022). Cirkovirus 3 je nedavno otkriven i povezan sa sličnim oboljenjima kao PCV2, ali se može naći i kod klinički zdravih jedinki, što ukazuje na njegovu ubikvitarnu prirodu (Franzo i sar. 2018; Klaumann i sar. 2019; Nišavić i sar. 2021a). Najpodesniji uzorci za analizu prisustva cirkovirusa u tkivima divljih svinja su: slezina, jetra, tonzile ili limfni čvorovi (Nišavić i sar. 2022; Radalj i sar. 2022). Cirkovirus pasa (CCV) je prvi put otkriven 2012. godine u uzorcima krvnog seruma pasa bez kliničkih simptoma oboljenja, a od tada je identifikovan i kao uzročnik vaskulitisa, hemoragične dijareje i granulomatoznog limfadenitisa pasa, dok kod lisica pokazuje neurovirulentna svojstva (Ljokić i sar. 2016; Piewbang i sar. 2018; Urbani i sar. 2020; Franzo i sar. 2021). Uprkos tome, tačna uloga navedenog virusa u infekcijama, kako pasa tako i divljih mesojeda, još uvek predstavlja predmet velikog broja ispitivanja i smatra se da se može prenositi između ovih populacija životinja (Ljokić i sar. 2016; Franzo i sar. 2021). Uzorci poreklom od šakala za ispitivanje prisustva CCV uključuju feces, limfne čvorove, parenhimatozne organe ili deo tankog creva (Radalj i sar. 2022). U rutinskoj dijagnostici parvovirusnih i cirkovirusnih oboljenja životinja se koristi lančana reakcija polimeraze (PCR) i ova metoda obezbeđuje pravovremeno dobijanje pouzdanih rezultata ispitivanja, čak i u slučajevima analize autoliziranih uzoraka tkiva što se često događa kada se ispituje materijal poreklom od divljači (Piewbang i sar. 2018; Nišavić i sar. 2021a; Radalj i sar. 2022).

Cilj naših ispitivanja je bilo utvrđivanje prisustva i diverziteta različitih parvovirusa i cirkovirusa kod divljih svinja i zlatnih šakala. S obzirom na brojnost ovih vrsta životinja na teritoriji naše zemlje, kao i na činjenicu da se ovakvi uzorci retko sistematski ispituju na prisustvo navedenih virusa, dobijeni podaci imaju značaj, naročito kao osnova za detaljnija istraživanja u ovoj oblasti.

MATERIJAL I METODE

Prikupljanje i obrada uzoraka

Ispitani su zbirni uzorci slezine i limfnih čvorova poreklom od 102 divlje svinje, odnosno 42 zlatna šakala prikupljeni na lovištima u Južnom Banatu i Zapadnoj Bačkoj u periodu od 2021. do 2022. godine. Prilikom uzorkovanja, ispitivani materijal je uranjan u minimalni esencijalni medijum (MEM, Capricorn Scientific, Nemačka) sa 2% fetalnog telećeg seruma (FBS-12A, Capricorn Scientific, Nemačka) sa dodatkom rastvora antibiotika i antimikotika, a zatim transportovan uz poštovanje principa hladnog lanca. Uzorci su u laboratoriji homo-

genizovani u fosfatnom slanom puferu (PBS), centrifugirani tokom 10 minuta na 1 677 g, a dobijeni talog je korišćen u postupku ekstrakcije DNK primenom GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, SAD) prema protokolu proizvođača. Ekstrahovana DNK je zatim čuvana na -20 °C do sprovođenja daljih ispitivanja.

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Prethodno pripremljeni uzorci, poreklom od divljih svinja i šakala, su ispitivani na prisustvo parvovirusa i cirkovirusa karakterističnih za navedene životinjske vrste. Uzorci poreklom od divljih svinja su ispitivani na prisustvo PCV2, PCV3 i PPV1-7 primenom prethodno navedenih parova prajmera (Soares i sar. 1999; Csagola i sar. 2012; Ni i sar. 2014; Franzo i sar. 2018; Wang i sar. 2019; Weissenbacher-Lang i sar. 2020, Kim i sar. 2021). Detekcija CCV i CPV u uzorcima poreklom od šakala je vršena specifičnim prajmerima dizajniranim u već objavljenim studijama (Buonavoglia i sar. 2001, Piewbang i sar. 2018). Termalni protokoli za izvođenje PCR su adaptirani u skladu sa uslovima, odnosno reagensima koji su u upotrebi na Katedri za mikrobiologiju i prikazani su u tabeli 1. Kao pozitivne kontrole, za izvođenje PCR su korišćeni ekstrakti DNK u kojima je prethodno potvrđeno prisustvo PCV2, PCV3, PPV2, PPV3, PPV4, PPV5, PPV6, PPV7 i CCV primenom PCR i sekvenciranja po Sangeru (interne kontrole), dok su kao pozitivne kontrole za PPV1 i CPV korišćeni DNK ekstrakti *Teen* soja PPV1, odnosno vakcine Nobivac DHP (Intervet International B.V., Holandija). Dobijeni PCR produkti su analizirani primenom elektroforeze u 1,5% agaroznom gelu, a prisustvo određenog broja baznih parova (bp) u zavisnosti od korišćenog PCR protokola, a u skladu sa korišćenom pozitivnom kontrolom, smatrano je pozitivnim rezultatom (tabela 1).

Tabela 1. Modifikovani protokoli za detekciju PPV1-7, PCV2, PCV3, CPV i CCV

	Termalni protokol	Broj bp PCR produkta
PPV1-4	94°C (4 min.) 35 ciklusa [94°C (1 min.), 55°C (1 min.), 72°C (1 min.)] 72°C (7 min.)	330 bp (PPV1); 279 bp (PPV2); 392 bp (PPV3); 284 bp (PPV4).
PPV5	94°C (3 min.) 35 ciklusa [94°C (30 sek.), 60°C (30 sek.), 72°C (1 min.)] 72°C (7 min.)	945 bp
PPV6	94°C (3 min.) 35 ciklusa [94°C (30 sek.), 52°C (30 sek.), 72°C (1 min.)] 72°C (7 min.)	371 bp
PPV7	94°C (4 min.) 40 ciklusa [94°C (30 sek.), 60°C (30 sek.), 72°C (1 min.)] 72°C (5 min.)	384 bp

nastavak Tabele 1.

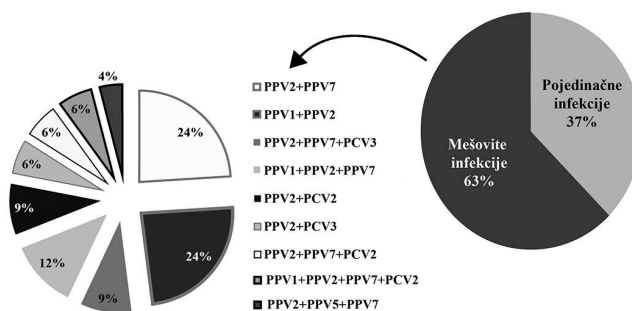
PCV2	94°C (4 min.) 40 ciklusa [94°C (30 sek.), 55°C (30 sek.), 72°C (1 min.)] 72°C (5 min.)	353 bp
PCV3	94°C (4 min.) 45 ciklusa [94°C (30 sek.), 68°C (30 sek.), 72°C (1 min.)] 72°C (7 min.)	500 bp
CPV	94°C (3 min.) 40 ciklusa [94°C (1 min.), 55°C (1 min.), 72°C (1 min.)] 72°C (7 min.)	555 bp
CCV	94°C (4 min.) 40 ciklusa [94°C (1 min.), 50°C (1 min.), 72°C (1 min.)] 72°C (7 min.)	517 bp

REZULTATI

Primenom opisanih PCR protokola, u uzorcima poreklom od divljih svinja, je dokazano prisustvo PCV2, PCV3, PPV1, PPV2, PPV5 i PPV7 (tabela 2) kao i veliki broj mešovitih infekcija (slika 1).

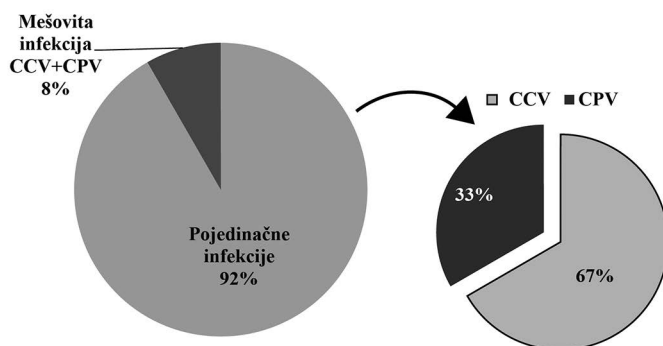
Tabela 2. Zastupljenost detektovanih parvovirusa i cirkovirusa svinja u odnosu na ukupan broj uzoraka

Ukupan broj detektovanih virusa (%)	
PPV1	24,5
PPV2	73,6
PPV3	0
PPV4	0
PPV5	3,8
PPV6	0
PPV7	41,5
PCV2	18,9
PCV3	13,2



Slika 1. Grafički prikaz zastupljenosti pojedinačnih i mešovitih infekcija različitim parvovirusima i cirkovirusima svinja u odnosu na broj pozitivnih uzoraka

U zbirnim uzorcima slezine i limfnih čvorova, poreklom od 42 zlatna šakala, detektovano je prisustvo CCV u 38,1 procenata i CPV u 19 procenata od čega su 2,4 procenta bile mešovite infekcije. Na Slici 2. je prikazan odnos pojedinačnih i mešovitih infekcija navedenim virusima u odnosu na broj pozitivnih nalaza.



Slika 2. Grafički prikaz zastupljenosti pojedinačnih i mešovitih infekcija parvovirusom i cirkovirusom pasa u odnosu na broj pozitivnih uzoraka

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Prikazani rezultati ispitivanja ukazuju na veliku zastupljenost različitih parvovirusa i cirkovirusa u populacijama divljih svinja i šakala u Srbiji. Različiti parvovirusi svinja su detektovani i u do 73,6 procenata ispitivanih uzoraka, a među pozitivnim uzorcima je zabeleženo više mešovitih (63 procenta) nego pojedinačnih infekcija (37 procenta). Navedeni nalaz ukazuje na nešto više vrednosti u odnosu na rezultate ispitivanja Nišavića i sar. (2021b) sprovedeno na uzorcima poreklom od divljih svinja iz Južnog Banata. Međutim, u našu studiju je bio uključen veći broj različitih parvovirusa što je moglo da ima uticaja na pomenutu razliku. Za razliku od naših rezultata, Opriessnig i sar. (2014) ukazuju na značajno veću zastupljenost pojedinačnih infekcija u odnosu na mešovite infekcije svinjskim parvovirusima i cirkovirusima u populacijama domaćih svinja (od 4 do 19 procenata). Slično tome, ispitivanja uzoraka poreklom od divljih svinja u Rumuniji, ukazuju na veći broj pojedinačnih infekcija svinjskim parvovirusima (Cadaru i sar. 2013). Kada su u pitanju pojedinačni virusi, u ovoj studiji je PPV1 zabeležen u 24,5 procenata uzoraka, što je značajno manje u odnosu na rezultate Nišavića i sar. (2021b), ali je u korelaciji sa rezultatima ispitivanja sprovedenim na velikom broju uzoraka poreklom od divljih svinja u Rumuniji i ranijoj studiji sprovedenoj u Srbiji (Cadaru i sar. 2012a; Milićević i sar. 2016). Najzastupljeniji parvovirus u ovom ispitivanju je bio PPV2 (73,6 procenata uzoraka) što je daleko više od rezultata Nišavića i sar. (2021b) (21,7%). Međutim, podaci Milićevića i sar. (2016), ukazuju na visoku seroprevalencu anti-PPV2 antitela u krvnim serumima divljih svinja u Srbiji. Zanimljivo je da PPV3 nije detektovan u ovom istraživanju, a bio je najčešće detektovan parvovirus u studiji Nišavića i sar. (2021b) u čak 69,6 procenata uzoraka. On je i sve češći nalaz i u drugim studijama širom Evrope (Adlhoch i sar. 2010; Palinski i sar. 2016). Slično drugim ispitivanjima, naši rezultati ne ukazuju na prisustvo PPV4 u ispitivanim populacijama divljih svinja (Cadaru i sar. 2013; Opriessnig i sar. 2014; Nišavić i sar. 2021b). Ispitivanja prisustva različitih parvovirusa u populacijama divljih svinja su ređe dostupna u odnosu na rezul-

tate studija koje se odnose na domaće svinje. Međutim, jedno ispitivanje, slično našem, sprovedeno sa ciljem utvrđivanja prisustva svinjskih parvovirusa kod divljih svinja u Južnoj Koreji, ukazuje na nalaz PPV1, PPV5 i PPV7 kod navedenih životinja. Za razliku od naših rezultata autori ističu visoku prevalenciju PPV3 i PPV4, dok PPV2 nije detektovan (Park i sar., 2021). Takođe, bez obzira na značajan broj ispitanih uzoraka, pomenuti autori su retko beležili prisustvo mešovite infekcije. Naši rezultati dokazuju relativno visoku zastupljenost uzoraka divljih svinja pozitivnih na prisustvo PCV2. Međutim, literaturni podaci ukazuju da ove vrednosti variraju ne samo među različitim zemljama, nego i u okviru jedne teritorije iste države (Cadar i sar., 2012b). Navedene razlike se uglavnom zasnivaju na različitim načinima uzgoja svinja u određenim regionima pri čemu se zapaža veća prevalencija PCV2 u populacijama divljih svinja sa teritorija gde je karakterističan ekstenzivan uzgoj domaćih svinja. Naši rezultati su u skladu sa navedenom tvrdnjom s obzirom da je veći broj manjih domaćinstava sa tradicionalnim pristupom držanju domaćih svinja zastupljen na teritoriji gde smo sprovedeli uzorkovanje materijala. Prisustvo pomenutog virusa je i ranije zabeleženo u Srbiji, međutim u rezultatima Nišavića i sar. (2022) iz sezone 2018/2019 dokazan je veći broj PCV2 pozitivnih uzoraka poreklom od divljih svinja iz Južnog Banata (40,32 procenta) naspram našeg nalaza (18,9 procenata). Divlje svinje su prijemčive na infekciju PCV3 i rezultati drugih autora ukazuju na visoku prevalenciju ovog virusa kod njih (Klaumann i sar., 2019). Uprkos tome, interesantno je da Nišavić i sar. (2022) nisu zabeležili prisustvo ovog virusa kod divljih svinja sa iste teritorije u ispitivanju sprovedenom na uzorcima iz sezone 2018/2019, tako da naši rezultati predstavljaju prvi nalaz ovog virusa u populaciji divljih svinja u Srbiji.

Cirkovirus pasa je predmet sve većeg broja ispitivanja zbog svog potencijalnog kliničkog značaja za domaće pse. Iz navedenog razloga, sve su brojnije studije koje ukazuju na prisustvo CCV i u populacijama različitih vrsta divljači kao što su vukovi (*Canis lupus*) i lisice (*Vulpes vulpes*) (Franzo i sar., 2021). O ulozi šakala kao rezervoara ovog virusa u prirodi ima malo dostupnih podataka, a naši rezultati predstavljaju prvi nalaz navedenog virusa kod ove vrste životinja u Srbiji. Prisustvo CCV u populacijama lisica je dokazano u jednoj retrospektivnoj studiji (Urbani i sar., 2020) sprovedenoj na uzorcima prikupljenim između 1996. i 2001. godine, što predstavlja period pre zvaničnog otkrića ovog virusa 2012. godine. Naši rezultati ukazuju na nešto višu zastupljenost CCV u populaciji zlatnih šakala u poređenju sa dostupnim podacima iz literature koji se odnose na lisice i vukove (Urbani i sar. 2020; Franzo i sar. 2021). Slično tome, ispitivanje Ljokića i sar. (2016) sprovedeno na uzorcima fecesa lisica iz prigradskih područja u Hrvatskoj dokazuje prisustvo CCV i CPV relativno malom broju uzoraka. Parvovirusi su veoma otporni u spoljašnjoj sredini, pri čemu CPV opstaje i cirkuliše u populacijama pasa zahvaljujući njegovoj indirektnoj fekalno-oralnoj transmisiji. Na sličan način se najverovatnije odigrava i prenošenje ovog virusa između domaćih pasa i divljih mesojeda (Gowtage-Sequeira, 2004). Pored toga, smatra se da lisice predstavljaju rezervoar CPV u prirodi, pri čemu ovaj virus vodi poreklo od muti-

ranog virusa panleukopenije mačaka (FPV) koji se iz populacije lisica prilagodio psima (Van Arkel i sar. 2019; Urbani i sar. 2020). U našem ispitivanju je utvrđeno prisustvo CPV u manjem broju uzoraka (19 procenata) u poređenju sa CCV pri čemu je zabeležen i mali broj mešovityh infekcija. Ograničen broj studija se bavio prisustvom CPV u populacijama šakala, a neki rezultati pojedinih ispitivanja ukazuju da je prevalencija ovog virusa u populaciji šakala zanemarljiva u odnosu na domaće pse (Gowtage-Sequeira, 2004).

Divlje svinje predstavljaju rezervoare mnogobrojnih virusa od kojih neki imaju veliki značaj u veterinarskoj medicini, a takođe mogu poslužiti i kao model za praćenje cirkulacije različitih virusa u prirodi. Navedene životinje nisu podjednako sklone razvoju klinički manifestnog oboljenja kao domaće svinje, naročito kada se radi o infekcijama ubikvitarnim virusima kao što su parvovirusi i cirkovirusi kod kojih veliki značaj imaju i nepovoljni faktori sredine. Postavlja se pitanje, da li domaćinstva sa ekstenzivnim tipom uzgajanja svinja koje karakteriše nizak nivo biosigurnosti predstavljaju potencijalni izvor virusa za divlje svinje i koji su putevi transmisije ispitivanih virusa između populacija domaćih i divljih svinja. Verovatnoća transmisije različitih PPV između divljih i domaćih svinja je visoka s obzirom na stabilnost ovih virusa u spoljašnjoj sredini pri čemu naše ispitivanje predstavlja prvi nalaz PPV5 i PPV7 kod divljih svinja u Srbiji. Detektovani smo veliku zastupljenost mešovityh infekcija koje u slučaju parvovirusa mogu predstavljati osnovu za pojavu rekombinacija među ovim virusima što će biti predmet naših budućih istraživanja. Pseći cirkovirus predstavlja novootkriveni patogen pasa koji sve više dobija na značaju u patologiji različitih oboljenja ovih životinja. U Srbiji ne postoje dostupne studije o ovom virusu, ni kod divljih ni kod domaćih životinja, pri čemu naši rezultati dokazuju cirkulaciju ovog virusa u populacijama zlatnih šakala kao potencijalnog rezervoara CCV u prirodi. Dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za dalja ispitivanja koja bi mogla da ukažu na značaj ovakvih nalaza u populacijama divljih mesojeda, ali i osnovu za karakterizaciju CCV kako kod divljih tako i kod domaćih pasa u našoj zemlji. Pored toga, neophodno je skrenuti pažnju kolegama koji se bave kliničkom praksom, na postojanje i potencijalni klinički značaj ovog virusa kao i na mogućnost vršenja laboratorijskog ispitivanja suspektnih uzoraka. Takođe je potrebno rasvetliti potencijalne puteve transmisije CCV i CPV između pasa i šakala, naročito u okolini naseljenih mesta gde je povećana verovatnoća kontakata ove dve vrste životinja. Nalaz CPV u uzorcima poreklom od šakala, ukazuje na značaj doslednog sprovođenja imunoprofilakse pasa, naročito u predelima gde postoji mogućnost njihovog direktnog ili indirektnog kontakta sa divljim životinjama. Prikazani rezultati predstavljaju jedan segment naših ispitivanja koja dalje imaju za cilj genetsku karakterizaciju svih navedenih virusa divljih životinja i ispitivanje njihovih sličnosti i razlika sa virusima detektovanim kako kod divljih, tako i kod domaćih životinja u našoj zemlji i širom sveta.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Adlhoch C., Kaiser M., Ellerbrok H., Pauli G. 2010. High prevalence of porcine Hokovirus in German wild boar populations. *Virology Journal*, 7:171. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-171>.
2. Arnold J., Humer A., Heltai M., Murariu D., Spassov N., Hackländer K. 2012. Current status and distribution of golden jackals (*Canis aureus* L., 1758) in Europe. *Mammal Review*, 42:1-11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00185.x>.
3. Buonavoglia C., Martella V., Pratelli A., Tempesta M., Cavalli A., Buonavoglia D., Bozzo G., Elia G., Decaro N., Carmichael L. 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *Journal of General Virology*, 82:3021-3025. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-12-3021>.
4. Cadar D., Csagola A., Kiss T., Tuboly T. 2013. Capsid protein evolution and comparative phylogeny of novel porcine parvoviruses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66:243-253. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.09.030>.
5. Cadar D., Csagola A., Lorincz M., Tombacz K., Spinu M., Tuboly T. 2012b. Detection of natural inter- and intra-genotype recombination events revealed by cap gene analysis and decreasing prevalence of PCV2 in wild boars. *Infection, Genetics and Evolution*, 2:420-427. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.01.014>.
6. Cadar D., Dan A., Tombacz K., Lorincz M., Kiss T., Becskei Z., Spinu M., Tuboly T., Csagola A. 2012a. Phylogeny and evolutionary genetics of porcine parvovirus in wild boars. *Infection, Genetics and Evolution*, 12:1163-1171. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.020>.
7. Csagola A., Lorincz M., Cadar D., Tombacz K., Biksi I., Tuboly T. 2012. Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Archives of Virology*, 157:1003-1010. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1257-3>.
8. Franzo G., Legnardi M., Centelleghè C., Tucciarone C. M., Cecchinato M., Cortey M., Segalés J., Drigo M. 2018. Development and validation of direct PCR and quantitative PCR assays for the rapid, sensitive, and economical detection of porcine circovirus 3. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30:538-544. <https://doi.org/10.1177/1040638718770495>.
9. Franzo G., Menandro M. L., Tucciarone C. M., Barbierato G., Crovato L., Mondin A., Libanora M., Obber F., Orusa R., Robetto S., Citterio C., Grassi L. 2021. Canine Circovirus in Foxes from Northern Italy: Where Did It All Begin? *Pathogens*, 10:1002. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081002>.
10. Gowtage-Sequeira S. 2004. The importance of jackals and domestic dogs for the transmission of generalist canid pathogens to sympatric carnivores in Namibia. PhD Thesis, University of Edinburgh. <https://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.651678>.
11. Kim S. C., Jeong C. G., Nazki S., Lee S. I., Baek Y. C., Jung Y. J., Kim W. I. 2021. Evaluation of a multiplex PCR method for the detection of porcine parvovirus types 1 through 7 using various field samples. *PLoS ONE*, 16:e0245699 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245699>.
12. Klaumann F., Correa-Fiz F., Franzo G., Sibila M., Nunez J. I., Segales J. 2018. Current knowledge on porcine circovirus 3 (PCV-3): A novel virus with a yet unknown impact on the swine industry. *Frontiers in Veterinary Science*, 5:315. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00315>.
13. Lojkić I., Biđin M., Prpić J., Šimić I., Krešić N., Bedeković T. 2016. Faecal virome of red foxes from peri-urban areas. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 45:10-15. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.01.005>.
14. Milicevic V., Radojicic S., Valcic M., Ivovic V., Radosavljevic V. 2016. Evidence of Aujeszky's disease in wild boar in Serbia. *BMC Veterinary Research*, 12:134. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0758-9>.
15. Ni J., Qiao C., Han X., Han T., Kang W., Zi Z., Cao Z., Zhai X., Cai X. 2014. Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in China. *Virology Journal*, 11:203. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0203-2>.
16. Nišavić J., Milić N., Radalj A., Mirilović M., Vejnović B., Čosic M., Knežević A., Veljović Lj., Živulj A. 2022. Detection and

characterisation of porcine circoviruses in wild boars in northeastern Serbia. *Veterinarni Medicina*, 67:131-137. <https://doi.org/10.17221/32/2021-VETMED>. **17.** Nišavić J., Milić N., Radalj A., Krnjaić D., Miličević D., Knežević A., Radojičić M., Obrenović S., Čosić M., Tešović B., Benković D., Živulj A. 2021b. Genetic Analysis and Distribution of Porcine Parvoviruses Detected in the Organs of Wild Boars in Serbia. *Acta Veterinaria-Beograd*, 71:32-46. <https://doi.org/10.2478/acve-2021-0003>. **18.** Nišavić J., Radalj A., Milić N., Živulj A., Benković D., Stanojković A., Prošić I. 2021a, A Review of Some Important Viral Diseases of Wild Boars. *Biotechnology in Animal Husbandry* 37:235-254. <https://doi.org/10.2298/BAH2104235N>. **19.** Opriessnig T., Xiao C. T., Gerber P. F., Halbur P.G. 2014. Identification of recently described porcine parvoviruses in archived North American samples from 1996 and association with porcine circovirus associated disease. *Veterinary Microbiology*, 173:9-16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.024>. **20.** Palinski R. M., Mitra N., Hause B. M. 2016. Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. *Virus Genes*, 52:564-567. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1322-1>. **21.** Park G. N., Song S., Cha R. M., Choe S., Shin J., Kim S. Y., Hyun B. H., Park B. K., An D. J. 2021. Genetic analysis of porcine parvoviruses detected in South Korean wild boars. *Archives of Virology*, 166:2249-2254. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05106-x>. **22.** Piewbang C., Jo W. K., Puff C., van der Vries E., Kedsangsakonwut S., Rungsipipat A., Kruppa J., Jung K., Baumgärtner W., Techangamsuwan S., Ludlow M., Osterhaus A. D. M. E. 2018. Novel canine circovirus strains from Thailand: Evidence for genetic Recombination. *Nature-Scientific Reports*, 8:7524. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25936-1>. **23.** Radalj A., Nišavić J., Krnjaić D., Milić N., Prošić I. 2022. PCR dijagnostika nekih vrsta virusa kod divljih životinja. Primena PCR u otkrivanju gena rezistencije bakterija na fluorohinolone. In Zbornik predavanja XLIII Seminara za inovacije znanja veterinarina, Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu, 169-180. **24.** Soares R. M., Durigon E. L., Bersano J. G., Richtzenhain L. J. 1999. Detection of porcine parvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highly conserved nonstructural protein gene, NS-1. *Journal of Virological Methods*, 78:191-198. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00177-3](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00177-3). **25.** Urbani L., Tryland M., Ehrlich D., Fuglei E., Battilani M., Balboni A. 2020. Ancient origin and genetic segregation of canine circovirus infecting arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in Svalbard and red foxes (*Vulpes vulpes*) in Northern Norway. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68:1283-1293. <https://doi.org/10.1111/tbed.13783>. **26.** Wang Y., Yanga K., Wang J., Wanga X., Zhao L., Suna P., Lib Y. 2019. Detection and molecular characterization of novel porcine parvovirus 7 in Anhui province from Central-Eastern China. *Infection, Genetics and Evolution*, 71:31-35. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.004>. **27.** Weissenbacher-Lang C., Kristen T., Mendel V., Brunthaler R., Schwarz L., Weissenböck H. 2020. Porcine circovirus type 2 (PCV2) genotyping in Austrian pigs in the years 2002 to 2017. *BMC Veterinary Research*, 16:198. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02413-4>.

THE DETECTION OF PARVOVIRUSES AND CIRCOVIRUSES IN WILD BOAR AND JACKAL POPULATIONS

**Andrea Radalj, Nenad Milić, Isidora Prošić, Aleksandar Živulj,
Damir Benković, Jakov Nišavić**

Summary

Wild boars and golden jackals are widespread species and also represent reservoirs of many viruses. Infections of pigs and wild boar caused by porcine circoviruses 2 and 3 (PCV2 and PCV3) are associated with multisystemic wasting syndrome, pneumonia, reproductive problems, dermatitis and nephropathy syndrome, and can also be found in asymptomatic animals. Canine circovirus (CCV) causes vasculitis, hemorrhagic diarrhea, and granulomatous lymphadenitis, however, its exact role in domestic and wild canid infections is still subject to investigation, and it is possibly transmitted between these animal populations. Porcine parvovirus 1 (PPV1) causes infection in domestic and wild pigs, characterized by abortions, stillbirth, and sterility, while other porcine parvoviruses (PPV2-PPV7) are still of unclear pathogenicity. Furthermore, canine parvovirus (CPV) is one of the most important viral pathogens, causing gastroenteritis and systemic infection in canids. Organ samples from wild boars and jackals were examined by PCR using protocols established in the Laboratory of Virology of the Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade. Pooled samples of spleen and lymph nodes from 102 wild boars were examined, and PCV2, PCV3, PPV1, PPV2, PPV5, and PPV7 were detected in 18.9%, 13.2%, 24.5%, 73.6%, 3.8% and 41.5% of the samples, respectively, with a notable number of mixed infections. The presence of CCV in 38.1% and CPV in 19% of samples were detected in pooled samples of spleen and lymph nodes originating from 42 jackals. These results represent one of the first findings of PCV3, PPV5, PPV7, and CCV in samples from wildlife in Serbia, and this study is sequel of our previous examinations serving as a basis for further research related to the genetic characterization of detected viruses.

Key words: *circoviruses, jackals, parvoviruses, PCR, wild boar*

ULOGA I ZNAČAJ VETERINARSKJE STRUKE U RAZVOJU LOVSTVA

Vojislav Ilić

Kratak sadržaj

Transformacije tržišta zahtevaju adekvatan odgovor subjekata koji na njemu plasiraju svoju uslugu i robu. U Srbiji, vreme tranzicije se nastavlja i zahteva odgovor veterinarske struke. Da bi odgovor bio profesionalan, neophodno je sagledati trenutno stanje struke, kako u Srbiji, tako i u okruženju i proaktivno delovati na tržištu usluga i roba. Treba pronalaziti nove marketinške niše i obezbediti veterinarskoj profesiji atribut perspektivne profesije.

Ključne reči: *lovstvo, status veterinarske profesije*

Kao i sve druge profesije i naša, kroz vreme, pre svega zbog pritisaka na tržištu trpi konstantne i sve složenije promene. Hteli mi to da prihvatimo ili ne, konstatovali to kroz ekonomsku efikasnost naših privrednih subjekata ili ne, pristajali na te promene ili ne, ekstenzivno stočarenje, na globalnom nivou, živi poslednje dane i intenzivno gubi primat u proizvodnji namirnica animalnog porekla. To drastično utiče na potrebe tržišta za količinom, a i vrstom usluga koje se od nas očekuju.

U veterinarskim subjektima sa porodičnom tradicijom, roditelji ostaju na polju velike prakse dok se mlađe generacije sve češće, opravdano, okreću maloj praksi pa i nekim „egzotičnijim“ poslovima. Na osnovu razgovora sa studentima prve godine i onima na završnim godinama studija i Stivi Vonder i Rej Čarls bi videli da se ideje i predikcije čime će sa svršeni DVM baviti, dramatično menjaju. Sve je više studenata koji svoju karijeru vide u poslovima „komercijale“ ili higijeni i tehnologiji životnih namirnica animalnog porekla, napuštajući inicijalne snove da se bave velikom ili malom praksom. Razlozi su mnogobrojni i definitivno opravdani.

Ako pogledamo statistiku i brojke, možda nam neke ideje budu jasnije, hteli mi sa tim da se mirimo ili ne. Da, statistika jeste tačna obrada uglavnom netačnih podataka, ali je neumoljiva i vrlo precizna u definisanju globalnih trendova tržišta. Statistika FVE kaže da je 2018. godine (nisam uspeo da nađem novije podatke na internetu) u Evropi bilo 309 144 veterinaru. U toj brojci smo i mi sa tadašnjih 2 750 veterinaru sa licencom za obavljanje veterinarske delatnosti.

¹Dr sci. vet. med. Vojislav Ilić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači, Beograd, R. Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: voja@vet.bg.ac.rs

Izveštaj FVE tvrdi da smo „mlada profesija“. Najviše aktivnih veterinara je mlađe od 45 godina. Od ukupnog broja, 58 procenata su žene a 42 muškarci. U kategoriji do 40 godina starosti, procenat žena je još veći. Statistike za 2015. godinu kažu da je bilo 53 procenta veterinara ženskog pola, a da je taj broj još 2016. godine skočio na 58. Ovakvu, demografsku sliku profesije, podržava i činjenica da se u poslednjoj dekadi, na FVM u Beogradu, upisivalo znatno više devojaka.

Prema onome što nudimo tržištu, a to je usluga, spadamo u perspektivne profesije. U odnosu na 2015. godinu, kada je bilo 3 procenta nezaposlenih veterinara, 2016. godine, samo 1 procenat veterinara i dalje traži posao (58 procenata se bavi praktičnom – realnom – veterinom, 14 procenata radi upravne poslove, 11 procenata se bavi edukacijom na svim nivoima obrazovanja, 4 procenta je u industriji i 12 procenata obavlja ostale poslove koje veterinari mogu da obavljaju).

U budućnosti se predviđa veća potražnja za veterinarima koji će se baviti velikom praksom. Konkretnije, povećanje potražnje se odnosi na veterinare koji će voditi „menadžment“ stada i kontrolisati uslove proizvodnje, omogućavajući tako maksimalnu ekspresiju genetskog potencijala „proizvodnog pogona“, a ne one koji će lečiti pojedinačna grla koja iz zdravstvenih razloga izlaze iz procesa proizvodnje.

Sa druge strane, broj kućnih ljubimaca je u stalnom porastu pa i je potreba za našim uslugama u toj niši tržišta veća. U Evropi je 2015. godine bilo 157 000 000 kućnih ljubimaca, različitih vrsta i što je interesantno, najviše ima mačaka. Posle tri godine broj se povećao na 290 000 000 sa sličnom zastupljenošću vrsta. Broj grla namenjen ekonomskom iskorišćavanju je takođe porastao (2015. - 342 000 000, a 2018. - 371 000 000). Isti godišnjak navodi da 2/3 veterinara radi u maloj praksi a samo 1/3 u velikoj. Za ovakav trend transformacije tržišta mi još nismo spremni, ni mentalno ni organizaciono.

U Evropi je trenutno u piku, „bum“ male prakse i „niklo“ je mnogo malih ambulanti sa jednim, dva ili tri veterinara. Organizacija rada i zahtevi tržišta su dozvoljavali maloj praksi da u 26 procenata ambulanti radi jedan veterinar, u 17 procenata 2 veterinara i u 27 procenata ambulanti rade 3 veterinara.

Međutim, trend razvoja male prakse i zahtevi tržišta za sofisticiranom uslugom i složenim intervencijama, koje traže visok stepen stručnosti i obučenosti, ukazuje da sada dolazi do formiranja klinika u čijem sastavu se nalazi 5 i više zaposlenih veterinara uz „armiju“ dobro obučenih tehničara koji stručno i precizno obavljaju poslove za koje su školovani.

Interesantan je podatak, da je od anketiranih veterinara (i mi smo bili uključeni u ta istraživanja), 60 procenata izjavilo da bi ponovo odabralo istu profesiju kao svoj životni poziv. Ovaj podatak moramo sagledati veoma skeptično. Konkretni stav i distribucija frekvencije odgovora su statistički teško opisivi. Postoje kolege koje smatraju velikom greškom odluku da se upuste u zahtevne i dugogodišnje studije, sa sumnjivom perspektivom ostvarenja mladalačkih, uglavnom nerealnih ideja, o prirodi posla i logici profesije. Međutim, postoje i kolege koje

su prezadovoljne izborom i tvrde da smo perspektivna profesija i da je vrlo racionalan i pametan izbor veterine kao životne profesije.

Ako pokušamo, na našem primeru, da tumačimo ove čudne brojke, ne smeo smetnuti sa uma ni činjenicu da se sve više veterinara (u poređenju sa 2015. godinom) prihvata novih poslova i širi marketinšku nišu tržišta na kojoj plasiraju svoje usluge i proizvode i pronalaze uhlebljenje.

Otrcana je fraza „Zadnji je trenutak da se pogledamo u ogledalu i shvatimo ko smo, koliko smo spremni za današnje tržište i gde smo“ da bi adekvatno odgovorili zahtevima današnjeg tržišta. To je tržište potrošača, na kome nâs veterinar ima sve više, a broj potencijalnih klijenata se menja i numerički i po zahtevu za vrstom i kvalitetom plasirane usluge. Naime, prosečan veterinar Evrope godišnje troši preko 40 sati na Kontinuiranu edukaciju. Edukaciju u kojoj nije osnovni cilj obezbediti bodove za relicenciranje, nego edukaciju koja će im skrenuti pažnju na novine, neuobičajene vrste usluga i tokove savremene veterinarske prakse i pripremiti ih za funkcionisanje na sve zahtevnijem tržištu.

Zvuči blasfemično, ali u procesima Kontinuirane edukacija, broj sati konzumiranih edukacija posvećenih „tvrdim veterinarskim veštinama“ ustupa prostor satima posvećenim „mekim veštinama“. Jasno je da se učenjem, kao veštinom, nismo uopšte bavili i da sada izgleda neprihvatljivo da neko (makar i posle nespornog iskustva na edukaciji veterinara) kaže da ima mnogo toga, što je bitno za efikasno funkcionisanje naše struke na tržištu, a znatan broj veterinara i ne zna da te veštine postoje i da su mu, ne potreba, nego neophodnost.

Pored neoprostivo amaterskog poimanja mekih veština (komunikacije, persuzije, marketinga, prodaje, dodatne vrednosti, građenja lojalnih klijanata), čvrsto zatvaramo oči pred temom koju Evropska veterina etiketira kao trenutno akutni problem naše struke. Tema za koju sam ubeđen, da većina nas, ne zna ni šta znači je „*Burning out*“. Oko 85 procenata veterinara, članova AVMA, smatra da je to najveći problem naše struke i da je zastrašujuća činjenica da se tom problematikom malo ko ozbiljno bavi. A kod nas?

Konstatovana je prilično tragična činjenica da su veterinari Evrope više skloni stresu nego druge profesije. Neka istraživanja upozoravaju da smo, na svetskom nivou, skloniji samoubistvima, od 2 do 4 puta više nego lekari ili stomatolozi.

Hroničan umor, prolongirani stres, manjak motivacije, frustracije, cinizam, nezadovoljstvo postignutim, kognitivni problemi, problemi u komunikaciji sa okolinom, gubljenje kontrole nad sopstvenim ponašanjem i životnim odlukama, neopravdana i „manijakalna“ opsednutost poslom i zaradom, osećaj duboke bezperspektivnosti posla i života. Ovo može biti indukovano radom sa veoma „šarenim profilom“ klijenta koji konzumiraju naše usluge, najčešće nezadovoljni kvalitetom i cenom usluge, uz neosnovanu i ničim podržanu ideju brucoša FVM u Beogradu, da su se upisali na veterinu zbog toga što ne mogu da rade i komuniciraju sa ljudima. Ovakve disonance su okidači za ovo savremeno stanje (bolest), a

pored mentalnih problema nesumnjivo da mogu biti okidač za vrlo, teške i konkretne disfunkcije organskih sistema.

Prolongirano stanje stresa umanjuje rezultate rada, redukuje mogućnost logičkog i racionalnog razmišljanja i delanja i dovodi pojedinca u teško stanje smanjene mentalne uračunljivosti. Kako u profesionalnom, tako i u privatnom životu, „noseći“ osobu u stanja teške depresije i drugih mentalnih poremećaja i stanja nekontrolisane zavisnosti.

Tako, neopravdano omalovažavana, a već spominjana statistika, kaže da je prosečan veterinar u 2018. godini zarađivao, na godišnjem nivou, oko 40 000 €, muškarci nešto više (44 000€), a žene nešto manje (39 000 €), a to je statistika i ono što je prikazano poreskim upravama. Objektivna opservacija naše populacije veterinara nagoveštava da su, iako je statistička obrada bila besprekorna, pravi iznosi ipak sačuvani u dubokim čoškovima Limba. Ipak, oni nisu na nivou koji mi očekujemo i izvorište su svekolikog nezadovoljstva i frustracija.

Jedan od mogućih izlaza iz „krugova pakla“ je kompleksnije i sveobuhvatnije sagledavanje realnosti tržišta. Usko orjentisani na veliku i sve više, na malu praksu, treba da ispoljimo samoinicijativu i da se pojavimo na nekim tržištima koja nisu do sada pokazivala primeren i adekvatan interes za našim znanjem i veštinama. Gotovo „pred nosom“ nam druge profesije, neopravdano a opet samouvereno, sprečavaju pristup, pčelarstvu, uzgoju ribe i lovnoj privredi. Da nesreća bude veća, mi smo apsolutno pasivni u prodoru na ta tržišta i samo „svetli“ pojedinci i sporadične akcije nagoveštavaju moguće potencijale našeg prisustva u tim „industrijskim“ granama privrede.

Obeležavanje košnica, prodaja antiparazitika, antibiotika i neke „egzotične“ aktivnosti su maksimum našeg dosega, čast izuzecima, na polju pčelarstva. Uglavnom se radi o kolegama koji i sami imaju košnice i za lične potrebe ulaze dublje u problematiku proizvodnje i/ili kontrole proizvodnje meda.

Kad je u pitanju tov ribe, pojavljujemo se kao komercijalisti kuća koje plasiraju, uglavnom vrlo neselektivno, lekove i pomoćna lekovita sredstva za „uspešan“ uzgoj ribe. Koliko nâs ozbiljno shvata složen proces proizvodnje, optimalnu temperaturu vode, koja sa jedne strane treba da omogući rastvaranje neophodnih količina kisoenika u bazenu i omogući ribama da dišu, a opet da obezbedi i optimalnu temepaturu za metabolizam i tov ovih poikilotermnih životinja?

Naša efemerna uloga u lovnoj privredi je posebna, tužna, priča. Sigurno je da smo višegodišnjim propustima na svim nivoima funkcionisanja veterinarske struke, a agresivnom politikom kolega sa završenim Šumarskim i Poljoprivrednim fakultetom, koji su na svaki način gušili naše prisustvo i uticaj na razvoj ove perspektivne privredne grane, dovedeni u poziciju da nas pozovu samo kada treba pregledati „legalno“ odstreljenu divljač. To se dešava i kada se, prema njihovoj proceni, pojavi neki veći zdravstveni problem kod grla u kontrolisanim lovištima, pa im je neophodno naše poznavanje tretmana patoloških procesa kod divljači. Proces selekcije grla u proizvodnji trofejnih grla, njihova ishrana i uslovi držanja su, na žalost, uglavnom daleko od našeg uticaja.

Sekcija o „lovstvu“ treba da pobudi u slušaocima želju i ideju i da im nagovesti mogući profit i svrhu angažmana u lovnoj privredi Republike Srbije. Auditorijum će imati priliku da čuje ljude koji se bave problematikom koja, uz napor i upornost svakog pojedinačnog veterinara, može da odškrine vrata za novo tržište sa koga smo, sticajem niza nesretnih okolnosti, proterani već decenijama. Predavanja predstavljaju pokušaj organizatora Savetovanja da kolegama omogući pristup izvorima informacija i da definišu šta je to što mi možemo da ponudimo lovnoj privredi. Veterinari treba da budu najbolji izvor informacija i njima lovci mogu da se obrate kada im je neophodna pomoć stručnjaka koji vladaju ovom problematikom.

LITERATURA

1. FVE Survey of veterinary profession in Europe, October, 2019 2. Lovell LB, Lee TR, 2021, Burnout and health promotion in veterinary medicine, *Can Vet J*, 54(8): 790–1. 3. McVean A, 2018, How Do Veterinarians Die?, <https://www.mcgill.ca/oss/article/health/how-do-veterinarians-die>, 7 Aug. 4. Nolen RS, 2021, Getting to the root of overworked and burned-out veterinary practices, AVMA economic forum makes sense of workforce woes, Published on November 17. 5. Stoewen DL, 2015, Suicide in veterinary medicine: Let's talk about it, *Can Vet J. Jan*; 56(1): 89–92.

ROLE AND SIGNIFICANCE OF VETERINARY PROFESSION IN DEVELOPMENT OF HUNTING

Vojislav Ilić

Summary

Market transformations require an adequate response from entities that market their service/goods. In Serbia, the time of transition continues and requires a response from the veterinary profession. In order for the answer to be professional, it is necessary to look at the current state of the profession both in Serbia and in the surrounding area and proactively act on the service/goods market in order to find new marketing niches and provide the veterinary profession with the attribute of a perspective profession.

Key words: hunting, state of veterinary profession

FARMAKOTERAPIJA PARAZITSKIH INFEKCIJA DIVLJAČI, NAŠA ISKUSTVA

Saša M. Trailović, Darko Marinković

Kratak sadržaj

*U veterinarskoj medicini postoji potreba za individualnom terapijom i terapijom stada/krda/jata, kada se istovremeno tretira veći broj životinja. Sprovođenje individualne terapije uglavnom ne predstavlja veći problem, ali istovremena primena lekova kod velikog broja životinja zahteva posebnu opreznost, precizno doziranje i potrebu da životinje dobiju adekvatnu dozu leka. Ovo je posebno teško sprovesti kada postoji potreba za tretiranjem krda divljih životinja. Naša iskustva se odnose na primenu antiparazitskih lekova kod jelenske divljači (*Cervus elaphus* i *Dama dama*) u ograđenom i otvorenom lovištu i divljih svinja (*Sus scrofa*) u gaterima. U tretmanu smo koristili benzimidazole, triklabendazol i albendazol kod jelena i ivermektin kod divljih svinja. Lekove smo primenjivali nanete na kukuruz, u blisterima soli, odnosno umešane u prekrupu (ivermektin). Osnovni problemi na koje smo nailazili su bili: smanjena palatibilnost hrane na koju je nanešen lek, problem kontrole količine leka koju su životinje unosile (kontrola doziranja), osetljivost lekova na tehnološke procese u blistiranju soli kao i promene na samim solištima koje smo morali da obavimo da bi obezbedili postojanost leka. Naša iskustva ukazuju da je potrebno najmanje jedna do dve nedelje navikavanja životinja na nove uslove prihrane da bi se posle tog perioda mogla odrediti doza leka i dužina tretmana. U ovom radu detaljno su prikazane tehnike davanja antiparazitskih lekova divljim papkarima hranom i efikasnost ovakve terapije.*

Ključne reči: antiparazitski lekovi, divlje životinje, farmakoterapija

Specifičnosti farmakoterapije u veterinarskoj medicini se odnose pre svega na potrebu individualnog ili grupnog lečenja, koja zahteva posebnu strategiju u odnosu na odabir leka i način njegove aplikacije različitim vrstama životinjama. Posebno je problematično kako lek primeniti kod divljih životinja, kod kojih je gotovo neophodno istovremeno tretirati veći broj jedinki. U slučajevima kada je potrebno sprovesti farmakoterapiju stada/jata životinja, mora se uzeti u obzir niz faktora da bi se odredila najbolja strategija lečenja. Ukoliko se sledi strategija grupnog lečenja, neophodna je prethodna optimizacija bezbednog i efikasnog

¹Dr sci. vet. med. Saša M. Trailović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Darko Marinković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

e-mail autora za korespondenciju: sasa@vet.bg.ac.rs

grupnog tretmana uključujući farmakokinetiku/farmakodinamiku leka specifičnu za tu vrstu životinja. Neophodno je odabrati adekvatnu formulaciju propisanih lekova, vrstu i količinu hrane (značajno za doziranje leka), analizirati broj i vrstu izvora vode (značajno za doziranje leka), ispitati dizajn hranilišta, veličinu grupe životinja koja se leči, uzeti u obzir doba godine i zdravstveno stanje jedinki u grupi.

Kada su divlje životinje u pitanju i to pre svega divlji papkari, najčešće primenjivane farmakoterapijske procedure su kontrola i lečenje parazitskih bolesti. Niz efikasnih antihelmintika, uključujući benzimidazole i avermektine, sa značajnom aktivnošću protiv odraslih jedinki i larvi parazita je dostupan na tržištu, međutim većina nije odobrena za primenu kod divljih papkara. Shodno tome, efikasne doze lekova, putevi primene, potencijalna toksičnost, neželjeni efekti i predvidljiva efikasnost lekova uglavnom nisu utvrđeni za većinu divljih preživara. Upotreba antihelmintika kod divljači dodatno se komplikuje karencom koju je obavezno primeniti za većinu lekova.

Generalno najveći problem u sprovođenju farmakoterapije je kako aplikovati lek divljači i kako ga precizno dozirati. Predoziranje ili subdoziranje su podjednako opasni i mogu dovesti do ispoljavanja toksičnosti ili neuspeha terapije, razvoja rezistencije uzročnika infekcije ili izostajanja bilo kakvog terapijskog efekta. Posebno je značajno prekinuti primenu leka u određenom periodu pre početka lova zbog obezbeđenja karence. Naša iskustva se odnose na primenu antihelmintika kod jelenske divljači (*Cervus elaphus* i *Dama dama*) u zatvorenim i otvorenim lovištima i divlje svinje (*Sus scrofa*) u gaterima.

Krajem 2006. i početkom 2007. godine, pozvani smo da učestvujemo u rešavanju problema infekcije velikim američki metiljem jetre (*Fascioloides magna*) jelena lopatara u ograđenom rezidencijalnom objektu. Koprološkim pregledima i morfološkom analizom tokom 2007. godine, definitivno je potvrđena dijagnoza ove infekcije i to kako kod jelena lopatara, tako i kod evropskog jelena u otvorenim lovištima zapadne Vojvodine. O tome smo prvi izvestili na Inovacijama znanja veterinara, februara 2008. godine u Beogradu i kasnije publikovali celokupno istraživanje u *Journal of Wildlife Diseases* (Trailović i sar. 2016).

Do tada nismo imali nikakva iskustva o mogućim načinima davanja lekova divljim životinjama. Analizom literaturnih podataka i osnovu preporuke profesora Thomas M. Craig-a, sa Katedre za Patobiologiju, Texas A&M University, College Station, opredelili smo se za dvokratni tretman (u razmaku od 14 dana) benzimidazolskim antiparazitikom-triklabendazolom. Triklabendazol je gotovo idealan za tretman infekcije američkim metiljem (Riviere et al., 2018), što će kasnije biti obrazloženo. Lek je bio umešan u krunjeni kukuruz kojim su hranjeni jeleni, dva puta po sedam dana kontinuirano sa prekidom od dve nedelje između dve terapije. Tretirano je ukupno 124 grla jelena lopatara (*Dama dama*). Koncentracija leka je bila podešena tako da je svaki jelen tokom posete hranilištu uzimao dozu triklabendazola od 10-14 mg/kg. Oba tretmana su završena krajem februara 2008. godine. Problemi na koje smo naišli odnosili su se na činjenicu da su jeleni

bili naviknuti na prehranu klipovima kukuruza. Morali smo prvo da naviknemo jelene da jedu okrunjeni kukuruz da bi kasnije mogli da primenimo lek. Divljač je veoma oprezna i svaka promena ustaljenih navika zahteva vreme i strpljenje. Već tada smo zaključili da je za uspeh terapije kod divljači neophodna saradnja doktora veterinarske medicine, stručnjaka za lovstvo i pre svega lovučvarske službe. Bez njihove kooperacije i koordinacije potupaka, terapiju bi bilo nemoguće organizovati. Pored potrebnog navikavanja na kukuruz u zrnu, nama je bilo neohodno da što preciznije znamo broj grla koja posete hranilišta u toku dana, odnosno koliko kukuruza po poseti konzumiraju. Na osnovu ovog podataka, koji smo tokom perioda prilagođavanja dobili od lovučvara, bili smo u mogućnosti da podesimo dozu triklabendazola na 10-14 mg/kg telesne mase. Farmakoterapija je zaustavila dalja uginuća, a koprološki pregled (sproveden po završetku tretmana) na prisustvo jaja *F. magna*, dokazao je da je infekcija u visokom procentu bila redukovana. Međutim, negativni koprološki nalaz u slučaju infekcije sa *F. magna* ne znači da ona nije prisutna. Imali smo prilike da posle odstrela uradimo koprološki pregled fecesa uzetog direktno iz rektuma i da on bude negativan na prisustvo jaja parazita, a da u jetri pronađemo u potpuno zatvorenim cistama, uvek po dva polno zrela živa metilja (Trailović i sar., 2015).

Sledeći tretman istog krda jelena lopatara sproveden je naredne godine. Problem se ponovo pojavio zbog toga što nismo bili u mogućnosti da iz staništa uklonimo prelaznog domaćina barskog puža *Galba truncatula*, koji je zaštićena vrsta. Međutim, ovaj put je bila pokošena visoka trava oko pojilišta i na taj način je smanjena mogućnost prenosa infekcije sa puževa. Tretirali smo 80 životinja i primenili isti princip davanja medicirane hrane (zrno kukuruza), ali nismo bili u mogućnosti da nabavimo suspenziju triklabendazola, koja nije bila registrovana u Srbiji i koju smo prvi put dobili kao poklon od proizvođača. Zahvaljujući saradnji sa veterinarskim sektorom tadašnje a.d. Galenika i instituta Galenika, dobili smo određenu količinu stabilizovane 20% suspenzije albendazola pripremljenu za nanošenje i mešanje sa okrunjenim kukuruzom. Međutim, odmah na početku sprovođenja terapije, lovučvari su primetili nešto slabiju konzumaciju mediciranog obroka. Zaključili smo da je albendazol smanjio palatibilnost kukuruza i morali smo brzo da reagujemo. Posle konsultacija sa stručnjacima Galenike, u suspenziju albendazola dodat je natrijum hlorid u koncentraciji od 0,5% što je u potpunosti normalizovalo konzumaciju mediciranog kukuruza. Ovaj tretman je takođe bio vrlo uspešan, mada je efikasnost albendazola u poređenju sa triklabendazolom slabija, pre svega zato što on deluje samo na adultne metilje. Visoka efikasnost triklabendazola se objašnjava drugačijim mestom delovanja u odnosu na ostale benzimidazole. Triklabendazol se vezuje za specifično mesto na beta-tubulinu metilja a njegov metabolit TCBZ sulfoksid blokira transport sekretornih tela do tegumentalne površine, što kulminira potpunim gubitkom tegumenta (Stitt i Fairweather, 1994). To je i objašnjenje zašto triklabendazol deluje samo na trematode, a ne i na nematode kao ostali benzimidazoli.

Kao što smo prethodno naveli, infekcija američkim metiljem je 2007. godine u isto vreme dijagnostikovana i kod jelena u otvorenim lovištima zapadne Vojvo-

dine, lopatara i evropskog jelena. O načinu na koji je ova infekcija stigla u Srbiju i kako se širi svoje konačno mišljenje bi trebalo da daju epizootiolozi, a nama ostaje samo da problem rešavamo primenom lekova. Na žalost, vakcina protiv infekcija trematodama još uvek nema, a primena lekova u mediciranoj hrani u otvorenim lovištima je mnogo komplikovanija. Iz ovih razloga, odlučili smo da albendazol primenimo u blisterima soli (blokovima soli). Na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika albendazola i tehnološkog postupka dobijanja blokova soli, ovakav način primene ne menja farmakološke karakteristike benzimidazola. Prednost administracije antiparazitskog leka kroz „lizavce soli“ je mogućnost kontinuiranog davanja leka. U otvorenim lovištima, gotovo ne postoji mogućnost kontrole farmakoterapije mediciranom hranom, niti je moguće neutralisati prisustvo prelaznog domaćina *Galba truncatula*. Međutim, pre postavljanja blokova soli sa albendazolom primetili smo da su panjevi u koje se blokovi najčešće stavljaju izloženi padavinama (kiša, sneg, rosa), kada se oni rastvaraju i so ulazi u dubinu panja. Tom prilikom dolazi do izdvajanja albendazola i s obzirom na njegovu nerastvorljivost u vodi moglo bi da dođe do predoziranja. Da bi izbegli ovakvu situaciju, postavili smo nadstrešnice nad solištim. Ova nova okolnost je iznenadila jelene i neko vreme nisu prilazili blokovima. Taj period adaptacije je trajao jednu do dve nedelje, pa smo i ovo iskustvo primenili u kasnijim tretmanima. Inače smo koristili 10%-tnu koncentraciju albendazola u soli. Blokovi sa lekom su postavljeni u periodu od marta do dve nedelje pre početka lovne sezone. Na ovaj način je bilo obezbeđeno kontinuirano prisustvo leka u periodu kada puževi postaju aktivni i kada je infekcija jelena najverovatnija. Međutim, poznato je da albendazol može da ispolji teratogena svojstva, s obzirom na specifičnosti reproduktivnog ciklusa košuta lek bi trebalo da bude uklonjen najmanje u prvom mesecu graviditeta.

Pored benzimidazola, u blistere soli je moguće dodavati i avermektine. Avermektini su ektendocidi koji deluju na parazitske nematode, akarine i insekte. Nismo imali prilike da koristimo ovakav način administracije antiparazitika kod jelenske divljači ali smo preporučili upravo ovakav tretman u slučaju pojave šuge, kada se ivermektin koristi u blokovima u koncentraciji od 0,1% tokom 6 nedelja. Ovakvu preporuku dali smo na osnovu procene PK/PD odnosa ivermektina kod preživara i iskustava koje su publikovale kolege iz Rusije (Samoylovskaya i Uspensky, 2016).

Ivermektin se veoma uspešno može primeniti kod divljih svinja u gaterima umešan u kukuruznu prekrupu (Fernandez-de-Mera i sar. 2004). Formulacije ivermektina u obliku premiksa za mediciranu hranu su dostupne na tržištu i to u koncentraciji od 0,2%. Preporučena doza za svinje je 100 mg/kg telesne mase. Ova doza se postiže kada se u kukuruznu prekrupu umeša ivermektin premiks i to 120g 0,2 % premiksa na 100 kg prekrupe. Na ovaj način se dobija preporučena terapijska koncentracija ivermektina od 2,4 ppm, a tretman traje 7 dana. Ivermektin je efikasan antihelmintik koji deluje u veoma niskim dozama i zbog toga je veoma važno da se ravnomerno umeša u hranu. Predlog je da se mešanje sa hranom uradi kroz nekoliko faza. Prvo se odmerena doza umeša u manju količinu

hrane a tek zatim u celokupnu količinu dovoljnu za tretman životinja. Ivermektin ne menja palatibilnost hrane i divlje svinje, koje inače poseduju izuzetno osetljivo čulo ukusa i mirisa, je rado uzimaju. Karenca za meso svinja iznosi 12 dana i u tom periodu mesto tretiranih svinja nije za ljudsku upotrebu.

Među doktorima veterinarske medicine postoje različita mišljenja o efikasnosti i opravdanosti primene farmakoterapije kod divljih životinja. Činjenica je da u većini evropskih zemalja, osim jedne formulacije ivermektina, nema registrovanih lekova za divljač. Ovo predstavlja ozbiljan problem za sprovođenje terapije, međutim, u skladu sa Zakonom o lekovima Republike Srbije, odnosno članom koji se odnosi na pravilo „kaskada“, ukoliko ne postoji registrovani lek za tu životinjsku vrstu, može se koristiti lek za koga postoji dokazana, efikasna i neškodljiva doza, a namenjen je drugim vrstama. Naša iskustva ukazuju da farmakoterapija parazitskih infekcija divljači može biti veoma uspešna ali je prvi preduslov koordinacija i saradnja doktora veterinarske medicine, stručnjaka za lovstvo i lovočuvarske službe. Sa druge strane, edukacija kolega veterinara u odnosu na mogućnosti farmakoterapije je neohodna, kao i upoznavanje sa nekim specijalnim tehnikama primene lekova.

LITERATURA

1. Fernandez-de-Mera, I.G., Vicente, J., Gortazar, C., Höfle, U., Fierro, Y. 2004. Efficacy of an in-feed preparation of ivermectin against helminths in the European wild boar. *Parasitol Res.* 92 (2):133-6. 2. Riviere, J.E., Mark, G., Papich, M.G. 2018. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10th Edition, JohnWiley & Sons, Inc. 3. Stitt, A.W., Fairweather, I. 1994. The effect of the sulphoxide metabolite of triclabendazole ('Fasinex') on the tegument of mature and immature stages of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*.108 (Pt 5):555-67. 4. Samoylovskaya, N.A., Uspensky, A.V. 2016. Use of salt lick briquettes «ivirsalt» on natural areas of preferential protection in Russia for the prevention of parasitic diseases in wild hoofed animals. 3 (2):80-3. 5. Trailovic, S., Marinkovic, D., Kulisic, Z. 2016. Diagnosis and therapy of liver fluke (*Fascioloides magna*) infection in fallow deer (*Dama dama*) in Serbia. *J Wildl Dis.* 52 (2):319–26. 6. Trailović, S.M., Marinković, D., Trailović, J.N., Milovanović, M., Marjanović, D.S., Aničić MR. 2015, Pharmacological and morphological characteristics of the muscular system of the giant liver fluke (*Fascioloides magna* - Bassi 1875). *Exp Parasitol.* 159:136-42.

PHARMACOTHERAPY OF PARASITIC INFECTIONS IN WILD ANIMALS, OUR EXPERIENCES

Saša M. Trailović, Darko Marinković

Summary

In veterinary medicine, there is a need for individual therapy and herd/herd/flock therapy, when a large number of animals are treated at the same time. Implementati-

*on of individual therapy, generally does not represent a significant problem, but the simultaneous administration of drugs in a large number of animals requires special caution, precise dosing and the obligation that all animals receive an adequate dose of the drug. All of the above is especially difficult to implement when is necessary to treat herds of wild animals. Our experiences relate to the use of antiparasitic drugs in deer (*Cervus elaphus* and *Dama dama*) in fenced and open hunting grounds and wild boars (*Sus scrofa*) in fences. In the treatment we used benzimidazoles, triclabendazole and albendazole in deer and ivermectin in wild boars. We applied the drugs to the corn, in salt blisters, or mixed in the feed (ivermectin). The main problems we encountered were the reduced palatability of the medicated feed, the control of the amount of medicine that the animals ingested (dosage control), the sensitivity of the medicine to the technological processes in salt blistering, as well as the changes to the salt beds that we had to make. Our experiences indicate that it takes at least one to two weeks for the animals in order to adapt to a new way of feeding. After that period the dose of the drug and the length of the treatment can be determined. In this paper, we present in detail the techniques of administering antiparasitic drugs to wild ungulates through feed and the effectiveness of this therapy.*

Key words: antiparasitic drugs, pharmacotherapy, wild animals

**PARASITIC NEMATODES OF DOMESTIC AND WILD ANIMALS
AND SENSITIVITY TO ANTHELMINTICS**

**PARAZITSKE NEMATODE DOMAĆIH I DIVLJIH ŽIVOTINJA I
OSETLJIVOST NA ANTIHELMINTIKE**

Alan P. Robertson

Summary

*Parasitic diseases are among the most prevalent and important infectious diseases in wildlife. On the other hand, parasitic nematodes are highly diverse and common, infecting virtually all animal species, and the importance of their roles in natural ecosystems is increasingly becoming apparent. A special medical problem is the possibility of transmission of parasites from domestic to wild animals and vice versa. Furthermore, resistance of parasitic nematodes to anthelmintics is an increasing problem in veterinary medicine, but unfortunately there is very few data on the transmission of resistant strains of parasitic nematodes from domestic to wild animals. Today, we have a good understanding of several mechanisms by which parasitic nematodes become drug-resistant, as well as effective procedures for neutralizing resistance. A good example is *Haemonchus contortus* the parasitic nematode that shows the most intense degree of resistance to almost all known anthelmintics worldwide. *H. contortus* is able to be passed between cattle, sheep and deer, and back to cattle and sheep from deer. Alleles for benzimidazole (BZ) resistance were identified in β -tubulin of *H. contortus* of roe deer. These data suggest that roe deer can be a reservoir of resistant parasitic nematodes that can also endanger domestic ruminants. A range of antiparasitic drugs have been used to reduce parasitism in wild animal populations. By far the most common drug used was the standard veterinary and human deworming anthelmintic ivermectin. Since its discovery in 1973, ivermectin has been used to treat humans and domestic animals across the globe, because it is relatively inexpensive, effective across a broad range of parasites, and importantly, can be used to treat an individual successfully with a single oral or topical dose. The other most common deworming drugs which are applied to wild animals are levamisole, fenbendazole, albendazole and triclabendazole. However, the main problems in the deworming of wild animals are the choice of anthelmintics and the method of drug administration. The problem related to the methods of application of anthelmintics in wild animals generally does not exist in the pharmacotherapy of domestic animals and can be one of the most important causes of the development of parasite resistance in wildlife.*

Key words: *Wild animals, parasitic nematodes, anthelmintic drugs, resistance*

¹Alan P. Robertson, Associate Professor, Iowa State University, Department of Biomedical Sciences, Ames IA, USA

Kratak sadržaj

Parazitske bolesti spadaju u najrasprostranjenije i najvažnije zarazne bolesti životinja u divljini. S druge strane, parazitske nematode su veoma raznovrsne i čest uzrok parazitskih infekcija gotovo svih životinjskih vrsta, a važnost njihove uloge u prirodnim ekosistemima postaje sve očiglednija. Poseban medicinski problem predstavlja mogućnost prenošenja parazita sa domaćih na divlje životinje i obrnuto. Takođe, rezistencija parazitskih nematoda na antihelmintike postaje sve značajniji fenomen u veterinarskoj medicini, ali nažalost malo podataka je dostupno o mogućnosti prenošenja rezistentnih sojeva parazitskih nematoda sa domaćih na divlje životinje. Zahvaljujući brojnim istraživanjima, danas dobro poznajemo nekoliko mehanizama pomoću kojih parazitske nematode postaju rezistentne na lekove i posedujemo efikasne procedure za neutralizaciju rezistencije. Za mogućnost prenošenja parazitskih nematoda dobar primer je *Haemonchus contortus*. To je parazitska nematoda koja ispoljava najintenzivniji stepen rezistencije na skoro sve poznate antihelmintike širom sveta. Infekcija sa *H. contortus* može da se prenosi između goveda, ovaca i jelena i obrnuto na goveda i ovce sa jelena. Aleli za rezistenciju na benzimidazol (BZ) identifikovani su u beta-tubulinu *H. contortus* srndaća. Ovi podaci sugerišu da srndać može biti rezervoar rezistentnih parazitskih nematoda koje ugrožavaju i domaće preživare. Za smanjenje inteziteta parazitskih infekcija u populacijama divljih životinja, koristi se niz antiparazitskih lekova. Daleko najčešće korišćeni lek je standardni veterinarski i humani antihelmintik ivermektin. Od otkrića ove supstance, 1973. godine, ivermektin se koristi za lečenje ljudi i domaćih životinja širom sveta, zbog toga što je relativno jeftin, efikasan protiv širokog spektra parazita i što je posebno važno, može se koristiti za uspešno lečenje pacijenta jednom oralnom ili lokalnom dozom. Ostali najčešći lekovi za dehelmintizaciju koji se primenjuju kod divljih životinja su levamizol, fenbendazol, albendazol i triklabendazol. Međutim, glavni problemi u dehelmintizaciji divljih životinja su pravilan izbor antihelmintika i adekvatan način primene leka. Problem vezan za specifične metode administracije antiparazitika kod divljih životinja kao takav uglavnom ne postoji u farmakoterapiji domaćih životinja i može biti jedan od najvažnijih uzroka razvoja rezistencije parazita kod divljih životinja.

Ključne reči: antihelmintici, divlje životinje, parazitske nematode, rezistencija

INTRODUCTION

In the Balkans frequently hunted large species include Deer (Red, Roe & Fallow), Chamois, Mouflon (wild sheep) and Wild Boar along with numerous bird species (including quail, pheasant, dove, ducks and geese). Meanwhile there are significant domestic herds of cattle (beef & dairy), pigs and sheep (Aleksić et al. 2009). Nematode parasites are significant pathogens of both wild and domestic animals with parasitic species often able to infect both domestic and wild hosts. Nematode infestations have well documented adverse effects on the agricultural industry: europe wide the cost of nematode infections to agricultural production is estimated at over 1 billion euro with 81% of that figure attributed to lost production and 19% to treatment costs (Charlier et al. 2020). While in wildlife species there is a significant reduction in the numbers and quality of prize and trop-

hy species: a concern to local hunters and a potential financial loss to the growing hunting tourism industry. Individual parasite species can infect both wild and domestic animals (e.g. *Haemonchus contortus* affects both deer and sheep). Since parasitic nematodes have complex life cycles with free living stages it is not even necessary for the wild and domestic hosts to come in to close contact for these parasites to spread in both populations; shared grazing or water sources is sufficient. Clearly optimal control of nematode infestations in wildlife would benefit both the agricultural and hunting tourism industries.

Treatment of Livestock

There are numerous drug classes available for the treatment of parasitic infestations in animals. These include the older groups avermectins (e.g. ivermectin), benzimidazoles (albendazole, febendazole etc.), cholinomimetics (e.g. pyrantel) and newer compounds introduced to combat the emergence of drug resistance e.g. monepantel and emodepside (for review see Abongwa et al. 2017). Due to numerous factors (drug resistance, wildlife hosts, herd movement etc.) eradication of nematode parasites has rarely been possible. The majority of current approaches focus on control to minimize production loss (both morbidity and mortality). As agriculture has intensified so has the problem of nematode infections- more hosts means potentially more worms and therefore more infective eggs/larvae in the environment. The ongoing development and spread of anthelmintic resistance has also exacerbated the problem. Current strategies include cycling the use of anthelmintic drug classes, use of combination therapies, treatment of only heavy infections and the deliberate maintenance of a refugia of untreated parasites. All these approaches have been successful in reducing loss due to parasite infestation and have slowed the development of drug resistance but none have actually prevented it from occurring.

Treatment of Wildlife populations

Nematode control in wildlife populations is more problematic than with domestic herds. Dosing by injection or drench is much more difficult (when possible) in wildlife when compared to domestic herds. Oral dosing (often via feed) is less problematic, however, if via feed then the actual dose received by each individual is difficult to control. There is little to no control of host movements therefore reducing the possibility of some non-drug interventions. For an overview of the effectiveness of antiparasitic treatment experiments in wildlife see Pederson & Fenton (2015).

Interface between wild & domestic hosts.

Less than half of the nematode parasites identified have a single ungulate host species. It has been estimated that there is overlap in 412 nematode species

between 76 different wild and eight different ungulate species. As with treatment the effect on individual and population health of nematode infections is harder to quantify in wild species compared with domestic animals (for many of the same reasons). However, it is unquestionable that wildlife are a significant potential source of infection in domestic animals. Goats, sheep, donkeys, and camelids are the most liable of domestic animals to nematodes carried by wildlife while horses are the least so, in terms of the wildlife-associated parasites (Wilson & Morgan 2014). For wildlife species ibex and mouflon are some of the most susceptible species to infestation from domestic animals while wild boar and sika deer are some of the least susceptible. Overall, the number of nematode species shared between wild and domestic species is high: 18–76% of parasitic nematodes found in wild hosts are also found to infect domestic hosts, and 42–77% of nematode species found in domestic hosts were also found to infect wild hosts (Wilson & Morgan 2014). However, on closer analysis it was found that overall transmission of nematode parasites between domestic and wild populations (and vice versa) was limited (Wilson & Morgan). The potential for transmission of parasites from wildlife to domestic animals does however remain a realistic threat. The ability for deer (fallow red, and roe) to carry and spread anthelmintic-resistant nematodes was tested experimentally (Chintoan-Uta et al., 2014). Anthelmintic-resistant *Haemonchus contortus* were found in free-living, untreated roe deer and successfully experimentally transmitted to sheep and cattle, indicating that deer could play a role in the spread of anthelmintic resistance (Chintoan-Uta et al., 2014). Another study in the Italian Alps found that parasite strains of *H. contortus* were well mixed between domestic and wild hosts, suggesting that regular transmission between species occurs (Cerutti et al., 2010).

CONCLUSIONS

A reduction in nematode infestations in wild animal populations is desirable: increasing the quality of animals to be hunted while also potentially decreasing infection frequency/intensity in domestic animal herds. However, treatment strategies used in livestock are not easily applied to wild animals and care must also be taken to avoid the potential for the development of anthelmintic resistance in these populations that could then spread to the domestic herd.

BIBLIOGRAPHY

1. Abongwa M., Martin R.J., Robertson A.P. 2017. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta Veterinaria (Belgrade)*. 67 (2):137-152. 2. Aleksić S., Pantelić V., Radović Č. 2009, Livestock production – present situation and future development directions in republic of Serbia. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 25: 267-276. 3. Cerutti M.C., Citterio C.V., Bazzocchi C., Epis S., D'Amelio S., Ferrari N. et al., 2010, Genetic variability of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) in alpine ruminant host species. *Journal of Helminthology*, 84: 276–83. 4. Charlier J. et al. 2020. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the

ruminant livestock industry in Europe. *Preventative Veterinary Medicine*. 182: 105103 **5**. Chintoan-Uta C., Morgan E.R., Skuce P.J., Coles G.C., 2014. Wild deer as potential vectors of anthelmintic-resistant abomasal nematodes between cattle and sheep farms. *Proceedings of the Royal Society. B*. 281: 20132985. **6**. Penderson A.B., Fenton A. 2015. The role of antiparasite treatment experiments in assessing the impact of parasites on wildlife. *Trends in Parasitology*. 31, 200-11. **7**. Walker J.G., Morgan E.R. 2014. Generalists at the interface: Nematode transmission between wild and domestic ungulates. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3: 242–50

TEMATSKO ZASEDANJE V
PLENARY SESSION V

MODIFIKOVANE STRATEGIJE ISHRANE ŽIVOTINJA
U PROMOCIJI KONCEPTA ZELENA AGENDA
MODIFIED ANIMAL NUTRITION STRATEGIES IN
PROMOTING THE GREEN AGENDA CONCEPT

UPOTREBA NUTRITIVNOG DODATKA „EUBIOTIK“ U KONTROLI EMISIJE AMONIJAKA I UGLJEN DIOKSIDA NA KOMERCIJALNIM ŽIVINARSKIM FARMAMA ZA TOV BROJLERA

Dragan Šefer¹, Radmila Marković¹, Svetlana Grdović¹, Stamen Radulović¹, Dragoljub Jovanović¹, Lazar Makivić², Dejan Perić¹

Kratka sadržaj

Živinarska proizvodnja je primer masovne stočarske proizvodnje, tako da intenzivna proizvodnja tovnih brojlera podrazumeva uzgajanje brojlera na farmama kapaciteta od 5 000 pa do 50 000 jedinki ili više, pri gustini od 0,06 m² po ptici. Moderne živinarske farme konstruisane su sa zadatkom smanjenja gubitka toplote, odnosno poboljšanja energetske efikasnosti, što vrlo često, u kombinaciji sa smanjenim nivoom ventilacije može dovesti do povišenog nivoa amonijaka (NH₃), ugljen dioksida (CO₂), ali i drugih zagađivača vazduha i na taj način negativno uticati na zdravlje i produktivnost životinja. Na brzinu emisije gasova utiču mnogi faktori, kao što su: sastav hrane i efikasnost korišćenja hrane (konverzija), kvalitet prostirke i mikroklimatski uslovi na farmi. Prostirka na intenzivnim živinarskim farmama obično sadrži 4 do 6 procenata azota, od čega je veći deo u NH₃ ili NH₄⁺ obliku. Mešavina prostirke i stajnjaka predstavlja skladište azota koji se pod odgovarajućim uslovima oslobađa u vidu amonijaka. Sa druge strane, glavni izvor ugljen-dioksida u stočarstvu je disanje životinja tako da postoji povezanost između nivoa metabolizma životinja i proizvodnje CO₂ na farmama. Proizvodnja ugljen-dioksida kod ptica je proporcionalna njihovoj metaboličkoj proizvodnji toplote, a time i metaboličkoj telesnoj masi ptice, na koju utiču temperatura i aktivnost. Cilj istraživanja sprovedenog na 17 000 brojlera u tovu je bio da se ispita uticaj nutritivnog dodatka Eubiotika dodatog u hranu za brojlere na emisiju NH₃ i CO₂. Vrednosti emisije NH₃ i CO₂ u objektu za uzgoj tovnih brojlera koji su u hrani dobijali Eubiotik su numerički manje, što se može objasniti boljom svarljivošću osnovnih hranljivih materija, pre svega proteina prisutnih u hrani.

Ključne reči: amonijak, brojleri, hrana za životinje, ugljen-dioksid

¹Dr sci. vet. med. Dragan Šefer, redovni profesor; dr sci. vet. med. Radmila Marković, redovni profesor; dr Svetlana Grdović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Stamen Radulović, docent; dr sci. vet. med. Dragoljub Jovanović, naučni saradnik; dr vet. Dejan Perić, asistent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr Lazar Makivić, nutricionista, Fabrika stočne hrane Rapić, Gradiška, Bosna i Hercegovina

*e-mail adresa autora za korespondenciju: dsefer@vet.bg.ac.rs

UVOD

Živinarska proizvodnja je primer masovne stočarske proizvodnje, tako da intenzivna proizvodnja tovnih brojlera podrazumeva uzgajanje brojlera na farmama kapaciteta od 5 000 pa do 50 000 jedinki ili više pri gustini od 0,06 m² po ptici. Način uzgoja brojlera direktno utiče na zagađenje štetnim jedinjenjima, emisiju prašine i mikrobiološko zagađenje na farmama, a među njima, hemijski zagađivači predstavljaju faktore rizika koji su podjednako opasni za zdravlje ljudi i životinja. Moderne živinarske farme konstruisane su sa zadatkom smanjenja gubitka toplote, odnosno poboljšanja energetske efikasnosti, što vrlo često u kombinaciji sa smanjenim nivoom ventilacije može dovesti do povišenog nivoa amonijaka (NH₃), ugljen dioksida (CO₂) ali i drugih zagađivača vazduha i na taj način negativno uticati na zdravlje i produktivnost životinja (Brouček i Čermák, 2015). Proizvodnja i emisija gasova u živinarstvu, ili bilo kom objektu za držanje životinja, uključuje složene biološke, fizičke i hemijske procese. Na brzinu emisije gasova utiču mnogi faktori, kao što su: sastav hrane i efikasnost korišćenja hrane (konverzija), kvalitet prostirke i mikroklimatski uslovi na farmi.

PRODUKCIJA AMONIJAKA NA FARMAMA BROJLERA

Na živinarskim farmama za intenzivan uzgoj, prostirka obično sadrži 4 do 6 procenata azota, od čega je veći deo u NH₃ ili NH₄⁺ obliku. Mešavina prostirke i stajnjaka predstavlja skladište azota koji se pod odgovarajućim uslovima oslobađa u vidu amonijaka. Mnogi faktori kao što su godišnje doba, temperatura u objektu, relativna vlažnost vazduha i zdravstveno stanje brojlera, mogu uticati na nivo oslobađanja amonijaka na farmama za uzgoj brojlera. Amonijak se formira razgradnjom azotnih otpadnih proizvoda u đubrivu (nesvareni proteini iz hrane i mokraćna kiselina) a pod dejstvom egzogenih enzima proizvedenih od strane mikroorganizama. Faktori koji ispoljavaju direktnu kontrolu nad ovim procesima su pH vrednost stajnjaka, temperatura i vlaga objekta, a oni su opet pod jakim uticajem starosti jata, odnosno starosti ptica (Knížatová i sar., 2010b). Dokazano je da stopa emisije amonijaka raste sa starošću jata, od skoro nulte vrednosti na početku turnusa, do maksimuma vrednosti na njegovom kraju. Zabeležena je niža koncentracija amonijaka i veća stopa ventilacije tokom toplih letnjih meseci, dok je koncentracija amonijaka bila veća tokom hladnog vremena kada su niske stope ventilacije obezbeđivale manje svežeg vazduha za razblaživanje amonijaka (Gates i sar., 2005). Povišene koncentracije amonijaka na farmama za uzgoj tovnih brojlera, pored negativnog uticaja na mirise u objektu, smanjuju unos hrane i usporavaju brzinu rasta životinja, deluju negativno na respiratorni trakt povećavajući osetljivost na Newcastle virus ali i *Mycoplasma gallisepticum*, kao i na incidencu pojave vazdušnog sakulitisa i keratokonjunktivitisa (Liu i sar., 2009). Glavni izvor amonijaka je urin životinja, dok 70 procenata azotnih materija u izmetu potiče iz urina, a 30 procenata iz fekalija.

PRODUKCIJA UGLJEN-DIOKSIDA NA FARMAMA BROJLERA

Ugljen dioksid (CO_2) je jedan od glavnih proizvoda sagorevanja fosilnih goriva i daje veliki doprinos stvaranju efekta staklene bašte zbog čega je doveden u direktnu vezu sa klimatskim promenama. Glavni izvor ugljen-dioksida u stočarstvu je disanje životinja tako da postoji povezanost između nivoa metabolizma životinja i proizvodnje CO_2 na farmama. Proizvodnja ugljen-dioksida kod ptica je proporcionalna njihovoj metaboličkoj proizvodnji toplote, a time i metaboličkoj telesnoj masi ptice, na koju utiču temperatura i aktivnost (Knížatová i sar., 2010a). Na farmama sa neadekvatnom ventilacijom, kiseonik postaje ograničavajući faktor za zdravstveno stanje, proizvodne rezultate i dobrobit brojlera. Sa druge strane, poznato je da zoohigijenski uslovi uključujući faktore, kao što su nivoi CO_2 i kiseonika, utiču na pojavu ascitesa kod brojlera. Zanimljivo je da brojna istraživanja nisu dokazala razliku u emisiji CO_2 u odnosu na starost životinja, odnosno period tova.

CILJ ISPITIVANJA

Cilj sprovedenog istraživanja je bio da se ispita uticaj nutritivnog dodatka Eubiotika dodatog u hranu za brojlere na emisiju NH_3 (amonijaka) i CO_2 (ugljen-dioksida) u objektu za uzgoj tovnih brojlera. Eubiotik je nutritivni dodatak koji održava optimalnu intestinalnu mikrobnu ravnotežu (eubioza) u digestivnom traktu nepreživara. Jedinstvenom kombinacijom protektirane benzoeve kiseline, živih mikroorganizama (*B. Licheniformis*) i aktivnih principa zeolita (molekulska sito) omogućava se održavanje eubiotičkih odnosa (ravnoteža u mikropopulaciji digestivnog trakta) čime se povećava efikasnost varenja i resorpcija hranljivih materija, kao i otpornost prema poremećajima izazvanim enteropatogenim bakterijama. Navedeni dodatak omogućava stimulaciju rasta nepreživara korišćenjem njihovih prirodnih fizioloških potencijala i mogućnosti bez potencijalnih štetnih efekata po zdravlje ljudi i životinja (rezistentni sojevi enterobakterija, unakrsna rezistencija, rezidue u namirnicama animalnog porekla, genotoksično dejstvo itd). Eubiotik stabilizuje crevnu mikrobiotu, smanjujući broj patogenih, a potpomažući broj korisnih vrsta bakterija, pozitivno deluje na intestinalnu mukozu i stimuliše lokalni imunski sistem u crevima, smanjuje nivo toksina u digestivnom traktu, poboljšava dnevni prirast i smanjuje konverziju hrane, redukuje pojavu dijareje, smanjuje mortalitet, ne apsorbuje nutritivne materije prisutne u hrani i ne utiče na tehnološke i nutritivne karakteristike tretirane hrane.

MATERIJAL I METODE

Eksperiment je izveden na farmi za uzgoj tovnih brojlera u Žablju, u dva objekta kapaciteta po 8 500 brojlera, površine 530 m². Korišćeni su brojleri Cobb 500 provenijencije koji su hranjeni potpunim smešama standardnog sirovinskog i hemijskog sastava koje su u potpunosti odgovarale nutritivnim potrebama u zavisnosti od starosti životinja. Ogledna grupa u turnusu, za razliku od kontrolne

grupe, u hrani je tokom celog perioda tova dobijala dodatak Eubiotik u količini od 1 kg/toni hrane. Merenja emisije gasova (amonijak i ugljen dioksid) u objektima vršena su 28. i 35. dana u tova u prepodnevnim časovima multigas detektorom proizvođača Dräger - Germany.

REZULTATI

Utvrđene vrednosti emisije NH₃ (amonijaka) i CO₂ (ugljen-dioksida) u objektu za uzgoj tovnih brojlera 28 dana tova prikazane su u tabelama 1-6.

Tabela 1. Emisija NH₃ na ulazu u objekat 28. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	5,36	0,086	0,035	5,25	5,45	1,61%
Ogledna	5,07	0,211	0,086	4,87	5,31	4,17%

Tabela 2. Emisija NH₃ na središnjem delu objekta 28. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	10,74	0,250	0,102	10,25	10,98	2,33%
Ogledna	10,12	0,203	0,083	9,88	10,42	2,01%

Tabela 3. Emisija NH₃ na krajnjem delu objekta 28. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	5,38	0,110	0,045	5,19	5,49	2,04%
Ogledna	5,09	0,166	0,068	4,88	5,31	3,27%

Tabela 4. Emisija CO₂ na ulazu u objekat 28. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	1371,00	74,080	30,240	1240,00	1448,00	5,40%
Ogledna	1334,00	36,660	14,970	1293,00	1382,00	2,75%

Tabela 5. Emisija CO₂ na središnjem delu objekta 28. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	1890,00	51,500	21,030	1828,00	1984,00	2,72%
Ogledna	1834,00	132,900	54,240	1655,00	1952,00	7,24%

Tabela 6. Emisija CO₂ na krajnjem delu objekta 28. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	1546,00	20,750	8,470	1519,00	1574,00	1,34%
Ogledna	1502,00	53,830	21,980	1441,00	1602,00	3,58%

Utvrđene vrednosti emisije NH₃ (amonijaka) i CO₂ (ugljen-dioksida) u objektu za uzgoj tovnih brojlera 35 dana tova su prikazane u tabelama 7 – 12.

Tabela 7. Emisija NH₃ na ulazu u objekat 35. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	12,36	0,836	0,341	11,36	13,50	6,76%
Ogledna	11,67	1,199	0,490	10,52	13,29	10,28%

Tabela 8. Emisija NH₃ na središnjem delu objekta 35. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	17,72	2,283	0,932	14,63	20,26	12,89%
Ogledna	16,67	1,543	0,630	14,99	18,75	9,26%

Tabela 9. Emisija NH₃ na krajnjem delu objekta 35. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	15,53	0,978	0,399	14,63	17,22	6,29%
Ogledna	14,68	0,651	0,266	14,01	15,80	4,43%

Tabela 10. Emisija CO₂ na ulazu u objekat 35. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	1343,00	43,590	17,800	1281,00	1384,00	3,25%
Ogledna	1305,00	42,770	17,460	1245,00	1361,00	3,28%

Tabela 11. Emisija CO₂ na središnjem delu objekta 35. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	1790,00	56,790	23,180	1737,00	1883,00	3,17%
Ogledna	1734,00	135,500	55,330	1502,00	1892,00	7,82%

Tabela 12. Emisija CO₂ na krajnjem delu objekta 35. dana (ppm)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
Kontrolna	1511,00	84,440	34,470	1400,00	1622,00	5,59%
Ogledna	1467,00	76,960	31,420	1390,00	1585,00	5,25%

ZAKLJUČAK

Iz prikazanih rezultata se može zaključiti da su vrednosti emisije NH₃ (amonijska) i CO₂ (ugljen dioksida) u objektu za uzgoj tovnih brojlera koji su u hrani dobijali Eubiotik numerički manje, što se može objasniti boljom svarljivošću osnovnih hranljivih materija, pre svega proteina prisutnih u hrani. Navedeni rezultati ukazuju da upotreba Eubiotika pozitivno utiče na zoohigijenske uslove ambijenta i na taj način posledično dovodi do povećane otpornosti brojlera na bolesti uzrokovane emisijom štetnih gasova.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Brouček J., Čermák B. 2015. Emission of harmful gases from poultry farms and possibilities of their reduction. *Ekológia (Bratislava)*, 34, 1, 89–100. 2. Gates R.S., Xin H., Casey K.D., Liang Y. Wheeler E.F. 2005. Method for Measuring Ammonia Emissions from Poultry Houses. *J. Appl. Poult. Res.* 14:622–34. 3. Knížatová M., Mihina Š., Brouček J., Ka-

randušovská I., Sauter G.J. Mačuhová J. 2010a. Effect of the age and season of fattening period on carbon dioxide emissions from broiler housing. Czech J. Anim. Sci., 55, (10): 436–44. 4. Knížatová M., Mihina Š., Brouček J., Karandušovská I. Mačuhová J. 2010b. The influence of litter age, litter temperature and ventilation rate on ammonia emissions from a broiler rearing facility. Czech J. Anim. Sci., 55, 2010 (8): 337–45. 5. Liu Z., Wang L., Beasley D.B., Shah S.B. 2009. Modeling ammonia emissions from broiler litter at laboratory scale. American Society of Agricultural and Biological Engineers. ISSN 0001-2351, 52(5): 1683-94.

USE OF EUBIOTIC IN CONTROL OF AMMONIA AND CARBON DIOXIDE EMISSIONS ON COMMERCIAL POULTRY FARMS

Dragan Šefer, Radmila Marković, Svetlana Grdović, Stamen Radulović, Dragoljub Jovanović, Lazar Makivić, Dejan Perić

Summary

Poultry production is an example of mass livestock production, so intensive production of fattening broilers involves raising broilers on farms with a capacity of 5,000 to 50,000 units or more at a density of 0.06 m² per bird. Modern poultry farms are constructed with the task of reducing heat loss, ie improving energy efficiency, which very often in combination with reduced ventilation can lead to increased levels of ammonia (NH₃), carbon dioxide (CO₂) and other air pollutants, and thus adversely affect animal health and productivity. The speed of gas emissions is influenced by many factors, such as the composition of feed and the efficiency of feed use (conversion), the quality of the litter and the microclimatic conditions on the farm. The litter on intensive poultry farms usually contains 4 to 6% of nitrogen, most of which is in NH₃ or NH₄⁺ form. The mixture of litter and manure is a storage of nitrogen which is released in the form of ammonia under appropriate conditions. On the other hand, the main source of carbon dioxide in livestock is the product of animal respiration, so there is a connection between the levels of animal metabolism and CO₂ production on farms. The production of carbon dioxide in birds is proportional to their metabolic heat production, and thus to the metabolic body mass of the bird, which is affected by temperature and activity. The aim of the study was to examine the effect of nutritional supplement Eubiotic added to broiler feed on NH₃ and CO₂ emissions in a broiler farm. The aim of the study, conducted on 17,000 broilers in fattening, was to examine the effect of the nutritional supplement Eubiotik added to broiler feed on NH₃ and CO₂ emissions. The values of NH₃ and CO₂ emissions in the facility for breeding fattening broilers that received Eubiotik in feed are numerically lower, which can be explained by better digestibility of basic nutrients, primarily proteins present in feed.

Key words: ammonia, broilers, carbon dioxide, feed

HELATNE FORME MIKROLEMENATA KAO DODATAK HRANI ZA NEPREŽIVARE

*Radmila Marković¹, Dejan Perić¹, Stamen Radulović¹,
Svetlana Grdović¹, Dragoljub Jovanović¹, Adriana Radosavac²,
Dragan Šefer¹*

Kratak sadržaj

Životinjama su mikroelementi potrebni u malim količinama i učestvuju u skoro svim fiziološkim i biohemijskim procesima. Resorpcija mikroelemenata ne zavisi samo od sadržaja u hrani, nego i od starosti životinje, elektrohemijske reakcije u crevima i oblika u kome se mikroelement nalazi. Izbor izvora mikroelementa se zasniva na njihovom sadržaju u čistom stanju, rastvorljivosti u organizmu, dostupnosti i iskoristivosti. Oksidi, hloridi i karbonati su slabo rastvorljivi, a pored toga, hloridi su higroskopni, a karbonati brzo oksidišu. Sulfati su postojane soli, lake za prečišćavanje, a sulfatni jon se lako izlučuje iz organizma. Pored neorganskih formi mineralnih materija, danas se sve više koriste, takozvani "helatni" oblici, odnosno organski vezani mikroelementi. Minerali vezani sa amino-kiselinama ili peptidima su bolje zaštićeni za vreme pasaže kroz želudac, a resorpcija helatne forme bakra je znatno veća od resorpcije iz sulfata. Resorpcija organski vezanih mikroelemenata se ne odvija konvencionalno (nosač/dufuzija), pa direktna homeostatska kontrola na nivou enterocita ne postoji, a retencija i biološki poluživot helatnog oblika su veći kod anorganske forme.

Korišćenjem smeša za brojere sa organski vezanim mikroelementima, postižu se značajno veći dnevni prirasti (za 12,78 procenata) pri boljoj konzumaciji (za 5,81 procenata) i uz bolju konverziju hrane za 16,7 procenata.

Dodavanje organskih oblika cinka, bakra, mangana i gvožđa u hranu za svinje utiče na bolju svarljivost i retenciju ovih mikroelemenata, ali i smanjuje fekalno izlučivanje ovih mikrominerala i P u poređenju sa hranom za svinje koja sadrži neorganske forme minerala. Uključivanje ovih organskih mikroelemenata u ishranu sa visokim sadržajem fitata može biti korisnije nego u ishrani sa malo fitata.

Ključne reči: helatne forme, ishrana nepreživara, mikroelementi,

¹Dr sci. vet. med. Radmila Marković, redovni profesor; dr vet. Dejan Perić, asistent; dr sci. vet. med. Stamen Radulović, docent; dr Svetlana Grdović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Dragoljub Jovanović, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Dragan Šefer, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr Adriana Radosavac, vanredni profesor, Fakultet za primenjenu ekonomiju, finansije i menadžment, Beograd, R. Srbija

*e-mail sdresa autora za korespondenciju: radmilam@vet.bg.ac.rs

UVOD

Ekonomična proizvodnja u intenzivnom stočarstvu se bazira na optimalnoj ishrani koja treba u potpunosti da odgovara vrsti i kategoriji životinja i omogućava ispoljavanje genetskog potencijala životinja. Korišćenjem određenih biotehnoloških rešenja, značajno može da se unapredi proizvodnja u intenzivnom uzgoju, pre svega u onim slučajevima u kojima su sirovine za optimalno formulisanje obroka limitirajuće, a iskoristivost hranljivih materija mala. U poslednje vreme je, uključivanje helatnih oblika mikroelemenata u hranu za životinje sa ciljem da se reše određeni problemi u ishrani, oblast koja privlači sve veću pažnju nutricionista.

Mikroelementi su potrebni životinjama u malim količinama i učestvuju u skoro svim fiziološkim i biohemijskim procesima. Od čvrstine kostiju do održavanja strukture proteina i lipida, mikroelementi imaju važnu ulogu (Šefer i Sinovec, 2008). Mikroelementi se obezbeđuju životinjama hranivima, posebnim dodavanjem (preko predmeša) ili kroz vodu. U intenzivnoj proizvodnji, dodavanje je obavezno, zbog toga što samo tako mikroelementi mogu da se obezbede u dovoljnim količinama za optimalno zdravstveno stanje i proizvodne rezultate. Bioiskoristivost je termin koji opisuje odnos između svarljivosti, resorpcije i metabolisanja nekog hranljivog sastojka normalnim biohemijskim i fiziološkim putevima, a mnogo jednostavnije i preciznije, kao deo koji može da se iskoristi (Šefer i sar., 2004). Ona predstavlja količinu unetog elementa koja može da se resorbuje u crevima i da bude dostupna organizmu za metabolizam ili deponovanje. Bez obzira na rezultate hemijske analize hrane, koji ukazuju da je određeni mikroelement prisutan u dovoljnoj količini, često se javljaju supklinički ili klinički znaci nedostatka, zbog toga što iskoristivost mikroelementa varira ili se on nalazi u neiskoristivoj formi (Lyons, 1994). Ovo može biti posledica prisustva interferirajućih materija (fitinska kiselina i oksalna kiselina), interakcije sa drugim hranljivim materijama u digestivnom traktu ili kompeticije sa drugim elementima vezano za mehanizme resorpcije. Resorpcija mikroelemenata ne zavisi samo od sadržaja u hrani, nego i od doba života, elektrohemijske reakcije u crevima i oblika u kome se nalazi mikroelement. Neorganske forme mineralnih materija se u znatnoj količini hidrolizuju u digestivnom traktu tokom varenja, što naročito potencira kisela sredina u želucu. Da bi se mineral resorbovao kroz sluzokožu crevnog zida on prethodno mora da se veže za odgovarajući molekul organskog porekla (ligand). Kao rezultat međusobne kompeticije prisutnih hranljivih sastojaka za odgovarajuće ligande, kao i mnogobrojnih oksido-redukujućih procesa koji se odvijaju u lumenu digestivnog trakta, resorpcija mineralnih materija je, po pravilu, često vrlo mala. Usled toga, nerastvorljivi oblici unetih mineralnih materija se izlučuju fecesom. Do skoro, u praksi su se najčešće upotrebljavale neorganske soli mineralnih materija i to oksidi, karbonati, hloridi i sulfati. Izbor izvora se zasniva na sadržaju mikroelemenata u čistom stanju, rastvorljivosti u organizmu, dostupnosti i iskoristivosti. Potrebno je da se naglasi da su oksidi, hloridi i karbonati slabo rastvorljivi, a pored toga hloridi su higroskopni dok karbonati brzo oksidi-

šu. Sulfati su postojane soli, lake za prečišćavanje, a sulfatni jon se lako izlučuje iz organizma. Pored neorganskih oblika mineralnih materija, danas se sve više koriste takozvani „helatni” oblici, odnosno organski vezani mikroelementi (Šefer, Sinovec, 2008).

ORGANSKI VEZANI MIKROELEMENTI

Termin „kompleks” označava jedinjenje koje nastaje kada metalni jon reaguje sa ligandom. Ligand je molekul ili jon koji sadrži atom sa slobodnim parom elektrona. Bilo koja od prirodnih amino-kiselina može da formira stabilan petočlani prsten sa metalnim jonom. Kada se formira kompleks koji poseduje jedan ili više heterocikličnih prstenova, on se naziva „helat”. Komercijalni mineralni dodaci su proteinati, a biopleksi su smeše amino-kiselina i peptida. Minerali vezani za amino kiselinu ili peptid su bolje zaštićeni za vreme pasaže kroz želudac do mesta resorpcije nego neorganske soli (Šefer i Sinovec, 2008). Mineralne materije vezane za amino-kiseline praktično su bez električnog naboja, tako da ne reaguju na promene pH tokom pasaže kroz digestivni trakt. Elektroneutralnost helata je njihova veoma važna osobina, naročito za resorpciju, imajući u vidu negativno naelektrisanje intestinalne sluznice. Pozitivno naelektrisani kompleksi se jednostavno zalepe za površinu sluznice umesto da prodru kroz nju. Nasuprot tome, negativno naelektrisani kompleksi se odbiju od površine crevne sluznice s obzirom na istovetan električni naboj. Takođe se smatra se da amino-kiseline ili dipeptidi mogu da posluže kao nosač minerala kroz zid digestivnog trakta povećavajući resorpciju. Na taj način se, mineralne materije umesto da postanu nerastvorljive, unose u formi fizološki prihvatljivoj za resorpciju i rešavaju postojeći problem mineralne deficijencije. S obzirom da se resorpcija organski vezanih mikroelemenata ne odvija konvencionalno (nosač/dufuzija), direktna homeostatska kontrola na nivou enterocita ne postoji, a pored toga retencija i biološki poluživot helatnog oblika su veći nego kod anorganske forme. Helatni oblici mikroelemenata imaju poseban značaj u stanjima kada organizam ima povećane potrebe u mikroelementima. U svim stanjima akutnog imunskog odgovora, koncentracija mikroelemenata (Zn, Fe i Mn) u krvnoj plazmi naglo pada usled redistribucije u efektorske ćelije imunskog sistema (makrofagi, leukociti). Za razliku od neorganskih soli, koje samo prolazno povećavaju koncentraciju unetih mikroelemenata, helatni oblici znatno duže održavaju visoku koncentraciju minerala u krvi. Sa druge strane, oštećena tkiva imaju različite potrebe, kako za mineralne materije, tako i za amino-kiseline kojima su helirani minerali. Na taj način je moguće da se utiče na resorpciju određenog minerala izborom adekvatnog helatnog molekula. Time se ujedno i objašnjava veća efikasnost helatnih formi mikroelemenata koje u sebi sadrže širi spektar aminokiselina ili peptida.

Gvožđe ima ključnu ulogu u mnogim biohemijskim reakcijama i ono se slabo resorbuje i to naročito slabo iz hrane biljnog porekla. Sadržaj i iskoristivost gvožđa varira u zavisnosti od izvora i oblika neorganske forme i kreće se između 10 i 80 procenata (Šefer i Sinovec, 2008; Muhammad i Mahpara 2018). Povećanjem

sadržaja gvožđa u hrani ne postižu se očekivani efekti, zbog toga što je njegova resorpcija pod homeostatskom kontrolom. Status gvožđa u organizmu ima presudan značaj za količinu resorbovanog gvožđa. Istraživanja izvedena poslednjih godina ukazuju da dodavanje gvožđa u organskim formama u hranu pozitivno deluje na proizvodne rezultate životinja. Dodavanje organske forme gvožđa u hranu, 7 dana pre prašenja i tokom 26-dnevnog laktacionog perioda ima pozitivan efekat na potrošnju hrane kod krmača, kao i na masu odbijene prasadi (Šefer i sar., 2004). Ovo se objašnjava činjenicom da na ovaj način više gvožđa prođe kroz placentu, ugradivši se u fetus koji sada ima veću koncentraciju hemoglobina u krvi i snažniji imunski profil posle rođenja. Snažniji imunski odgovor i povećana vitalnost svakako rezultiraju vitalnijom prasadi. Utvrđeno je da helatne forme gvožđa pozitivno deluju i na reproduktivne rezultate krmača, putem uteroferina (proteina uterusa zavisnog od gvožđa) koji se luči u ranom graviditetu i povećava procenat embrionalnog preživljavanja.

Bakar je sastavni deo velikog broja enzima i samim tim je uključen u mnogobrojne oksido-redukujuće reakcije u organizmu. Do sada se bakar u hranu dodavao uglavnom u obliku neorganskih soli radi kompenzacije male količine bakra u grubim i zrnastim hranivima. Helatna forma bakra može da proдре u ćeliju samo putem aktivnog transporta. Usled toga, manja količina bakra ulazi u ćeliju pa ne može da ispolji toksične efekte, ali istovremeno zadovoljava potrebe ćelije u bakru. Generalno, resorpcija helatne forme bakra je znatno veća od resorpcije iz sulfata (Šefer i Sinovec, 2008; Muhammad i Mahpara 2018). Pored toga, organski vezan bakar ne interferira sa cinkom, ali ni sa bakar - sulfatom, što ukazuje na različite puteve resorpcije organski i neorganski vezanog bakra. Iskoristivost bakra je najmanja iz bakar sulfata, zatim iz bakra vezanog sa lizinom, a najveća iz helatne forme bakra, iz čega proizilazi da se organske forme resorbuju drugim putevima i mehanizmima nego neorganske (Hemken i sar., 1996). Bakar poseduje sposobnost dvojakog transporta kroz intestinalnu sluzokožu i to u vidu anorganske forme, kao i u vidu intaktnih kompleksa. Dokazana je višestruko veća i brža resorpcija helatnih formi bakra u odnosu na neorganske izvore u ogleđima na različitim vrstama životinja (Muhammad i Mahpara, 2018).

Mangan je uključen kao aktivator u pojedine enzimske sisteme (hidrolaze, kinaze, dekarboksilaze i transferaze), a takođe je i sastavni deo mnogobrojnih metaloenzima. Nedostatak mangana je čest kod svinja, živine i preživara, kao i kod ljudi kod kojih je često udružen sa nedostatkom vitamina K. Mangan aktivno učestvuje u metabolizmu proteina, masti i ugljenih hidrata. Neophodan je i za normalan razvoj koštanog sistema i vezivnog tkiva. Nedostatak mangana se prvenstveno dovodi u vezu sa poremećajima reproduktivnog sistema. Oksidi i sulfati su dva najčešća neorganska oblika u kojima se mangan dodaje u hranu za životinje. Iako je iskoristivost sulfatne forme znatno veća u odnosu na ostale neorganske oblike (oksidi 60-80 procenata, dioksidi i karbonati svega 30-40 procenata) poznato je da sulfatna forma povećava kiselost u digestivnom traktu, što limitira njenu upotrebu (McDowell, 1992). Utvrđeno je da je iskoristivost mangana u životinjskom organizmu najveća kada se mangan dodaje u helatnoj formi

(Šefer, Sinovec, 2008). Dodavanje mangana vezanog za proteine znatno povećava njegovu koncentraciju u krvi u odnosu na neorganske oblike (Muhammad i Mahpara 2018), što se pozitivno odražava na proizvodne rezultate prasadi koja su dobijala mangan u helatnoj formi (Gerbert i Wenk, 1994), u odnosu na prasid kod kojih je mangan obezbeđen putem neorganskih oblika (oksidi i sulfati). Posmatrajući ukupne proizvodne pokazatelje, utvrđeno je da je prasid koja je dobijala mangan u organskom obliku postigla bolje rezultate za 8 procenata u odnosu na prasid koja su dobijala mangan oksid, odnosno za 5 procenata u odnosu na korišćenje mangana sulfata.

Funkcije cinka su brojne: održavanje normalne funkcije epitela, reproduktivne funkcije, kao i pojačanje imunskog odgovora. Rezerve cinka u organizmu su vrlo male, a ni tako male količine ne mogu u potpunosti da se iskoriste. Promet cinka je veoma brz, tako da je neophodno njegovo konstantno unošenje hranom. Mnogobrojni eksperimenti, na različitim životinjskim vrstama, potvrđuju superiornost helatnih formi cinka u odnosu na neorganske soli. Kvalitet ljuske jaja je znatno bolji kada se u ishrani kokošaka nosilja cink u neorganskom obliku zameni helatnim oblikom. Helatni oblik cinka pozitivno deluje i na povećanje jajčane mase (generator profita u tržišnim uslovima) tako da se u ishrani kokoši nosilja preporučuje da se 40 procenata potreba u mikroelementima obavezno obezbedi u obliku proteinata ili helata. Slično bakru, iskoristivost cinka je vezana za metalotionein koji reguliše stepen resorpcije, ali služi i kao antioksidans za slobodne i hidroksilne radikale, pa se zbog toga ne preporučuje potpuna supstitucija neorganskog cinka helatnim oblikom (Šefer i Sinovec, 2008; Muhammad i Mahpara 2018).

Selen obavlja svoju biološku ulogu preko antioksidativnog enzima glutation peroksidaze (GSHPx). Pored nje, u odbrani ćelijskih membrana od peroksidativnih oštećenja učestvuju i katalaza, superoksid dismutaza i vitamin E (Marković, 2007). Vitamin E i selen zajednički preveniraju ćelijska i tkivna oštećenja koja nastaju kao rezultat oštećenja ćelijske membrane. Utvrđeno je da transport seleno kroz crevni zid značajno zavisi od raspoloživog oblika. Za razliku od organskih formi seleno, koje sve životinjske vrste lako resorbuju aktivnim transportom, neorganski oblici se resorbuju pasivno, tako da stepen resorpcije u velikoj meri zavisi od gradijenta koncentracije. Poslednja istraživanja o iskoritivosti organskih i neorganskih oblika seleno ukazuju da se organski oblici u vidu selenometionina znatno bolje resorbuju u odnosu na neorganske oblike. Pored navedenog, poseban problem predstavlja zagađivanje životne okoline pri korišćenju neorganskih soli seleno. Naime, usled male iskoritivosti seleno iz neorganskih soli (30-70 procenata) veliki deo se izlučuje fecesom sa posledičnim koncentrovanjem u stajskom đubrivu. Korišćenjem takvog đubriva, može da se poveća sadržaj seleno u površinskom sloju zemlje, a tako dobijeni usevi mogu da budu toksični za životinje. Zbog mogućih ekoloških problema, u svetu je otpočela supstitucija neorganskih izvora seleno organskim oblicima. U tom pravcu je najdalje otišao Japan uvodeći još 1998. godine zabranu korišćenja neorganskih soli seleno u ishrani životinja.

PRAKTIČNA PRIMENA HELATA

Primena helata u praksi proističe upravo iz problema koji se javljaju u ishrani životinja. Da bi se genetski potencijal maksimalno iskoristio, životinji mora da se stavi na raspolaganje potrebna količina neophodnih hranljivih materija, uključujući i mikroelemente. Korišćenjem organski vezanih mikroelemenata značajno može da se unapredi proizvodnja, pre svega, u onim slučajevima u kojima su sirovine za optimalno formulisanje obroka limitirajuće, a iskoristivost hranljivih materija mala i/ili je njihova svarljivost limitirana fiziološkim funkcijama. Efikasnost helata kao dodataka hrani je posebno značajna u ishrani krmača i odbijene prasadi. Ispitivanja efikasnosti helatnih oblika mikroelemenata na proizvodne rezultate krmača i prasadi izvedena su u proizvodnim uslovima. Prvi ogled izveden je na 136 suprasnih krmača podeljenih u dve grupe koje su tokom graviditeta hranjene smešama standardnog sirovinskog i hemijskog sastava (Pupavac i sar., 2000). Razlika između grupa je bila u korišćenim izvorima mikroelemenata. Smeše za kontrolnu grupu sadržale su mikroelemente u neorganskom obliku soli, dok je u smešama za oglednu grupu obavljena supstitucija 30 procenata soli helatnim izvorima mikroelemenata (Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Se). Korišćenjem smeša sa organski vezanim mikroelementima postignuti su bolji rezultati pri prašenju i to: veći broj živorođene prasadi za 5,82, manji broj mrtvorodene prasadi za 8,89 i manji broj avitalne prasadi za 6,74 procenata uz veću ukupnu masu legla na prašenju za 5,09 procenata. Pored toga, utvrđeno je da je koncentracija posmatranih mikroelemenata u krvnom serumu krmača hranjenih smešama u koje su dodati helati značajno viša. Drugi ogled je izveden na 27 odbijene prasadi podeljenih u tri grupe u trajanju od 19 dana (Pupavac i sar., 2001). Prasad kontrolne grupe je hranjena standardnom smešom za odbijenu prasad koja je sadržavala mikroelemente u neorganskom obliku soli. U smešama za ogledne grupe obavljena je supstitucija 30 procenata soli helatnim izvorima mikroelemenata (Fe, Zn, Cu, Mn), pri čemu su u prvoj grupi korišćeni mikroelementi sa metioninom kao ligandom, a u drugoj sa glicinom. U odnosu na kontrolnu grupu, prasad oglednih grupa je postigla viši dnevni prirast ($0,514 \pm 0,90$, $0,564 \pm 0,10$, $0,523 \pm 0,06$ kg) pri gotovo identičnoj konverziji hrane (2,05, 2,06, 2,07 kg). Koncentracija ispitivanih mikroelemenata (Fe, Zn, Cu, Mn) u krvnom serumu prasadi oglednih grupa bila je statistički značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na bolju iskoristivost organski vezanih mikroelemenata, posebno onih koji su vezani na metionin kao ligand.

U jednom eksperimentu na svinjama (Liu i sar., 2014) određivana je ukupna svarljivost (engl. *Apparent Total Tract Digestibility* - ATTD) i stopa retencije Zn, Cu, Mn i Fe kod 48 kastriranih svinja muškog pola, hranjenih sa dve vrste obroka odnosno obrokom na bazi kukuruza i obrokom na bazi kukuruza i soje. Razlikovale su se eksperimentalne grupe i u sadržaju neorganskog ili organskog izvora minerala Zn, Cu, Mn i Fe u hrani tokom 12 dana pri čemu su životinje bile smeštene u metaboličkim kavezima kako bi se uzimali uzorci fecesa i urina. Kao rezultat ovog istraživanja zaključeno je da organski oblici mikrominerala ($Zn(HMTBa)_2$,

Cu(HMTBa)₂, Mn(HMTBa)₂ i FeGli imaju bolju svarljivost i veću stopu retencije u poređenju sa Zn, Cu, Mn i Fe u obliku sulfatnih soli, kada se svinje hrane u periodu rasta. Ovo je posebno bilo izraženo kada su se ovi organski mikrominerali dodavali obroku na bazi kukuruza i soje. Suplementacija obroka ovim organskim mikromineralima takođe povećava svarljivost P u obroku za svinje na bazi kukuruza i soje, ali ne i svarljivost Ca. Dodavanje Zn (2-hydroxy-4-methylthio butanoična kiselina [HMTBa])₂, Cu (HMTBa)₂, Mn (HMTBa)₂ i FeGly u hranu za svinje može smanjiti fekalno izlučivanje ovih mikromineralu i P u poređenju sa obrocima za svinje koje sadrže ove minerale u neorganskom obliku. Uključivanje ovih organskih mikromineralu u obrok sa visokim sadržajem fitata može biti od veće koristi nego u obroku sa malo fitata (Liu i sar., 2014).

Postoje brojni radovi u kojima se iznose rezultati različitih eksperimenata koji su sprovedeni da bi se istražila uloga i uticaj različitih mineralu u helatnom ili organskom obliku na performanse živine u poređenju sa njihovim neorganskim oblikom (Muhammad i Mahpara, 2018).

Mikroelementi koji se dodaju obroku živine ukazuju na razlike sa aspekta dostupnosti i kontaminacije i izazivaju sve veću pažnju i zabrinutost. Na primer, bakar sulfat i cink oksid su uobičajeni neorganski izvori cinka za ishranu živine. Ova dva izvora obično potiču iz industrije čelika koja sadrži veliku količinu zagađivača kao što su fluor i kadmijum koji dospevaju do hrane (Lopes i sar., 2017). Resorpcija mineralu može biti poremećena zbog antagonizma koji uzrokuje smanjenje brzine metabolizma i resorpciju. Helatni kompleksi metalu sa aminokiselinama su inertni zbog jonske i kovalentne veze između liganda i mineralu. Prema tome, ovi oblici ostaju nepromenjeni na dejstvo faktora koji dovode do reakcije precipitacije kao što se dešava sa neorganskim mineralima nakon rastvaranja soli (Bao i Choct, 2009). Heliranje uzrokuje smanjenje veličine i poboljšanje stabilnosti što pomaže kompleksu da ostane nepromenjen tokom prolaska kroz GIT i da se resorbuje u netaknutom obliku bez ikakve promene njegovih aminokiselina (Bao i sar., 2007).

Ispitivani su, kako smo već napomenuli, različiti putevi resorpcije organskih i neorganskih mikroelemenata u ogleđima na živini. Nakon unosa mineralu u helatnom obliku, može doći do resorpcije u bilo kom delu tankog creva, dok se neorganski minerali obično resorbujuu u duodenumu. Nakon što dospeju do lumena creva posle hidrolize u regionu želucu, atomi liganda kovalentno vezani sa atomima metalu, deluju kao transporteri i štite mineralni atom od različitih antagonista (kao što su oksalna kiselina, gosipol i fitati). Nakon toga, ovi kompleksi se resorbujuu od strane enterocita u crevima, dok se neorganski oblici resorbujuu samo ako su dobili transporter u obliku neorganskog metalu. U suprotnom se izlučujuu (Muhammad i Mahpara 2018).

U literaturi postoje rezultati istraživanja upotrebe polisaharidnih kompleksa organskih mikroelemenata (SQM mikroelementi - QualiTech, USA) u ishrani brojlera. Protektovani SQM mikroelementi se dobijaju strogo kontrolisanim hidrotermičkim procesom. Ovaj tretman dovodi do formiranja elektrostatičkih

veza između pozitivno naelektrisanih metalnih jona i negativnih jona na specifičnim polisaharidima dobijenim iz morskih algi. Nagrađeni kompleks štiti mikroelemente od mogućih interakcija u gornjim partijama digestivnog trakta, pre svega u želucu. U tankom crevu, polisaharidi se razlažu delovanjem pankreasne amilaze tako da se tek tada oslobađaju metalni joni i omogućava se resorpcija mikroelementa prirodnim putem. U ogledu na brojlerima su u ishrani ogledne grupe korišćene smeše u kojima je 30 procenata sulfatnih izvora Fe, Cu, Mn i Zn zamenjeno mikroelementima vezanim za ugljene hidrate (SQM). Korišćenjem smeša sa organski vezanim mikroelementima postižu se značajno veći dnevni prirasti (za 12,78 procenata) pri nižoj konzumaciji (za 5.81 procenata) i uz bolju konverziju hrane za 16,70 procenata (Sinovec i Lazarević, 2002).

U ogledu na brojlerima (Khatun i sar., 2019) su pored grupe sa neorganskim oblicima minerala korišćene i različite forme organskih minerala za poređenje (propionat, meto-helirani oblik i proteinat). Grupe sa dodavanjem organskog oblika minerala i to sa proteinatom i propionatom su dale značajno bolje proizvodne rezultate i odnosu na druge ispitivane grupe.

Tabela 1. Poređenje relativne bioraspoloživosti između organskih i neorganskih minerala (Muhammad i Mahpara, 2018)

Organski minerali	Bioraspoloživost
Zink (helat)	Veća ekspresija metalotionina od neorganskog u crevnoj sredini
Zink proteinat	Relativno veća bioraspoloživost od neorganskih izvora na osnovu sadržaja cinka u tibiji
Mangan proteinat	Relativno veća bioraspoloživost od skoro 139% u odnosu na mangan sulfat
Peptidi i aminokiseline helatnog cinka	Veća relativna bioraspoloživost od 189% u odnosu na neorganski cink
Bio-pleks (organski cink 80 ppm)	Povećanje nivoa bakra i gvožđa u serumu
Organski i neorganski cink	Ima visoku relativnu bioraspoloživost od 164% u odnosu na neorganski cink sulfat
Mangan (organski)	Izaziva veću ekspresiju gena za mangan koji sadrži superoksid dismutazu
Izvori cinka kod brojlera	Relativno veća ekspresija mRNK za metalotionin u tkivima tankog creva pomoću PCR
Organski cink	Više taloženja minerala u koštanim tkivima u poređenju sa neorganskim izvorima
Mineralni proteinati i amikokiselinski helati	Poboljšana bioraspoloživost uz smanjenu sekreciju
Lizin sa cinkom i bakrom	Njihovi organski oblici su 106% i 120% bioraspoloživiji u odnosu na neorganske oblike
Kompleks mangan-metionin	Bioraspoloživost je skoro 75% veća u odnosu na neorganske izvore (mangan oksid)

U jednoj studiji je ispitivana zamena neorganskih oblika minerala (IM) Cu, Fe, Mn i Zn organskim oblikom (OM) u ishrani 67-nedeljnih kokošaka nosilja (DeKalb White nosilje) upoređivanjem svarljivosti, proizvodnje i kvaliteta jaja. Bakar, gvožđe, mangan i cink su u grupi nosilja koje su dobijale neorganski oblik minerala bili u obliku sulfata, a u premiks sa organskim oblikom minerala metalni jon je bio heliran sa metioninom. Bazalna ishrana je suplementirana neorganskim (IM100) ili organskim (OM100) mineralnim premiksom sa istim koncentracijama minerala koje se koriste komercijalno, ili u nekim oglednim grupama sa smanjenjem nivoa premiksa sa organskim mineralima (OM65 [65% OM100], OM45 [45% OM100] i OM35 [35% od OM100]). Nosilje koje su dobijale hranu sa organskim mineralima, bez obzira na nivo inkluzije mineralnog premiksa, nosile su jaja veće težine od onih koje su dobile neorganski premiks IM100. Za parametar mase jaja i proizvodni indeks koji uključuje masu jaja i procenat proizvodnje, nije bilo razlike između tretmana IM100, OM35 i OM45, dok su grupe nosilja hranjene sa premiksom OM65 i OM100 nosile jaja najveće mase (Crosara i sar., 2021).

Razvoj akvakulture podrazumeva dodavanje minerala u hranu za ribe kako bi se omogućilo njihovo bolje zdravlje i bolji proizvodni rezultati (Gasco i sar., 2018). Ovo je postalo neophodno kao rezultat prelaska na pretežno korišćenje biljne hrane. Minerali koji se nalaze u hranivima biljnog porekla su manje dostupni ribama od onih u ribljem brašnu. Neophodni minerali se mogu nadoknaditi upotrebom veće količine mineralnih suplemenata, što povećava zagađenje spoljne sredine. Godinama je bila praksa da se u hranu za ribe u uzgoju, dodaju minerali, uglavnom u neorganskom obliku, odnosno kao soli metala. Oni imaju tendenciju da se vežu za so u morskoj vodi, što znači da su manje dostupni ribama. Shodno tome, problem nastaje i njihovim ulaskom u spoljašnju sredinu.

Jedna od alternativa i rešenja je dodavanje minerala u organskom obliku što omogućava ribama da resorbuju više minerala, uz manje zagađenje okoline. Jedan od glavnih zaključaka četvorogodišnjeg istraživačkog projekta na Institutu za istraživanje mora je bio da dodavanje u hranu za uzgajane losose minerala u organskom obliku što rezultira manjim ekološkim zagađenjem kao i boljim proizvodnim rezultatima u uzgoju lososa (Runar, 2019).

ZAKLJUČAK

Razmišljanja o upotrebi mikroelemenata u ishrani životinja uglavnom su bila bazirana na korišćenju uobičajenih neorganskih formi (cink oksid, bakar sulfat i drugi). Čak se i u retkim slučajevima razmišljanja o odnosu iskoristivost/oblik, uobičajeni stav bazirao na korišćenju što većih količina minerala, s obzirom na njihovu utvrđenu slabu iskoristivost i nemogućnost da se zadovolje potrebe životinskog organizma ili tkiva u pojedinom mikroelementu. Danas je jasno da je izvor, odnosno oblik u kome se dodaje mikroelement od esencijalnog značaja i da presudno utiče na iskoristivost mikroelemenata, a samim tim i na proizvodne rezultate životinje. Korišćenjem organskih oblika mikroelemenata postiže se optimalan efekat u organizmu životinje, tako da se dosadašnji termin bioiskoristivost

može zameniti terminom biološka aktivnost koji na merodavniji način opisuje ulogu i značaj pojedinih mikroelemenata u metabolizmu.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Bao Y., Choct M. 2009. Trace mineral nutrition for broiler chickens and prospects of application of organically complexed trace minerals: a review. *Anim. Prod. Sci.*, 49(4): 269-82. 2. Bao Y., Choct M., Iji P., Bruerton K. 2007. Effect of organically complexed copper, iron, manganese, and zinc on broiler performance, mineral excretion, and accumulation in tissues. *J. Appl. Poultry Res.*, 16(3): 448-55. 3. Crosara F.S.G., Santos S.K.A., Silva L.S.S., Carvalho G.L., Litz F.H., Fernandes E.A. 2021. Organic copper, iron, manganese and zinc: digestibility, production parameters and egg quality of layers, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 73, 3, 733-41. 4. Gasco L., Gai F., Maricchiolo G., Genovese L., Ragonese S., Bottari T., Caruso G. 2018. Suplementations of vitamins, minerals, enzymes and antioxidants in fish feeds, Chapter 4 DOI: 10.1007/978-3-319-77941-6_4. 5. Gerbert S., Wenk C. 1994. Effect of chromium and manganese supplementation form on performance, digestion, carcass characteristics and blood parameters on finishing gilts. In: *Bioplex Trace Mineral Proteinates*, 2/97, Alltech, Inc. 6. Hemken R., Du Z., Shi W. 1996. Use of proteinates to reduce competition from other trace minerals. In: *Biotechnology in the feed industry*, 91-4. 7. Khatun A., Sachchidananda D., Bibek R., Bapon D., Azimul H., Bakthavachalam. 2019. Comparative effects of inorganic and three forms of organic trace minerals on growth performance, carcass traits, immunity, and profitability of broilers. *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, 6(1): 66-73. 8. Liu Y., Ma YL., Zhao JM., Vazquez-Añón M., Stein HH. 2014. Digestibility and retention of zinc, copper, manganese, iron, calcium, and phosphorus in pigs fed diets containing inorganic or organic minerals. *J. Anim. Sci.*, 92:3407-3415 doi:10.2527/jas2013-7080. 9. Lopes M., Paroul N., Barbosa J., Valduga E., Cansian RL., Toniazzo G., Oliveira D. 2017. Effect of Partial and Total Replacement of Inorganic by Organic Microminerals Sources on the Quality of Broiler Carcasses. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 60. 10. Lyons P.T. 1994. Biotechnology in the feed industry: and beyond. In: *Biotechnology in the feed industry*, 1-50. 11. Marković R. 2007. Uticaj selena organskog i neorganskog porekla i različite količine vitamina E na proizvodne rezultate i kvalitet mesa brojlera. Doktorska disertacija. Univerzitet u Bogradu, Fakultet veterinarske medicine. 12. McDowell L.R. 1992. *Minerals in Animal and Human Nutrition*. Academic Press, San Diego. 13. Muhammad HZ., Mahpara F. 2018. Efficiency Comparison of Organic and Inorganic Minerals in Poultry Nutrition: A Review, *PSM Veterinary Research*, 3(2): 53-59. 14. Pupavac S., Sinovec Z., Adamović M. 2000. The effects of using organically bonded trace elements on performance of sows. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 16, 3-4, 19-26. 15. Pupavac S., Sinovec Z., Ilić D., Bugarčić Ž., Jovanović N. 2001. Rezultati korišćenja vitaminsko-mineralnih predmeša različitog sastava u ishrani prasadi. *Vet. glasnik*, 55, 291-8. 16. Runar BM. 2019. Organic mineral supplements are better for fish and the environment, Institute of Marine Research <https://www.aquafeed.com/af-article/9267/Organic-mineral-supplements-are-better-for-fish-and-the-environment>. 17. Sinovec Z., Lazarević M. 2002. Mikroelementi vezani za ugljene hidrate i proizvodne karakteristike brojlera hibrida "Arbor Acre", Zbornik naučnih radova Instituta

PKB Agroekonomik, 8, 1, 355-63. **18.** Šefer D., Jakić-Dimić D., Jokić Ž., Sinovec Z. 2004. Helatni oblici mikroelemenata kao dodatak hrani za svinje, Veterinarski glasnik 58 (Dodatak 3 - 4) 469 – 79. **19.** Šefer D., Sinovec Z. 2008. Opšta ishrana, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.

CHELATE FORMS OF MICROELEMENTS AS FEED SUPPLEMENT FOR NON-RUMINANTS

Radmila Marković, Dejan Perić, Stamen Radulović, Svetlana Grdović, Dragoljub Jovanović, Adriana Radosavac, Dragan Šefer

Summary

Animals need trace elements in small amounts and participate in almost all physiological and biochemical processes. Resorption of microelements depends not only on the content in the feed, but also on the age of the animal, the electrochemical reaction in the intestines and the form in which the microelement is found. The choice of sources is based on the content of microelements in a pure state, solubility in the body, availability and usability. Oxides, chlorides and carbonates are poorly soluble, and besides, chlorides are hygroscopic, and carbonates oxidize quickly. Sulfates are stable salts, easy to purify, and the sulfate ion is easily excreted from the body. In addition to inorganic forms of mineral substances, the so-called "chelated" forms, i.e. organically bound microelements, are increasingly used today. Minerals bound with amino acids or peptides are better protected during the passage through the stomach, and resorption of the chelated form of copper is significantly higher than resorption from sulfate. Resorption of organically bound microelements does not take place conventionally (carrier/diffusion), so direct homeostatic control at the enterocyte level does not exist, and the retention and biological half-life of the chelated form is greater with the inorganic form.

By using mixtures for broilers with organically bound microelements, significantly higher daily gains (by 12.78%) are achieved with better consumption (by 5.81%) and with better feed conversion by 16.7%.

Addition of organic forms of zinc, copper, manganese and iron to pig feed affects better digestibility and retention of these microelements, but also reduces fecal excretion of these microminerals and P compared to pig feed containing inorganic forms of minerals. Including these organic micronutrients in a high-phytate diet may be more beneficial than in a low-phytate diet.

Key words: *chelated forms, nutrition of non-ruminants, microelements*

UPOTREBA FITAZE PRI FORMULACIJI OBROKA ZA ISHRANU MONOGASTRIČNIH ŽIVOTINJA U CILJU SMANJENOG IZLUČIVANJA FOSFORA U SPOLJAŠNJU SREDINU: PRAKTIČAN PRISTUP

Stamen Radulović¹, Dragan Šefer¹, Radmila Marković¹, Živan Jokić², Zoran Rašić³, Saša Lovrić⁴, Jasmina Kojičić Stefanović⁵

Kratak sadržaj

Upotreba enzima fitaze u ishrani životinja ima važan nutritivni, ekološki i ekonomski značaj. Danas postoje dva osnovna načina njene primene u praksi: korišćenjem matrica ili dodavanjem "on the top". S obzirom na prednosti koje pruža krajnjem korisniku, upotreba matrica postaje imperativ u savremenoj stočarskoj proizvodnji. Dobro je poznato da u slučajevima, kada cene nabavnih sirovina (kukuruz, pšenice, masti i neorganskog fosfora – MCP) rastu na tržištu, tada upotreba enzima u hrani postaje ekonomski atraktivnija i pruža korisniku znatno veću dobit u odnosu na početna ulaganja. Bez obzira što proizvođači fitaze preporučuju njenu upotrebu u znatno većim količinama u odnosu na raniju praksu, neophodno je napomenuti da su u pojedinim istraživanjima zapaženi i negativni efekti takve upotrebe (pad proizvodnih rezultata i poremećaji zdravstvenog stanja životinja. Novi tehnološki postupci u proizvodnji fitaze imaju za cilj da navedene probleme prevaziđu, a kroz tzv. „superdoziranje“ fitaze upotrebu neorganskog fosfora dodatno smanje, ili ga u potpunosti isključe iz recepture. Ipak, pri svakoj odluci o primeni fitaze neophodno je uzeti u obzir cenu preparata, njegovu optimalnu količinu i uštedu koja se može ostvariti primenom matrice (kroz smanjenje cene recepture, poboljšanje proizvodnih rezultata i zdravstvenog stanja tretiranih životinja).

Ključne reči: fitaza, matrice, reformulacija, neorganski fosfor

¹Dr sci. vet. med. Stamen Radulović, docent; dr sci. vet. med Dragan Šefer, redovni profesor; dr sci. vet. med Radmila Marković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr Živan Jokić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, R. Srbija

³Dr sci. vet. med. Zoran Rašić, Veterinarski specijalistički institut „Jagodina“, Jagodina, R. Srbija

⁴Dipl. inž. Saša Lovrić, doktorand, JU Veterinarski Institut Republike Srpske „Dr. Vaso Butozan“

⁵Spec. dr vet. Jasmina Kojičić Stefanović

*e-mail adresa autora za korespondenciju: stamen.radulovic@gmail.com

UVOD

Fosfor (P) je makroelement koji je neophodan za sve oblike života na Zemlji, od jednoćelijskih do višećelijskih organizama. Osnovnu ulogu ima u normalanom rastu skeleta i mišića, formiranju jaja, važan je sastojak nukleinskih kiselina, fosfolipida, a takođe je i kofaktor mnogih enzima. Posebno je važan u održavanju osmotske i acido-bazne ravnoteže, metabolizmu energije i aminokiselina, kao i sintezi proteina. Interesantna je kvalifikacija fosfora izneta od strane hemičara Isaka Asimova: „Život se može množavati dok sav fosfor ne nestane, a onda nastaje neumoljiv zastoj koji ništa ne može sprečiti“. On takođe navodi: „Možda ćemo moći da zamenimo ugalj nuklearnom energijom, drvo plastikom, meso kvascem, a druželjubivost izolacijom - ali za P ne postoji ni zamena ni obnova.“ Naime, za razliku od azota, fosfor se ne usvaja iz atmosfere i nije obnovljiv. Njegova, gotovo celokupna proizvodnja, se zasniva na “izvlačenju” iz fosfatnih stena. Na osnovu dinamike dosadašnje eksploatacije, smatra se da bi globalne rezerve fosfora mogle biti iscrpljene kroz narednih nekoliko stotina godina (Li i sar., 2016). Tome u značajnoj meri doprinosi poljoprivredni sektor, preko dva važna faktora:

1. Neracionalna upotreba fosfatnih đubriva (u ratarskoj proizvodnji)
2. Nedovoljna iskorišćenost fosfora u organizmu životinja (u stočarskoj proizvodnji)

Nedavne procene u Sjedinjenim Američkim Državama, ukazuju da je stočarska proizvodnja odgovorna za 33 procenta ukupne količine fosfora koja zagađuje resurse sveže vode. Tome najviše doprinose previsoke količine fosfora u stajskom đubretu koje dovode do značajne eutrofikacije (cvetanja) površinskih voda. Sve ovo je izazvalo veliko interesovanje javnosti za smanjenje sadržaja P u stajnjaku i donošenje novih propisa koji regulišu ovu oblast (Kebreab i sar., 2012).

Dobro je poznato da monogastrične životinje, usled nedostatka enzima fitaze, veoma loše iskorišćavaju fosfor iz hrane. Naime, približno 65-80 procenata od ukupne količine fosfora u zrnastim hranivima, nalazi se u formi fitinske kiseline, koja sa velikim brojem mineralnih materija gradi soli poznate kao fitati. Samo manja, preostala količina fosfora u biljci smatra se iskoristivom (Lorenz i sar., 2007). Pored navedenog, poznato je i da fitinska kiselina formira komplekse sa proteinima i skrobom, što dovodi do njihove smanjene svarljivosti. Fitinska kiselina, (ciklično jedinjenje 1,2,3,4,5,6-heksakis dihidrogen fosfat mioinozitol) je uobičajen oblik skladištenja fosfora u semenu i smatra se antinutritivnim faktorom.

S obzirom na važan ekološki i nutritivni značaj fosfora, razvijene su brojne tehnike koje za cilj imaju smanjenje njegovog izlučivanja u spoljašnju sredinu. One se mogu svrstati u dve grupe:

1. Tehnike usmerene na poboljšanje dostupnosti fosfora u hrani (formulacija upotrebom softvera, fazna ishrana životinja, personalizovana ishrana prema nivou proizvodnje, upotreba enzima fitaze, fermentisane tečne hrane, kao i transgenih biljaka)

2. Tehnike usmerene na poboljšanje efikasnosti životinja za korišćenje fosfora (upotreba transgenih životinja, njihova selekcija i primena nutrigenomike)

Najšire prihvaćena opcija za povećanje iskoristivosti fosfora u ishrani životinja predstavlja upotreba enzima fitaze. On pripada klasi fosfataza i omogućava defosforilaciju fitata u digestivnom traktu životinja ili u hrani pre ingestije. Ovaj enzim se prirodno može naći u biljkama, crevnoj mikroflori i crevnoj sluzokoži, pri čemu je njegova aktivnost u poslednja dva navedena izvora kod monogastričnih životinja minimalna. Primenom fitaze u ishrani životinja, oslobađa se fosfor iz neiskoristivog oblika fitata, a istovremeno i niz drugih hranljivih materija čime se povećava njihova iskoristivost.

ISTORIJAT UPOTREBE FITAZE

Fitazna aktivnost je prvi put otkrivena u pirinčanim mekinjama, pre više od jednog veka (Suzucki i sar., 1907). Međutim, prvi pokušaji proizvodnje ovog enzima fitaze za potrebe industrije hrane za životinje započeti su tek 60-ih godina prošlog veka (Wodzinski i Ulah, 1996). Konačno, 1991. godine, u Holandiji je počela upotreba komercijalnog preparata fitaze (Natuphos®) gljivičnog porekla (*Aspergillus niger*). Smatra se da je ovom razvoju najviše doprinela briga javnosti o negativnom ekološkom uticaja fosfora (P) kao efluentu iz svinjarske i živinarske proizvodnje. Takođe, važan uticaj imalo je zakonodavstvo u ovoj oblasti, kao i visoke kazne koje su uvedene u Holandiji za sve proizvođače svinja i živine kod kojih se utvrde prekomerni nivoi izlučenog P na farmama. Veoma ohrabrujuća bila su i prva istraživanja (Simons i sar., 1990) u kojima je dokazano da se upotrebom fitaze (1000 FTU fitazne jedinice po kg smeše) može smanjiti izlučivanje P za 35 procenata kod svinja i za 47 procenata kod brojlera. Iako se u početku smatralo da će upotreba fitaze biti ograničena samo na zemlje sa sličnim zakonodavstvom kao u Holandiji, vrlo brzo njena upotreba proširila se i u drugim zemljama. Tome su naročito doprineli faktori kao što su: uvođenje sve većeg broja komercijalnih proizvoda fitaze, smanjenje cene fitaze, povećanje cene neorganskog P i uopšte sirovina za proizvodnju hrane, zabrana upotrebe mesno-koštanog brašna u nekoliko zemalja, kao i sve veće podizanje svesti o značaju zagađenja životne sredine fosforom. Pored toga, rezultati brojnih naučnih istraživanja i bolje razumevanje mehanizma dejstva i uslova neophodnih za aktivnost fitaze, razvoj novih tehnoloških postupaka u proizvodnji (fitaze nove generacije) i povećanje terenskog iskustva, kao i poverenja u praktičnu primenu enzima fitaze, doprineli su brzom rastu njene upotrebe (Bedford, 2003).

TREKUTNO STANJE NA TRŽIŠTU FITAZE

Enzimi trenutno predstavljaju najbrže rastući segment na tržištu dodataka hrani za životinje. Njihova vrednost na globalnom nivou u 2020. godini je procenjena na 1,3 milijarde dolara, uz očekivani godišnji rast (engl. *Compound Annual*

Growth Rate CAGR) od 8,1 procenata, tako da projekcije za 2025. godinu iznose 1,9 milijardi dolara. Od svih enzima, fitaza zauzima najveći deo tržišta. Naime, globalno tržište fitaze je, u 2018. godini procenjeno na 436,99 miliona dolara uz očekivan godišnji rast (*CAGR*) od 5,7 procenata tokom perioda, 2019–2026. Pri tome, fitaza koja se proizvodi u praškastoj formi, ima značajnu prednost u odnosu na tečnu, dok fitaza mikrobiološkog porekla ima prednost u odnosu na fitazu biljnog i animalnog porekla. Kada je reč o njenoj upotrebi, živinarska proizvodnja zauzima vodeće mesto, a zatim slede svinjarska i govedarska proizvodnja, akvakultura i ostali (konji i kućni ljubimci). Severna Amerika drži najveći deo tržišta, zatim Evropa, nakon čega slede Azija i Pacifik, Latinska Amerika, Bliski istok i Afrika (Straits research, 2021). Kao najznačajnije kompanije na tržištu enzima danas su se izdvojili: Kemin Industries, DSM, Novozymes, Vland Biotech Group, DowDuPont Inc. (Danisco A/S), Beijing Smistyle, VTR, BASF, Jinan Tiantianxiang (TTX), Huvepharma, AB Enzymes, Willows Ingredients i Adisseo.

PRAKTIČNA PRIMENA FITAZE U ISHRANI ŽIVOTINJA

Veliki broj faktora utiče na to da li će fitaza ispoljiti svoju punu efikasnost u ishrani životinja. Oni se mogu podeliti u tri grupe (Yueming i sar., 2015) i to:

1. Faktori koji se odnose na fitazu (optimalni pH opseg aktivnosti, vrsta/tip fitaze i njena otpornost na dejstvo proteaza)
2. Faktori koji se odnose na životinje (vrsta, starost životinje i vreme zadržavanja u digestivnom traktu)
3. Nutritivni faktori (sadržaj fitata, nivo kalcijuma i fosfora u hrani, odnos kalcijum:fosfor, sadržaj natrijuma, organskih kiselina, kao i prisustvo drugih upotrebljenih enzima)

Posebno važan faktor predstavlja dobro poznavanje i preciznost u kalkulacijama tokom praktičnog rada nutricionista. Tako se fitaza, uostalom kao i sve druge vrste enzima, u ishrani životinja može upotrebiti na dva načina:

1. **Primenom matrica:** ovo podrazumeva reformulaciju postojeće recepture korišćenjem vrednosti koje proizvođač u uputstvu (matrici) daje za dati preparat, prvenstveno za fosfor, ali i za kalcijum, proteine, aminokiseline i energiju. Vrednosti matrice kvantifikuju obim do kojeg se navedeni hranljivi sastojci oslobađaju upotrebom enzima. Drugim rečima, preparat (fitaza) se tretira kao hranivo koje ima svoje definisane vrednosti u datim hranljivim materijama ukoliko se uključi u strukturu obroka u određenoj količini (koju preporučuje proizvođač). Na taj način se može isključiti deo upotrebljenog neorganskog izvora fosfora (monokalcijum fosfata), ali i nekih drugih sirovina (dikalcijum fosfat, stočna kreda i druge). Ukoliko se pri formulaciji obroka koristi softver, tada se za dati preparat fitaze, pored svih vrednosti iz matrice, navodi cena, kao i interval njegovog učešća u strukturi obroka. Tek tada program može, da na osnovu svih upotrebljenih parametara, brzo i tačno predloži najbolje rešenje.

2. Primenom “on the top”: ovo ne podrazumeva reformulaciju postojeće recepture, tako da nema ni mogućnosti za snižavanje njene cene. Troškovi dodavanja preparata u standardnu formulaciju se opravdavaju kroz postizanje boljih proizvodnih rezultata tretiranih jedinki (poboljšanjem efikasnosti korišćenja hrane). Tom prilikom se najšee koriste najniže preporučene vrednosti fitaze. Za ovu tehniku uglavnom se opredeljuju korisnici bez dovoljne obučenosti za primenu matrica.

S obzirom na prednosti koje pruža krajnjem korisniku, upotreba matrica postaje imperativ u savremenoj stočarskoj proizvodnji. Takođe je dobro poznato da u svim slučajevima, kada cene nabavnih sirovina (kukuruz, pšenice, masti, posebno neorganskog fosfora) rastu na tržištu, tadanupotreba enzima u hrani postaje ekonomski atraktivnija i pruža korisniku znatno veću dobit u odnosu na početna ulaganja. Ipak, pri svakoj odluci o primeni fitaze, neophodno je uzeti u obzir cenu preparata, njegovu optimalnu količinu i uštedu koja se može ostvariti primenom matrice, kao i očekivana poboljšanja u proizvodnim rezultatima i/ili zdravstvenom stanju životinja. Osnovni koraci u praktičnom radu sa matricama podrazumevaju sledeće:

1. Pored standardnog hemijskog sastava, neophodno je za svako hranivo poznavati tačnu količinu ukupnog, fitinskog (neiskoristivog) i iskoristivog fosfora. Nove matrice zahtevaju poznavanje vrednosti za dostupan (engl. *av. P poultry*) fosfor (za živinu) ili svarljiv (engl. *dig. P pigs*) fosfor (za svinje).
2. Potrebno je poznavati vrednosti koje pruža matrica najpre za fosfor i kalcijum, a zatim i za hranljive materije.
3. Važno je raspolagati sa jasno definisanim i ažuriranim preporukama o potrebama životinje (za svaki hibrid i kategoriju) u ukupnom, iskoristivom ili svarljivom fosforu (normativi ishrane dati u vodičima).

Sve navedeno se najbolje može predstaviti na konkretnom primeru recepture koja zadovoljava sve potrebe definisane Pravilnikom za starter fazu ishrane brojlera. Pri formulaciji recapture, korišćene su nutritivne tablice INRA (sadržaj fosfora u upotrebljenim hranivima predstavljen je u tabeli 1). Jednostavnim množenjem procentualnog učešća svakog od hraniva koje učestvuje u prikazanoj recepturi sa procentualnim sadržajem fosfora u njemu dobija se sadržaj ukupnog i iskoristivog fosfora u smeši. Na ovaj način, u starter smeši je obezbeđen sadržaj ukupnog fosfora od 0,66%, a iskoristivog 0,409%. Prema Pravilniku, u starter smeši neophodno je obezbediti 0,65-0,85% ukupnog i 0,40% iskoristivog fosfora, što je prikazanom recepturom ispunjeno. Međutim, u normativima koje daju svetski proizvođači hibrida, ne navode se vrednosti za ukupan, već samo za iskoristivi fosfor. Tako je za starter smešu za ishranu Cobb 500 potrebno 0,45%, a za Ross 308 0,48% iskoristivog fosfora (date zahteve prikazana receptura ne ispunjava). Primenom fitaze “on the top” u navedenoj recepturi se ne vrši rekalkulacija, dok je u slučaju primene matrice to neophodno učiniti. Primer matrice jednog inostranog proizvođača prikazan je na slici 1. Ukoliko se korisnik

odluči na najniže predloženo doziranje od 100 g preparata na jednu tonu hrane i uobičajenu aktivnost od 500 FTU, tada će fitaza osloboditi 1,45 g iskoristivog fosfora po jednom kilogramu potpune smeše. S obzirom da su u svim prethodnim kalkulacijama korišćene procentualne vrednosti, tako i u ovom slučaju treba uraditi i koristiti vrednosti od 0,01% preparata fitaze i 0,145% iskoristivog fosfora. Imajući u vidu visoko ušešće MCP u recepturi, kao i njegovu visoku tržišnu cenu, sigurno je da on ekonomski značajno opterećuje smešu. Sa druge strane, pri ukupnom učešću od 1,2 % u smeši on obezbeđuje 0,2724% iskoristivog fosfora (22,7% od 1,2). Upotrebom fitaze u količini od 0,01%, količina MCP se može smanjiti na 0,56%. Naime, kada se od ukupne količine iskoristivog fosfora koju obezbeđuje MCP (0,2724%) oduzme 0,145% (koliko oslobađa fitaza), na osnovu preostale količine (0,1274%) se jednostavno preračunava potrebna količina MCP (1,2 % MCP daje 0,2724% iskoristivog P, a X % MCP daje 0,1274; X iznosi 0,56). Konkretno, sa početnih 1,2 % MCP u starter smeši, upotrebom 0,01% preparata fitaze, moguće je značajno smanjiti njegovu količinu (na 0,561%), a da pri tome količina iskoristivog fosfora ostane nepromenjena.

Tabela 1. Sirovinski sastav starter smeše za ishranu brojlera i sadržaj fosfora u korišćenim hranivima

Redni broj	Hranivo	Starter	Ukupni fosfor	Fitinski fosfor	Iskoristivi fosfor
		% u smeši	% u hranivu	% u hranivu	% u hranivu
1.	Kukuruz	44.0	0,26	0,195	0,065
2.	Pšenica	10.0	0,32	0,208	0,112
3.	Sojina sačma	30.0	0,62	0,372	0,248
4.	Sojin griz	10.0	0,55	0,33	0,22
5.	Sojino ulje	2.2	/	/	/
6.	Suncokretova sačma	/	1,08	0,918	0,162
7.	Pšenične mekinje	/	0,99	0,792	0,198
8.	Stočna kreda	1.6	36,23	/	36,23
9.	Monokalcijum fosfat (MCP)	1.2	22,7	/	22,7
10.	Premiks	1.0	/	/	/

BROILERS/TURKEYS		500 FTU		1000 FTU		1500 FTU		2000 FTU	
Nutrient	Unit	Contribution (per kg feed)	Fixed dose 100 g/T (per kg product)	Contribution (per kg feed)	Fixed dose 200 g/T (per kg product)	Contribution (per kg feed)	Fixed dose 300 g/T (per kg product)	Contribution (per kg feed)	Fixed dose 400 g/T (per kg product)
av. P poultry	g/kg	1.45	14500	1.68	8400	1.82	6067	1.95	4875
Ca	g/kg	1.45	14500	1.68	8400	1.82	6067	1.95	4875
Na	g/kg	0.25	2500	0.30	1500	0.33	1100	0.35	875
Crude Protein	g/kg	2.25	22500	2.93	14650	3.50	11667	3.92	9800
dig. Lys	g/kg	0.12	1200	0.16	800	0.19	633	0.21	525
dig. Meth	g/kg	0.05	500	0.07	326	0.08	259	0.09	218
dig. Cys	g/kg	0.11	1100	0.14	716	0.17	570	0.19	479
dig. Meth + Cys	g/kg	0.16	1600	0.21	1042	0.25	830	0.28	697
dig. Threo	g/kg	0.13	1300	0.17	850	0.20	667	0.23	575
dig. Tryp	g/kg	0.03	300	0.04	200	0.05	150	0.05	125
dig. Gly + Ser	g/kg	0.30	3000	0.39	1940	0.46	1530	0.52	1310
dig. Arg	g/kg	0.07	700	0.09	453	0.11	357	0.12	306
dig. Val	g/kg	0.12	1200	0.16	776	0.18	612	0.21	524
dig. Isoleuc	g/kg	0.14	1400	0.18	906	0.21	714	0.24	611
AME	kJ/kg	0.222	2220	0.289	1445	0.343	1143	0.389	973
AME	kcal/kg	53	530000	69	345000	82	273333	93	232500

Slika 1. Matrica inostranog proizvođača fitaze za upotrebu u ishrani živine

U navedenom primeru opisan je samo osnovni način korišćenja matrice. Međutim, njena potpuna primena podrazumeva i rekalkulacije u pogledu sadržaja kalcijuma, natrijuma, proteina, svarljivih aminokiselina i energije. Takođe, u navedenom primeru smatra se da sav fosfor koji se obezbeđuje iz MCP predstavlja ujedno i iskoristiv fosfor, iako nutritivne tablice i za mineralna hraniva pružaju podatke o relativnoj biološkoj vrednosti (RBV) koje treba uzeti u obzir (u ishrani živine fosfor poreklom iz MCP ima RBV 91%, a u ishrani svinja 92%). Prilikom primene matrica u ishrani svinja, umesto iskoristivog, potrebno je poznavati podatke o sadržaju svarljivog fosfora u hrani, njegovim potrebama u ishrani svinja, kao i vrednostima koje pruža matrica.

ZAKONSKI ASPEKTI I REGULATIVA UPOTREBE FITAZE U ISHRANI ŽIVOTINJA

Na osnovu trenutno važećeg Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje u našoj zemlji (Službeni glasnik RS, broj 41/09, 2010), svi dodaci hrani za životinje su podeljeni u sedam grupa:

- 1) Vitamini i provitamini
- 2) Mikroelementi i minerali
- 3) Nепroteinska azotna jedinjenja
- 4) Aminokiseline
- 5) Stimulatori rasta
- 6) Kokcidiostatici
- 7) Ostali dozvoljeni dodaci

Unutar poslednje grupe "ostali dozvoljeni dodaci" nalazi se veliki broj podgrupa (antioksidansi, sredstva za vezivanje, emulgatori, stabilizatori i zgušnj-

vači, materije za bojenje uključujući i pigmente, konzervansi, arome i pojačivači apetita, sredstva za poboljšavanje iskoristljivosti hrane i fitobiotici) među kojima su i enzimi. U smislu Pravilnika, enzimi predstavljaju dodatke koji se koriste za poboljšanje probavljivosti hrane i prema Članu 97 u njih spadaju:

1. Fitaza,
2. Lipaza,
3. Amilaza (α amilaza),
4. Proteaza,
5. (β) glukanaza,
6. (β) glukozidaza,
7. Ksilanaza,
8. Celulaza,
9. Hemicelulaza, kao i
10. Drugi odobreni enzimi (kao pojedinačni pripravci ili njihove mešavine).

Kada je reč o zakonskoj regulativi u Evropskoj uniji, važno je izdvojiti Uredbu "European Parliament and Council Regulation (EC) No 1831/2003" koju je 2003. godine donela Evropska Komisija (European Commission) kako bi regulisala oblast dodataka hrani za životinje. Na osnovu ove Uredbe, svi aditivi su podeljeni u pet kategorija, (sa velikim brojem funkcionalnih grupa) i to na sledeći način:

1. Tehnološki aditivi [(a) konzervansi, (b) antioksidansi, (c) emulgatori, (d) agensi za stabilizaciju, (e) zgušnjavanje i (f) formiranje gela, (g) vezivna sredstva, (h) supstance za kontrolu prisustva radionukleida, (I) sredstva protiv zgrudnjavanja, (j) regulatori kiselosti, (k) silažni aditivi, (l) denaturanti, (m) sredstva za kontrolu prisustva mikotoksina, (n) poboljšivači higijenskih uslova i *(o) drugi tehnološki aditivi]
2. Senzorni aditivi [(a) arome, (b) boje]
3. Nutritivni dodaci [(a) vitamini i provitamini, (b) mikroelementi, (c) aminokiseline, (d) urea i njeni derivati]
4. Zootehnički aditivi [(a) poboljšivači svarljivosti, (b) stabilizatori crevne flore, (c) supstance koje imaju poželjan uticaj na okolinu, (d)*stabilizatori fiziološke kondicije i (e) drugi zootehnički aditivi]
5. Kokcidiostatici i histomonostatici

*navdene funkcionalne grupe aditiva su naknadno uspostavljene Uredbom 2019/962 kojom je dopunjen Aneks I Uredbe 1831/2003

Bez obzira o kojoj vrsti aditiva je reč, svi oni, nakon prolaska autorizacije, a pre puštanja u promet, moraju zadovoljiti "opšte uslove označavanja". Prema njima, neophodno je da aditivi budu označeni na upadljiv, jasan, čitljiv i neizbrisiv način. Pri tome, deklaracija mora da sadrži sledeće informacije:

1. Specifičan naziv koji se daje aditivima prilikom njihovog odobrenja (autorizacije), naziv funkcionalne grupe kojoj pripadaju i njihov identifikacioni broj
2. Ime i adresu ili registrovano mesto lica odgovornog za ove podatke
3. Neto težinu ili neto zapreminu aditiva
4. Broj odobrenja objekta koji proizvodi aditiv ili ga stavlja u promet
5. Uputstvo za upotrebu i sve bezbednosne preporuke u vezi sa upotrebom
6. Posebne zahteve navedene u odobrenju, uključujući vrstu I kategoriju životinje kojoj je aditiv namenjen, kao i
7. Broj serije/lota i datum proizvodnje

Pored navedenih opštih uslova za označavanje aditiva, u aneksu 3 (ANNEX III) ove Uredbe za nekoliko aditiva i/ili funkcionalnih grupa se navode i "posebni uslovi". Između ostalih, oni se odnose i na enzime, za koje je neophodno navesti sledeće podatke:

1. Datum isteka garancije ili roka skladištenja od datuma proizvodnje,
2. Uputstvo za upotrebu,
3. Specifičan naziv aktivne komponente ili komponenti u skladu sa njihovim enzimskim aktivnostima, u skladu sa izdatim ovlašćenjem
4. Identifikacioni IUBMB broj (International Union of Biochemistry)
5. Umesto koncentracije: jedinica aktivnosti (jedinica aktivnosti po gramu ili jedinica aktivnosti po mililitru)

Svi aditivi odobreni shodno Uredbi, nalaze se prikazani u Registru aditiva za hranu za životinje (European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003). Konkretno, enzimi su raspoređeni unutar Registra u dve kategorije, i to:

1. Kategorija 1: Tehnološki aditivi, funkcionalna grupa silažni aditiv (*k)
2. Kategorija 4: Zootehnički aditivi, funkcionalna grupa poboljšivači svarljivosti (*a)

*sve funkcionalne grupe unutar svake od pet kategorija aditiva obeležene su slovima, abecednim redosledom

U okviru enzima, fitaza pripada samo kategoriji 4, a način njenog predstavljanja u Registru dat je na primeru preparata *6-phytase* u tabeli 2.

Oficijalni žurnal Evropske unije (OJ) pruža niz dodatnih informacija koji se tiču postupka autorizacije ovog preparata kao i njegovih tehničkih karakteristika. Među njima je najvažnije izdvojiti:

1. Minimalnu aktivnost preparata (iznosi 15 000 PU/g),
2. Minimalnu i Maksimalnu preporučenu dozu preparata (250 PU i 2000 PU / kg potpune smeše),

3. Analitički metod koji se primenjuje u proceni aktivnosti enzima 6-phytase unutar preparata (kolorimetrijska metoda zasnovana na enzimskoj reakciji fitaze na fitatu) i
4. Analitički metod koji se primenjuje u proceni aktivnosti enzima 6-phytase nakon njegovog umešavanja u premix, potpunu ili dopunsku smešu (kolorimetrijska metoda zasnovana na enzimskoj reakciji fitaze na fitatu EN ISO 30024).

Tabela 2: Način prikazivanja enzima fitaze u Registru aditiva za hranu za životinje EU

Category / Kategorija	4
Functional Group / Funkcionalna grupa	a
Subclassification / Podgrupa	poboljšivači svarljivosti
Code / Kod	4a 24
Additive / Aditiv	6-phytase EC 3.1.3.26 Proizveden na <i>Trichoderma reesei</i> (ATCC SD-6528) (vlasnik autorizacije Danisco (UK) Ltd) [sve vrste živine; sve vrste svinja, osim prasadi na sisi
Reference(s) of Community legal act (Title and/or No. of legal measure) / Naziv i broj legislative	Commission Implementing Regulation (EU) 2016/899 of 8 June 2016
Reference in OJ / Referenca u OJ (Official Journal of the European Union)	OJL 152 09.06.2016. p.15
Date of authorization / Datum dobijanja odobrenja	29.06.2016
Expiry date of authorisation(s) / Datum isteka odobrenja	29.06.2026
Date of first entry in the Register / Datum prvog upisa u Registar	09.06.16

Fitazna jedinica PU (engl. *Phytic Unit*) predstavlja količinu enzima koja može da oslobodi 1 mikromol neorganskog fosfata u minuti iz supstrata natrijum fitata pri pH vrednosti 5,5 i temperaturi od 37 °C .

ZAKLJUČAK

Upotreba fitaze u ishrani životinja ima važan nutritivni, ekološki i ekonomski značaj. Oslobođanjem fosfora, ali i drugih hranljivih materija iz neiskoristivog kompleksa unutar kojeg se nalaze, fitaza pruža mogućnost da životinja iz svakog hraniva "izvuče" znatno više nego što je to moguće bez njene upotrebe. Povećanim iskorišćavanjem fosfora u organizmu životinje ili smanjenjem njegove upo-

trebe iz neorganskih izvora, pri upotrebi matrica smanjuje se izlučivanje fosfora u spoljašnju sredinu. Isto važi i za druge materije (kalcijum, natrijum, proteine) ukoliko se matrica u potpunosti primeni. Reformulacijom recepture omogućavaju se značajne uštede u pogledu smanjenja učešća MCP, stočne krede, proteina, kao i sintetskih aminokiselina u strukturi obroka. Iako proizvođači fitaze preporučuju njenu upotrebu u znatno većim količinama u odnosu na raniju praksu, neophodno je napomenuti da su u pojedinim istraživanjima zapaženi i negativni efekti takve upotrebe. Tu se, pre svega misli na pad proizvodnih rezultata, a u pojedinim slučajevima i poremećaje zdravstvenog stanja životinja. Novi tehnološki postupci u proizvodnji fitaze imaju za cilj da navedene probleme prevaziđu, a kroz tzv. superdoziranje fitaze dodatno smanje upotrebu neorganskog fosfora ili ga u potpunosti isključe iz recepture.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Bedford M.R. 2003. New enzyme technologies for poultry feeds. *British Poultry Science* 44 (Suppl. 1), S14–S16. 2. COMMISSION REGULATION (EU) 2019/962, amending Annex I to Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of two new functional groups of feed additives, 2019. 3. European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003, Edition 241, 2016. 4. INRA-AFZ, 2004. Tables of composition and nutritional value of feed materials, Daniel Sauvant, Jean-Marc Perez and Gilles Tran, Wageningen Academic. 5. Ke-breab E., Hansen A.V., Strathe A.B. 2012. Animal production for efficient phosphate utilization: from optimized feed to high efficiency livestock. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 872–7. 6. Li X., Zhang D., Yang T. Y., Bryden W.L., 2016. Phosphorus Bioavailability: A Key Aspect for Conserving this Critical Animal Feed Resource with Reference to Broiler Nutrition. *Agriculture*. 6, 25. 7. Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje, Službeni glasnik RS, 4/2010 i 113/2012, 27/2014, 25/2015 i 39/2016. 8. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. 9. Simons P.C.M., Versteegh H.A.J., Jongbloed A.W., Kemme P.A., Slump P., Bos K.D. et al., 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition* 64, 525–40. 10. Straits research, 2021. Market Research Report, Animal Feed Phytase Market: Information by Types (Granular Phytases, Powder Phytases and Thermostable Phytases) Application (Swine, Poultry, Aquatic Animals), and Region — Forecast till 2026. 11. Suzucki U., Yoshimura K. and Takashi M. 1907. Über ein Enzym 'Phytase' das Anhydrooxy- methylen-diphosphosaure spaltet. *College of Agriculture Bulletin, Tokyo Imperial University* 7, 503–5. 12. Wodzinski R.J. Ullah A.H.J., 1996. Phytase. *Advances in Applied Microbiology* 42, 263–303. 13. Yueming D.L., Awati A., Schulze H., Partridge G., 2015. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *J Sci Food Agric*. 95: 878–96.

THE USE OF PHYTASE IN THE FORMULATION OF RATIONS FOR THE FEEDING OF MONOGASTRIC ANIMALS IN ORDER TO REDUCE THE EXCRETION OF PHOSPHORUS INTO THE ENVIRONMENT: A PRACTICAL APPROACH

Stamen Radulović, Dragan Šefer, Radmila Marković, Živan Jokić, Zoran Rašić, Saša Lovrić, Jasmina Kojičić Stefanović

Summary

The use of phytase in animal nutrition has important nutritional, ecological and economic importance. There are two basic ways of its application in practice: through the use of matrices or on top. Considering the unequivocal advantages it provides to the end user, the use of matrices becomes imperative in modern livestock production. It is well known that in all cases when the prices of corn, wheat, fat, and in the case of phytase, especially inorganic phosphorus (MCP), increase in the market, then the use of enzymes in feed becomes more economically attractive and provides the user with a significantly higher return for initial investment. Although the producers of phytase recommend its use in much larger quantities compared to the previous practice, it is necessary to mention that in some studies the negative effects of such use have also been noted (decrease in production results, and in some cases also disturbances in the health of animals). New technological procedures in the production of phytase aim to overcome the aforementioned effects, and through the so-called superdosing of phytase further reduce the use of inorganic phosphorus or even completely excludes it from the feed mixtures. However, with every decision on the application of phytase, it is necessary to take into account the price of the preparation, its optimal amount and the savings that can be achieved by applying the matrix, as well as the effects on the production results and/or the health status of the treated animals.

Key words: phytase, matrices, reformulation, inorganic phosphorus

UPOTREBA ETARSKIH ULJA U ISHRANI PREŽIVARA SA CILJEM ZAŠTITE ŽIVOTNE SREDINE

*Svetlana Grdović, Radmila Marković, Stamen Radulović,
Dejan Perić, Dragan Šefer*

Kratak sadržaj

Posljednjih godina, u svetu vlada veliko interesovanje za smanjenjem emisije metana nastalog metanogenezom u rumenu preživara. Zbog toga su dodaci hrani, koji mogu da modifikuju fermentaciju u buragu od velikog interesa. Antibiotici, kao dodaci hrani za životinje, su se pokazali kao veoma efikasni u smanjenju proizvodnje metana, ali je pojava otpornih mikroorganizama i rezidua u animalnim proizvodima, dovela do zabrane njihove primene. Postoji izuzetno veliko interesovanje za istraživanjima različitih sekundarnih metabolita biljaka, kao što su etarska ulja, tanini, saponini i flavonoidi, koji se mogu koristiti kao prirodni modifikatori aktivnosti mikroorganizama buraga. Kao bezbedni dodaci u hrani za životinje, sa ciljem smanjenja emisije metana, prepoznata su etarska ulja i na tu činjenicu ukazuje veliki broj saopštenja i naučnih radova. Ovde ćemo prikazati rezultate nekoliko istraživanja te vrste.

Ključne reči: *etarska ulja, metanogeneza, preživari, životna sredina*

UVOD

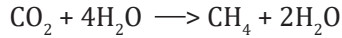
Klimatske promene koje se danas uočavaju, a biće sve redovnije narednih godina, rezultat su veće koncentracije gasova, pre svega ugljen-dioksida, azot-oksida i metana, koji dovode do povećanja efekta staklene bašte. Pretpostavlja se da će 2050. godine svetska populacija dostići broj od 9,6 milijardi ljudi (FAO, 2016) što će udvostručiti potrošnju mesa i mleka, a uvećati stočarsku proizvodnju i emisiju gasova. Sistemi uzgajanja preživara značajno doprinose emisiji enteričnog metana u atmosferu (Beauchemin i sar., 2020) koji ima 28 puta veći potencijal globalnog zagrevanja u poređenju sa ugljen-dioksidom (IPCC ed., 2013).

Metan je gas koji se proizvodi u buragu preživara i tokom dana se neprekidno emituje u atmosferu, uglavnom kroz usta (95 procenata), a u manjoj meri kroz nozdrve i anus (2-3 procenta) (Murray i sar., 1976). Brzina proizvodnje metana u buragu zavisi od sastava obroka, odnosno vrste ugljenih hidrata (celuloza ili

¹Dr Svetlana Grdović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Radmila Marković, redovni profesor; dr sci. vet. med. Stamen Radulović, docent; dr vet. Dejan Perić; dr sci. vet. med. Dragan Šefer, redovni profesor; Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: cecag@vet.bg.ac.rs

skrob), proteina i lipida, ali i od fizioloških faktora i vremena zadržavanja hrane u buragu (Patra i sar., 2017). Zajednice protozoa, bakterija i gljiva u buragu fermentišu ugljene hidrate i proteine. Protozoe koriste skrob, celulozu, hemicelulozu, pektin i rastvorljive šećere za proizvodnju isparljivih masnih kiselina i metaboličkog vodonika, koga koriste metanogene bakterije za proizvodnju metana (Van Soest, 1994). Metanogene bakterije u rumenu koriste metabolički vodonik i redukujući ugljen-dioksid u nizu biohemijskih reakcija sintetišu metan i ATP.



Smanjenje sinteze metana bi se postiglo inhibicijom reakcija oslobađanja H₂, ili promovisanjem alternativnih puteva gde se H₂ uklanja tokom fermentacije (Patra i sar., 2017). Ishrana biljkama koje sadrže sekundarne metabolite mogla bi da izazove promene u fermentaciji u buragu preusmeravajući H₂ u energetski efikasnije biohemijske puteve (sinteza isparljivih masnih kiselina kao što je propionat) koji će istovremeno smanjiti formiranje metana (Ku-Vera i sar., 2020). Tokom poslednjih godina u brojnim studijama je ispitivan efekat etarskih ulja i njihovih aktivnih komponenti na mikrobnu fermentaciju u buragu. Etarska ulja, sa jedne strane, imaju sposobnost da modifikuju permeabilnost ćelijske membrane mikroorganizama i da budu toksična za neke sojeve mikroorganizama buraga, posebno gram-negativnih. Sa druge strane, ona mogu da poboljšaju efikasnost hrane i iskorišćavanje hranljivih materija, tako da predstavljaju potencijalno obećavajuću prirodnu alternativu za manipulisanje fermentacijom u rumenu (McIntosh i sar., 2003). Smanjenje emisije metana iz enteričke fermentacije je korisno i za životinje (poboljšana efikasnost hrane i produktivnost) i za životnu sredinu (ublažavanje efekta staklene bašte) (Benchaar & Greathead, 2011).

ETARSKA ULJA

Etarska ulja su glavni sastojci aromatičnih biljaka koje se tradicionalno koriste u narodnoj medicini za lečenje različitih poremećaja zdravstvenih stanja (Cruz i sar., 2017). Efekti aromatičnih biljaka su izazvali interesovanje za sisteme stočarske proizvodnje, zbog toga što se primenom ovih biljaka kao aditiva, može efikasno modifikovati fermentacija u buragu, inhibicijom deaminacije i metanogeneze. Ovo rezultira redukcijom enteričnog metana, NH₃-N i acetata (Kurniavati i sar., 2020; Vang i sar., 2016).

Etarska ulja biljaka su isparljiva aromatična jedinjenja, sastavljena od mešavine sekundarnih metabolita. Uglavnom su to terpenska jedinjenja, monoterpeni, saskviterpeni i alkoholi, aldehidi, estri, ketoni i fenoli koji su odgovorni za aromu (Bakkali i sar., 2008). Etarska ulja, se nazivaju i isparljiva ulja, a nalaze se u mnogim jestivim, lekovitim i začinskim biljkama. Mogu se ekstrahovati iz različitih delova biljke: iz korena, stabla, lista, cveta ili semena, parnom destilacijom ili ekstrakcijom rastvaračima (Greathead, 2003.). Biljke sintetišu etarska ulja u antibakterijske, antifungalne i antivirusne svrhe, za odvracanje nekih insekata i životinja biljojeda, ali i za privlačenje oprašivača.

Etarska ulja se danas koriste kao multifunkcionalni dodaci hrani za životinje, uključujući efekte na performanse rasta, digestivni sistem, rast patogenih bakterija i oksidaciju lipida. Svojim komponentama, ona omogućavaju i doprinose očuvanju namirnica animalnog porekla. Etarska ulja imaju širok spektar antimikrobne i antioksidativne aktivnosti (Gallegos-Flores i sar., 2019) što se može iskoristiti za modifikaciju ili smanjenje populacije bakterija koje proizvode metan u rumenu preživara. Pretpostavlja se da većina etarskih ulja ispoljava svoje antimikrobne aktivnosti u interakciji sa različitim procesima koji se odigravaju u ćelijskoj membrani bakterija, kao što su transport elektrona, translokacija proteina, fosforilacija i druge enzimski zavisne reakcije (Dorman i Deans, 2000). Svojom malom molekulskom težinom ona lako prodiru u unutrašnjost gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (Dorman i Deans, 2000). Izazivaju povećanu permeabilnost membrane, „curenje“ citoplazmatskih komponenti, ometaju rast i aktivnosti bakterija što utiče na smanjenje fermentacije u buragu (Szumacher-Strabel i Cieślak, 2010; Jouany i Morgavi, 2007).

Etarska ulja takođe mogu pozitivno uticati i na metabolizam proteina i smanjiti nivo amonijaka u buragu inhibiranjem deaminacije kroz selektivno ograničavanje aktivnosti ruminalnih bakterija koje proizvode perhiperamonijak (HAP) (McIntosh i sar., 2003). Smanjena populacija HAP bakterija dovela bi do smanjenja brzine proizvodnje amonijaka u buragu, što može biti korisno za ishranu povećanjem efikasnosti korišćenja proteina.

UTICAJ ETARSKIH ULJA NA MIKROBNU FERMENTACIJU U BURAGU

Ispitivanje različitih aromatičnih biljaka i njihovih glavnih komponenti, etarskih ulja, na proces proizvodnje metana u buragu preživara je danas izuzetno popularno. Pretragom literature koja se odnosi na metanogenezu buraga objavljeno je između 1960. i 2018. godine skoro 9 000 radova (Scopus ključne reči: metan ili metanogeneza, krava ili goveda, ovce ili jagnje, burag) (Beauchemin i sar., 2020). Poslednjih godina, trend istraživanja efekata etarskih ulja na mikroorganizme buraga se nastavlja. Jedna od najsveobuhvatnijih studija ove vrste je projekat EU „Rumen-ap“ koji je obuhvatio istraživanje 500 biljaka i biljnih ekstrakata i njihov uticaj na *in vitro* fermentaciju. Izdvojeno je najmanje 25 biljaka koje imaju potencijalnu vrednost kao aditivi za hranu (Beauchemin i sar., 2020). Utvrđeno je da brojna etarska ulja smanjuju proizvodnju metana *in vitro*, ali je za vrlo malo jedinjenja dokazano da imaju antimetanogene efekte *in vivo* (Cobellis i sar., 2016.)

Tekippe i saradnici (2012) su analizirali ukupno 102 biljke i ustanovili da etarska ulja kopra (*Anethum graveolens*), lavande (*Lavandula latifolia*) i bosiljka (*Ocimum basilicum*), kao i ceo biljni uzorak origana (*Origanum vulgare*) imaju potencijal za smanjenje proizvodnje metana *in vitro*.

Patra i Yu (2012) su ispitivali efekat 5 etarskih ulja: karanfilića (*Eugenia sp.*), eukaliptusa (*Eucalyptus globulus*), belog luka (*Allium sativum*), španskog origana

(*Thymus capitatus*) i nane (*Mentha piperita*) i zaključili da svih pet vrsta ulja sa povećanom dozom od 1 g/L značajno smanjuje proizvodnju metana sa smanjenjem od 34,4 (karanfilić), 17,6 (eukaliptus), 42,3 (beli luk), 87 (španski origano) i 25,7 procenata (nana).

Günel i saradnici (2017) su ispitivali efekat 4 različita etarska ulja na fermentaciju u buragu: ulje karanfilića (*Eugenia caryophyllata*), ulje timijana (*Thymus vulgaris*), ulje citronele (*Cymbopogon winterianus*) i ulje anisa (*Illicium verum*). Rezultati su ukazali da je ulje anisa, karanfilića i timijana smanjilo proizvodnju metana za 32, 37 i 76 procenata, tim redom, dok ulje citronele nije imalo uticaja na taj proces. Doze od 250 i 500 mg etarskog ulja po litri tečnosti iz buraga rezultiralo je i značajnim smanjenjem ukupne proizvodnje ostalih gasova i ugljen-dioksida.

Rofiq i saradnici (2021) su ispitivali uticaj 6 etarskih ulja: belog luka (*Allium sativum*), timijana (*Thymus vulgaris*), karanfilića (*Eugenia sp.*), kore pomorandže (*Citrus sp.*), nane (*Mentha piperita*) i cimeta (*Cinnamomum sp.*) na *in vitro* redukciju metana u buragu sa dozama od 100, 200 i 300 ppm. Rezultati su dokazali da sva etarska ulja ovih biljaka u dozama od 300 ppm pozitivno utiču na proizvodnju gasova u buragu i smanjenje stvaranja metana.

Delgadillo-Ruiz i saradnici (2021) su ispitivali efekat 6 etarskih ulja: cimeta (*Cinnamomum zeylanicum*), karanfilića (*Syzygium aromaticum*), eukaliptusa (*Eucalyptus sp.*), nane (*Mentha spicata*), origana (*Origanum vulgare*) i ruzmarina (*Salvia rosmarinus*), sa ciljem da se poveća fermentacija u rumenu i proizvodnja isparljivih masnih kiselina smanjujući stvaranje metana. Najbolji efekat je imalo etarsko ulje ruzmarina kao i terpenoidna jedinjenja timol, linalol i limonen koja su sastojci etarskih ulja origana i karanfilića.

Ercument Onel i saradnici (2021) su analizirali efekte etarskih ulja dobijenih iz lista lovora (*Laurus nobilis*), mirte (*Myrtus communis*), artemizije (*Artemisia annua*), lavande (*Lavandula stoechas*) i zaatara (*Thymbra spicata*) na parametre fermentacije u buragu. Dodavanje lavande, artemizije, mirte i lovora smanjilo je ukupno formiranje gasova i emisiju metana. Aktivni sastojci ovih etarskih ulja imaju regulatorni efekat na fermentaciju u buragu. Artemizija i lavanda su smanjile proizvodnju gasa za 54 procenta.

El Tawaba i saradnici (2022) su ispitivali efekat dodatka listova majorana ishrani (*Origanum majorana*) i bosiljka (*Ocimum basilicum*) na proizvodnju gasa, fermentaciju u rumenu i koncentraciju amonijačnog azota. Zaključili su da dodavanje listova majorana ili bosiljka u ishranu ima pozitivan uticaj na ukupnu proizvodnju gasova, ali je bila smanjena koncentracija amonijačnog azota i metana.

Molho-Ortiz i saradnici (2022) su u svojim istraživanjima želeli da procene *in vitro* fermentaciju buraga i proizvodnju metana pod uticajem etarskih ulja i vodenih ekstrakata biljaka. Istraživan je efekat belog luka (*Allium sativum*), cimeta (*Cinnamomum sp.*), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) i eukaliptusa (*Eucalyptus sp.*). Dodaci etarskih ulja belog luka, cimeta i ruzmarina su smanjili masovnost mikroorganizama, proizvodnju metana i ukupnu proizvodnju gasova. Etarska

ulja belog luka i cimeta su efikasno smanjila emisiju metana, u proseku za 64,7 procenata, ali su smanjili i *in vitro* svarljivost suve materije. Vodeni ekstrakti svih vrsta ulja su ispoljili zanemarljive efekte na fermentaciju u rumenu, što se može objasniti slabom vodenom ekstrakcijom antimetanogenih faktora.

Rossi i saradnici (2022) su ispitivali efikasnost mešavine etarskih ulja, bioflavonoida i tanina iz biljaka na emisiju metana *in vitro* kod mlečnih krava. Korišćena su etarska ulja iz pupoljka karanfilića (*Syzygium aromaticum*), semena korijandera (*Coriandrum sativum*) i geranijuma (*Pelargonium cucullatum*), bioflavonoidi iz maslina (*Olea europea*) i tanini iz kestena (*Castanea sativa*). Rezultati su dokazali da je ova mešavina smanjila proizvodnju metana u *in vitro* studiji za 22 procenta, a poboljšana je proizvodnja mleka, svarljivost ishrane i stopa konverzije hrane kod krava.

Benetel i saradnici (2022) su istražili uticaj etarskih ulja većeg broja biljaka: anisa (*Illicium verum*), citronele (*Cymbopogon winterianus*), karanfilića (*Eugenia caryophyllus*), dve vrste eukaliptusa (*Eucalyptus staigeriana* i *Eucalyptus globulus*), kamfora (*Cinnamomum camphora*), đumbira (*Zingiber officinale*), čajevca (*Melaleuca alternifolia*), origana (*Origanum vulgare*) i timijana (*Thymus vulgaris*). Ustanovili su da su etarska ulja citronele i kamfora smanjila ukupnu proizvodnju gasova za 25, a etarska ulja origana i timijana čak za 75 procenta. To se objašnjava prisustvom karvakrola i timola koji imaju visoku antimikrobnu aktivnost, a imaju i izuzetno sinergistično dejstvo. Autori su zaključili da etarska ulja origana i timijana najviše smanjuju proizvodnju metana u odnosu na druga etarska ulja ispitivana u ovoj studiji.

Ovde su prikazani samo neki od mnogobrojnih rezultata o efektima etarskih ulja na produkciju gasova u buragu preživara. Dobro dokumentovana antimikrobna aktivnost etarskih ulja je podstakla brojne istraživače da ispitaju njihov potencijal da utiču na fermentaciju u rumenu i poboljšaju efikasnost ishrane, iskorišćenje hranljivih materija i smanje emisiju gasova kod preživara. Raspon dostupnih etarskih ulja i njihovih komponenti je širok i mnoga od njih tek treba da se ispitaju. Takođe, većina studija je sprovedena *in vitro* i potrebna su dodatna istraživanja da bi se utvrdili efekti *in vivo*, način delovanja različitih etarskih ulja i njihovih komponenti i koncentracije koje povoljno modifikuju fermentaciju u rumenu.

ZAKLJUČAK

Objavljen je veliki broj naučnih radova i izvedeno je mnogo eksperimenata koji su imali za cilj da ispitaju efekte različitih etarskih ulja biljaka u rumenu preživara. Za istraživače je veliki izazov da pronađu etarsko ulje ili njegove komponente koje povoljno menjaju fermentaciju u buragu, a pri tome ne smanjuju iskoristivost hrane. Opšti zaključak je da se etarska ulja mogu koristiti kao biljni aditivi sa ciljem poboljšanja korišćenja hranljivih materija i postizanja boljih performansi kod životinja, ali i sa ciljem promene fermentacije u buragu. Svojim

antimikrobnim svojstvima protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, etarska ulja su deo efikasne strategije za smanjenje stvaranja metana u buragu preživara, a samim tim i umanjenje efekta staklene bašte što je od velikog značaja za zaštitu životne sredine.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2):446-475.
2. Beauchemin K.A., Ungerfeld E.M., Eckard R.J., Wang M. 2020. Review: fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal*, 14:2-16.
3. Benchaar C., Greathead H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166:338-355.
4. Benetel G., Santos Silva T, Fagundes G., Welter K, Melo F, Lobo A. et al. 2022. Essential Oils as In Vitro Ruminant Fermentation Manipulators to Mitigate Methane Emission by Beef Cattle Grazing Tropical Grasses. *Molecules*, 27, 2227.
5. Cantrell C.L., Varga G.A. 2012. Effects of plants and essential oils on ruminal in vitro batchculture methane production and fermentation. *Can. J. Anim. Sci.*, 92:395-408.
6. Cobellis G., Trabalza-Marinucci M., Yu Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: a review. *Science of the Total Environment*, 545-546: 556-68.
7. Cruz MC., Diaz-Gómez M., Sook-Oh M. 2017. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: A review. *Pharmaceutical Biology*, 55(1):1992-8.
8. Delgado-Ruiz L., Bañuelos-Valenzuela R., Gallegos-Flores P, Echavarría-Cháirez F, Meza-López C., Gaytán-Saldaña N. 2021. Modification of ruminal fermentation *in vitro* for methane mitigation by adding essential oils from plants and terpenoid compounds. *Abanico veterinario*, 11: on line version.
9. Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88:308-16.
10. El Tawaba A., Kholif A., El Bordenyb N., Elsayed H., Selim N. 2022. Ruminant Fermentation, Degradability and Gas Production Response to Supplementing Diets with Marjoram or Basil Leaves In vitro. *Egypt. J. Chem.*, 65(5):263-9.
11. Ercument Önel S., Aksu T, Kalamak A., Kaya D., Aksu D., Sakin F., Türkmen M. 2021. Effect of Some Essential Oils on in vitro Ruminant Fermentation of Alfalfa Hay. *Progress in Nutrition*, 23: on line version.
12. FAO. 2016. El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2016: Cambio climático, agricultura y seguridad alimentaria. 49-75.
13. Gallegos-Flores P.I., Bañuelos-Valenzuela R., Delgado-Ruiz L., Meza-López C., Echavarría-Cháirez F. 2019. Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(2):241-8.
14. Greathead, H. 2003. Plant and plant extract for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.*, 62:279- 290.
15. Günal M., Pinski B., AbuGhazaleh A. 2017. Evaluating the effects of essential oils on methane production and fermentation under *in vitro* conditions. *Italian journal of animal science*, 16:500-6.
16. IPCC ed. Introduction. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on

Climate Change. Cambridge; New York, NY: Cambridge University Press. **17.** Jouany JP, Morgavi DP. 2007. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*, 1:1443– 66. **18.** Kurniawati A., Yusiati LM., Widodo W., Artama WT. 2020. Study of Local Herb Potency as Rumen Modifier: Red Ginger (*Zingiber officinale* Var. Rubrum) Addition Effect on *In Vitro* Ruminant Nutrient Digestibility. *Animal Production*, 21(1):30-37. **19.** Ku-Vera JC., Jiménez-Ocampo R., Valencia-Salazar SS., Montoya-Flores MD., Molina-Botero IC., Arango J. et al., 2020. Role of Secondary Plant Metabolites on Enteric Methane Mitigation in Ruminants. *Front. Vet. Sci.*, 7:584. **20.** McIntosh F, Williams P, Losa R., Wallace R.J., Beever, D.A., Newbold C.J. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 5011–4. **21.** Molho-Ortiz A., Romero-Pérez A., Ramírez-Bribiesca E., Márquez-Motaa C., Castrejón-Pineda F., Coronaa L. 2022. Effect of essential oils and aqueous extracts of plants on *in vitro* rumen fermentation and methane production. *J Anim Behav Biometeorol* 10: 2110 on line version. **22.** Murray RM., Bryant AM., Leng RA. 1976. Rates of production methane in the rumen and large intestine of sheep. *Brit J Nutr.*, 36:1-14. **23.** Patra A., Park T., Yu Z. 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J Anim Sci Biotechnol.*, 8:13. **24.** Patra A., Yu Z. 2012. Effects of Essential Oils on Methane Production and Fermentation by, and Abundance and Diversity of, Rumen Microbial Populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (12): 4271-4280. **25.** Rofiq M., Negara W., Martono S., Gopar R., Boga M. 2021. Potential effect of some essential oils on rumen methane reduction and digestibility by *In Vitro* incubation technique. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 905 012138. **26.** Rossi C., Grossi S., Dell'Anno M., Compiani R., Rossi L. 2022. Effect of a Blend of Essential Oils, Bioflavonoids and Tannin on *In Vitro* Methane Production and *In Vivo* Production Efficiency in Dairy Cows. *Animals*, 12:(6):728. **27.** Szumacher-Strabel M., Cieślak A. 2010. Potential of phytofactors to mitigate rumen ammonia and methane production. *J Anim Feed Sci.*, 19:319– 37. **28.** Tekippe J., Hristov A., Heyler K., Zheljzkov V., Ferreira, J. 2012. Effects of plants and essential oils on ruminal *in vitro* batch culture methane production and fermentation. *Canadian Journal of Animal Science.* 92(3):395-408. **29.** Van Soest PJ. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ithaca, NY: Cornell University Press. **30.** Wang J., Liu M., Wu Y., Wang L., Liu J., Jiang L., Yu Z. 2016. Medicinal herbs as a potential strategy to decrease methane production by rumen microbiota: a systematic evaluation with a focus on *Perilla frutescens* seed extract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22):9757-9771.

THE USE OF ESSENTIAL OILS IN NUTRITION OF RUMINANTS WITH THE PURPOSE OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

**Svetlana Grdović, Radmila Marković, Stamen Radulović,
Dejan Perić, Dragan Šefer**

Summary

In recent years, there has been a great interest in the world for changing the emission of methane produced by the process of methanogenesis in the rumen of ruminants.

Therefore, feed additives that can modify fermentation in the rumen are of great interest. Antibiotics, as additives to animal feed, have proven to be very effective in reducing methane production, but the appearance of resistant microorganisms and residues in animal products has led to their ban. Therefore, there is a great interest in the research of various secondary metabolites of plants, such as essential oils, tannins, saponins and flavonoids, which can be used as natural modifiers of rumen microorganisms. Essential oils are recognized as safe additives in animal feed with the aim of reducing methane emissions, as indicated by a large number of announcements and scientific works. Here we will present some research.

Key words: *essential oils, environment, methanogenesis, ruminants*

MODULACIJOM METABOLIZMA KRAVA DO EKOLOŠKI PRIHVATLJIVE PROIZVODNJE NA GOVEDARSKIM FARMAMA

*Danijela Kirovski, Sreten Nedić, Ljubomir Jovanović, Radiša Prodanović,
Milica Stojković, Dušan Bošnjaković, Ivan Vujanac*

Kratak sadržaj

Poljoprivredni sektor predstavlja najznačajniji pojedinačni antropogeni izvor metana sa farmama visokomlečnih krava koje daju najveći doprinos u emisiji metana. Metan je drugi po značaju gas sa efektom staklene bašte, odmah posle ugljen-dioksida, koji se fiziološki stvara u buragu preživala. Naime, burag predstavlja sredinu koju nastanjuje zajednica mikroorganizama (mikrobiom), koja uključuje različite vrste anaerobnih bakterija, arheja, protozoa, gljivica i faga. Glavna uloga ovih mikroorganizama je razlaganje sastojaka biljne hrane koji ne mogu biti razloženi enzimskim sistemom domaćina, što rezultira oslobađanjem krajnjih proizvoda fermentacije – isparljivih masnih kiselina. Ovi proizvodi fermentacije se, nakon resorpcije iz digestivnog trakta, koriste za sintezu kompleksnih jedinjenja u različitim tkivima (mišićima, mlečnoj žlezdi i drugim), uključujući proteine, masti i druga jedinjenja, koji proizvode animalnog porekla čine nutritivno vrednim za ljude. Međutim, procesi fermentacije u buragu su praćeni i oslobađanjem ugljen-dioksida i vodonika, koje metanogene arheje koriste za sintezu metana. Njegovo prekomerno oslobađanje u spoljašnju sredinu doprinosi efektu staklene bašte i globalnom zagrevanju. Dodatno, sinteza metana u buragu predstavlja metabolički put kojim se gubi 2 – 12 procenata energije hrane. Zbog toga se interes za smanjenje njegove emisije ne nalazi samo u zaštiti životne sredine, već i u potencijalnom povećanju produktivnosti životinja, koja nosi ekonomsku korist za farmere koji su jedna od ključnih karika u planiranju mera za smanjenje emisije metana sa govedarskih farmi. Različiti nutritivni dodaci mogu modulisati metaboličke procese i time doprineti smanjenju emisije metana od strane mlečnih krava. U tom pogledu, najviše se izučavaju tanini i drugi biljni ekstrakti, kao što su uljani ekstrakt belog luka i ekstrakti različitih morskih algi, uključujući crvene i braon morske alge.

Ključne reči: enterična fermentacija, metan, metanogene arheje, modulacija metabolizma, nutritivni dodaci

¹Dr sci. vet. med. Danijela Kirovski, redovni profesor; dr sci. vet. med. Sreten Nedić, asistent sa doktoratom; dr sci. vet. med. Ljubomir Jovanović, docent; dr sci. vet. med. Radiša Prodanović, docent; dr sci. vet. med. Milica Stojković, docent; dr vet. Dušan Bošnjaković, asistent; dr sci. vet. med. Ivan Vujanac, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: dani@vet.bg.ac.rs

UVOD

Metan (CH_4) pripada grupi gasova sa efektom staklene bašte (engl. *greenhouse gasses* – GHG), a koji su prisutni u atmosferi. To su gasovi čiji molekuli zadržavaju toplotu odbijenu sa Zemljine površine, a zatim je opet preusmeravaju nazad ka Zemlji. Zahvaljujući ovom fenomenu, klima na Zemlji je pogodna za život. Međutim, čovek je svojim aktivnostima (antropogeni efekat) doveo do povećanog oslobađanja GHG, odnosno povećanog zadržavanja toplote u atmosferi, što je dovelo do globalnog zagrevanja planete. Pored CH_4 , koji sa 15 procenata doprinosi ukupnoj emisiji gasova, u GHG spadaju i ugljen dioksid (CO_2), 55 procenata, azot suboksid (N_2O), 6 procenata, kao i hlorofluorougljovodonik (HFC) i perfluorougljenik (PFC), čiji je zajednički doprinos oko 25 procenata (Jose i sar., 2016). Iako je CH_4 drugi po zastupljenosti GHG u atmosferi, odmah posle CO_2 , njegov potencijal zagrevanja planete je značajno veći nego potencijal koji ima CO_2 . Naime, s obzirom da svi GHG nemaju istu sposobnost da apsorbuju toplotu u atmosferi, uveden je pojam globalnog potencijala zagrevanja (engl. *Global Warming Potential* – GWP), a koji predstavlja odnos toplote apsorbovane od strane jedinične mase nekog gasa u odnosu na toplotu apsorbovanu od strane jedinične mase CO_2 u toku određenog perioda. GWP se izražava kao CO_2 ekvivalent ($\text{CO}_2\text{-eq}$) i prikazuje za period od 100 (GWP_{100}) ili 20 godina (GWP_{20}). Tako je GWP_{100} za CH_4 28, a to znači da jedan molekul CH_4 ima isti efekat GHG kao 28 molekula CO_2 , računato za period od 100 godina, dok je GWP_{20} za CH_4 84 (Myhre i sar., 2013).

Metan se, kada su u pitanju prirodni izvori, najviše emituje sa močvarnih područja, a kada su u pitanju antropogeni izvori, sa stočarskih farmi. U odnosu na druge grane stočarstva, govedarska proizvodnja najviše doprinosi efektu staklene bašte. Unutar govedarske proizvodnje, najveći procenat GHG se proizvodi na farmama visokomlečnih krava. Aktivnošću buraga emituje se CH_4 u procesu koji se naziva *enterična fermentacija*, a koja sa 90 do 95 procenata doprinosi emisiji CH_4 . Ovaj enterični CH_4 se oslobađa podrigivanjem u slučaju da se stvara u buragu (gde se odigrava preko 95 procenata enterične fermentacije), odnosno flatulacijom u slučaju kada se stvara fermentacijom u debelom crevu (gde se odigrava manje od 5 procenata enterične fermentacije). Preostalih 5 do 10 procenata CH_4 koji potiču od životinje se oslobađa iz stajnjaka tokom njegove obrade ili skladištenja. Na osnovu očekivanih promena u stočarskoj proizvodnji, ali i navikama potrošača, očekuje se da će emisija CH_4 enteričnom fermentacijom, u poređenju sa 1995. godinom, do 2055. godine porasti za 70 procenata (Reisinger i sar., 2021).

METABOLIČKI PUTEVI UKLJUČENI U PROIZVODNJU METANA

Enterična fermentacija je dominantni izvor CH_4 u organizmu krava i ona podrazumeva biohemijske procese u digestivnom traktu preživara u kojima dolazi do proizvodnje CH_4 . Enterična fermentacija se najvećem delom odigrava u buragu (oko 95 procenata) pri čemu se tada stvoreni CH_4 odstranjuje podrigivanjem.

U značajno manjoj meri (oko 5 procenata) CH₄ se stvara u debelom crevu odakle se odstranjuje flatulacijom (Reisinger i sar., 2021).

Burag je kompleksan ekosistem koji nastanjuju brojne vrste mikroorganizama u koje spadaju pretežno anaerobne bakterije (uz neznatno učešće fakultativno anaerobnih i aerobnih bakterija), protozoe, gljivice, metanogene arheje i fagi. Ovi mikroorganizmi razgrađuju biljni materijal koji se ne može razgraditi enzimskim sistemom domaćina, obezbeđujući energiju za domaćina, ali i polazna jedinjenja za sintezu organskih molekula koji ulaze u sastav mišića i mleka, nutritivno vrednih proizvoda u ishrani ljudi. U biljnoj hrani preživara zastupljeni su voda i suva materija, koju čine neorganski elementi i organski sastojci (ugljeni hidrati, masti, azotne i različite druge materije kao što su lignin, organske kiseline, materije koje doprinose boji, ukusu i mirisu, toksini ili inhibitori različitih tipova, biljni i životinjski hormoni). Ugljeni hidrati čine do 75 procenata suve materije biljaka i predstavljaju osnovni izvor energije za preživare. Oni su takođe glavni prekursor u sintezi laktoze mleka ali i sinteze masti. Ugljeni hidrati, prisutni u biljkama, se dele na strukturne (celuloza, hemiceluloza i pektin) i nestrukturne (rastvorljivi šećeri, skrob i fruktani). Lignin, iako ne pripada ugljenim hidratima, je strukturno povezan sa njima i enzimski je nerazgradiva komponenta biljaka. Osim ugljenih hidrata, značajan sastojak biljne hrane su i azotne materije, koje se dele na proteinske i neproteinske.

Zastupljenost pojedinih mikroorganizama, a pre svega bakterija u buragu, zavisi pored ostalog, od vrste hrane koju jedinka unosi. Bakterije razlažu složene ugljene hidrate do krajnjih proizvoda fermentacije, pri čemu primarne bakterije razlažu složene ugljene hidrate do prostih molekula, koje zatim preuzimaju sekundarne bakterije i konvertuju ih do krajnjih proizvoda fermentacije. Ukoliko se preživari hrane pretežno kabastom hranom, prisutne su pre svega celulolitičke bakterijske vrste iz rodova *Fibrobacter*, *Bacteroides* i *Ruminococcus* koje razlažu celulozu do celobioze i dalje do glukoze ili aktivnošću fosforilaze do glukozo-1-fosfata. Dodatno, bakterijske vrste *Butyrivibrio fibrisolvens* i *Bacteroides ruminicolanos* pripadaju grupi hemicelulolitičkih bakterija koje razlažu hemicelulozu do pentoza. Ukoliko je ishrana zasnovana na koncentratima, u buragu dominiraju amilolitičke bakterijske vrste iz rodova *Prevotella* i *Succinivibrio*, koje primarno razlažu skrob do maltoze i izomaltoze a zatim do glukoze ili glukozo-1-fosfata. *Streptococcus bovis* je amilolitička bakterija koja je značajno zastupljena u buragu krava kod kojih se koristi koncentrovana hrana.

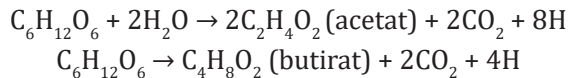
Prosti ugljeni hidrati, koji se stvaraju u prvoj fazi varenja hrane u buragu se retko detektuju u tečnosti buraga zbog toga što se odmah preuzimaju i metabolišu od strane sekundarnih mikroorganizama.

Glavni međuproizvod metabolizma u buragu je piruvat. On se stvara iz heksoza u Embden-Meyerhof-Parnasov-om putu. U ovom metaboličkom putu se glukoza fosforiliše a zatim pretvara u dva trioza - fosfata koji se zatim kovertuju u dva piruvata. Pri tome se oslobađaju dva molekula ATP-a i redukuju dva NAD⁺ u dva NADH. Pored heksoza, u buragu se razlaganjem pentoza, koje primarno

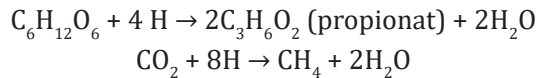
potiču iz hemiceluloze, stvaraju prvo dva heksozo - fosfata i jedan trioza - fosfat, a zatim se u Embden-Meyerhof-Parnasov-om metaboličkom putu stvara piruvat. Računato na količinu ugljenikovih atoma, metabolizam heksoza i pentoza obezbeđuje istu količinu ATP-a i NADH. Alternativno, pentoze se mogu metabolisati do piruvata uz proizvodnju acetata, oslobađajući dva molekula ATP-a.

Počevši od piruvata, metabolizam ugljenih hidrata u buragu divergira. Iz njih se stvaraju krajnji fermentacioni proizvodi metabolizma a to su isparljive masne kiseline, vodonik i ugljen dioksid. Od isparljivih masnih kiselina najviše su zastupljene propionska, sirćetna i buterna kiselina, pri čemu se propionska kiselina može formirati iz piruvata kroz više različitih metaboličkih puteva. Metabolički put preko laktata i akrilata dominira kada je ishrana preživara bazirana na koncentratima a put preko sukcinata je uključen kada je ishrana bazirana na kabastim hranivima. Pri ishrani koncentratom, laktat proizveden u prvom metaboličkom putu može da se nakuplja u buragu i dovede do nastanka acidoze.

Da bi se u buragu održali metabolički putevi pretvaranja heksoza u piruvat, neophodno je da se stvoreni NADH ponovo oksidiše u NAD^+ . Ova reakcija oksidacije se ostvaruje oslobađanjem H_2 . Glavni proizvođači H_2 su mikroorganizmi koji proizvode sirćetnu, ali i buternu kiselinu u fermentacionom putu:



Ako se H_2 akumulira unutar buraga, oksidacija NADH može biti termodinamički neizvodljiva. Zbog toga su neophodne reakcije uklanjanja H_2 , kao što je stvaranje propionata ali i metana:



Iako je H_2 jedan od krajnjih proizvoda fermentacije od strane protozoa, kvasca i bakterija, on se fiziološki ne nakuplja u buragu, već se koristi od strane drugih bakterija, pre svega metanogena. Molarni udeo isparljivih masnih kiselina utiče na količinu oslobođenog metana što su definisali Moss i saradnici (2000): $\text{CH}_4 = 0,45 \text{ C}_2 \text{ (acetat)} - 0,275 \text{ C}_3 \text{ (propionat)} + 0,40 \text{ C}_4 \text{ (butirat)}$. Iz formule je jasno da proizvodnja acetata i butirata dovodi do produkcije metana, dok je formiranje propionata kompetitivni put u uklanjanju H_2 iz buraga (Lyu i sar., 2018).

METANOGENI – MIKROORGANIZMI UKLJUČENI U PROIZVODNJU METANA U BURAGU

Metanogeni predstavljaju jedinstvenu grupu mikroorganizama za koju je, na osnovu analize nukleotidne sekvence za 16S ribozomalnu RNK, utvrđeno da su se, u pogledu evolutivnog razvoja, rano odvojili od svih drugih, do sada proučavanih, oblika života. To je rezultiralo njihovim svrstavanjem u poseban domen – *Archea* (ranije *Archeobacteria*), koji pripada carstvu *Euryarcheota*. Ovi mikro-

organizmi imaju ćelijski omotač specifične strukture u kome se ne nalazi mura-minska kiselina, već izoprenoidi koji su etarski vezani za glicerol ili druge ugljene hidrate u omotaču. Upravo ova specifičnost metanogenih arheja je iskorišćena za definisanje hemijskih biomarkera, poput dialkil glicerol etera (DAGE) i glicerol dialkil glicerol tetraetera (GDGT) koji se, kao strukturni elementi ćelijskog zida, mogu koristiti za kvantifikaciju metanogena u medijumima koji se teško pripremaju ili su nepodesni za qPCR (engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*) analize. Dodatno, podatak da su isključivo kod metanogenih arheja prisutna tri koenzima, koji uključuju *koenzim F₄₂₀*, *faktor B* i *metil koenzim M*, na poseban način ističe ovu grupu mikroorganizama u odnosu na sve ostale i upravo su ovi koenzimi zaslužni za njihovu sposobnost za sintezu metana (metanogenezu), koja im obezbeđuje energiju za rast. Poznato je da metanogene arheje mogu koristiti veći broj supstrata u procesu metanogeneze, uključujući H₂, CO₂, formiat, metanol, metilamin, dimetil sulfid i određene alkohole, pri čemu korišćenje H₂, CO₂ i formiata predstavlja deo tzv. *hidrogenotrofnog* puta metanogeneze, dok je korišćenje preostalih supstrata deo *metilotrofnog* puta metanogeneze (Tapio i sar., 2017). Dodatno, Liu i Whitman (2008) su detaljno opisali treći, *acetiklastični* put metanogeneze, koji podrazumeva sintezu metana direktno od acetata, ali je ovaj put metanogeneze ograničen samo na članove reda *Methanosarcinales*.

Diverzitet metanogenih arheja u buragu preživara je ograničen na četiri reda, koji obuhvataju više od 32 rodova i 112 vrsta mikroorganizama, koji su u buragu najviše rasprostranjeni u tečnoj frakciji sadržaja, mada se nalaze i vezani za čestice biljnog materijala, površinu protozoa ili površinu epitela buraga, kao i u endosimbiotskom odnosu sa protozoama (Tapio i sar., 2017). Pri tome se, najveći broj metanogenih arheja u buragu (92,3 procenta) može svrstati u jedan od tri roda/grupe, uključujući *Methanobrevibacter* spp. (61,6 procenta), *Methanomicrobium* spp. (14,9 procenata) i tzv. RCC (15,8 procenata; engl. *Rumen Cluster C*) grupu nekultivišućih metanogenih arheja (Janssen i Kirs, 2008). Pri tome je interesantno istaći da su vrste unutar *Methanobrevibacter* spp., glavnog roda metanogenih arheja u buragu, raspoređene u dve grupe: *Methanobrevibacter* SGMT (sa vrstama *Mbb. smithii*, *Mbb. gottschalki*, *Mbb. millerae* i *Mbb. thaueri*) i *Methanobrevibacter* RO (sa vrstama *Mbb. ruminantium* i *Mbb. olleyae*), koje se razlikuju u kapacitetu za metanogenezu. Navedene razlike se objašnjavaju prisustvom dva izoenzimska oblika *metil koenzim M reduktaze* (*McrI* i *McrII*) kod SGMT grupe, sa jedne strane, i prisustvom samo jednog izoenzimskog oblika ovog enzima (*McrII*) kod RO grupe, sa druge strane. Ovo uslovljava i manji kapacitet RO grupe za iskorišćavanje H⁺ u procesu metanogeneze (Danielsson i sar., 2012). Uzimajući u obzir ove podatke, može se izvesti zaključak da istraživanja mikrobioma buraga, u svetlu emisije metana, ne bi trebalo svoditi na kvantifikaciju metanogenih arheja kao čitave populacije, već da bi trebalo ići u kvantifikaciju pojedinačnih rodova, grupa ili vrsta metanogenih arheja. Na tom nivou se najpre mogu naći odgovori na pitanja vezana za nivo emisije metana od strane krava.

PREDIKCIJA EMISIJE METANA U BURAGU

U cilju adekvantne kontrole emisije CH_4 enteričnom fermentacijom, potrebno je utvrditi pouzdan i lako primenljiv model za predikciju emisije metana. Do sada je nekoliko studija dovelo u vezu pojedinačne masne kiseline mleka sa emisijom CH_4 od strane mlečnih krava (Mohammed i sar., 2011; van Lingen i sar., 2014; Rico i sar., 2016), pri čemu se naučna zasnovanost ovih studija u potpunosti oslanja na specifičnosti metabolizma preživara. Naime, poznato je da zasićene, kratkolančane i srednjelančane masne kiseline (engl. *Short and Medium-Chain Fatty Acids* – SMCFA) mleka nastaju skoro isključivo *de novo* sintezom u mlečnoj žlezdi iz acetata i β -hidroksibutirata, koji potiču iz buraga (Bernard i sar., 2008). Ukoliko se tome doda podatak da oslobađanje acetata i butirata u buragu pozitivno korelira sa produkcijom i emisijom CH_4 , moguće je pretpostaviti i pozitivnu korelaciju između emisije CH_4 i sadržaja zasićenih, kratkolančanih i dugolančanih masnih kiselina u mleku krava (Ellis i sar., 2008; Chilliard i sar., 2009). Sa druge strane, masne kiseline sa neparnim brojem C-atoma i masne kiseline razgranatog lanca (engl. *Odd- and Branched-Chain Fatty Acids*; OBCFA) u mleku krava se takođe mogu koristiti za predikciju emisije CH_4 (Fievez i sar., 2012). U tom pogledu, poznato je da propionat, koji nastaje u buragu i predstavlja supstrat za *de novo* sintezu C15:0 i C17:0 masnih kiselina u mlečnoj žlezdi, negativno korelira sa emisijom metana i zbog toga je bilo opravdano postaviti hipotezu da je odnos između zastupljenosti C15:0 i C17:0 masnih kiselina u mleku i emisije CH_4 takođe negativan (Ellis i sar., 2008). Slično tome, van Lingen i sar. (2014) ističu da veći sadržaj nezasićenih masnih kiselina (engl. *Unsaturated Fatty Acids* – UFA) u ishrani negativno korelira sa emisijom CH_4 , što se objašnjava oslobađanjem metaboličkih proizvoda koji nastaju biohidrogenizacijom nezasićenih masnih kiselina u buragu, uključujući različite C18:1 i C18:2 izomere (Patra, 2013). Sledstveno tome, uzimajući u obzir da pojedine nezasićene masne kiseline mleka direktno potiču iz nezasićenih masnih kiselina hrane, ali i proizvoda koji nastaju njihovom biohidrogenizacijom u buragu, može se pretpostaviti negativna korelacija između sadržaja dugolančanih nezasićenih masnih kiselina u mleku i emisije CH_4 od strane mlečnih krava (van Lingen i sar., 2014).

Interesantno je navesti i da se primenom nutritivnih strategija, koje podrazumevaju formulisanje obroka sa niskim sadržajem vlaknastih i visokim sadržajem koncentrovanih hraniva, može očekivati povećano oslobađanje proizvoda biohidrogenizacije masnih kiselina što je, kao što je prethodno istaknuto, u negativnoj korelaciji sa emisijom CH_4 . Primena pomenutih nutritivnih strategija dovodi do snižavanja pH u buragu, što rezultira i promenama mikrobioma buraga. Ove promene se ogledaju u potiskivanju populacije mikroorganizama koji učestvuju u procesima biohidrogenizacije, zbog čega ovi procesi postaju nepotpuni i umesto da rezultiraju pretvaranjem nezasićenih u zasićene masne kiseline, prekidaju se na nivou nezasićenih *cis* ili *trans* izomera, kao što su C18:1 *cis*-11, i C18:1 *trans*-11 i mnogi drugi (Bauman i Griinari, 2003). Pri tome, stvaranje ovih izomera nezasićenih masnih kiselina negativno korelira sa emisijom metana, a

njihovo prisustvo u mleku opravdava njihovu upotrebu za predikciju emisije CH₄ kod mlečnih krava. Zanimljivo je napomenuti i da su prethodno pomenuti procesi, biohidrogenizacije masnih kiselina, u kompeticiji sa procesom metanogeneze, zbog toga što troše 3 procenta molekuskog vodonika (H₂) koji se oslobodi u buragu u procesima fermentacije (Bougouin i sar., 2019). Na kraju, neophodno je istaći i da snižavanje pH u buragu, kao rezultat primene nutritivnih strategija, usvoljava smanjenu aktivnost metanogena i smanjenu fermentaciju vlakana, dok se fermentacija skroba ne smanjuje. Time se favorizuje proizvodnja propionata, koju prati i smanjena raspoloživost H₂ za proizvodnju CH₄.

SUPLEMENTI U HRANI KAO POTENCIJALNI MODULATORI METABOLIZMA

Posednjih godina se sve više izučavaju suplemenati u ishrani krava koji bi omogućili jedinki da prevaziđe kritične periode proizvodno-reproduktivnog ciklusa, uz održavanje visoke proizvodnje a bez narušavanja svog zdravlja i dobrobiti. Uzimajući u obzir činjenicu da je jetra organ koji je najviše opterećen u metaboličkom prestrojavanju jedinke (Kirovski i Sladojević, 2017; Podpečan i sar., 2020), često se kod visokomlečnih krava u periodu tranzicije iz stanja graviditeta u stanje laktacije koriste suplementi koji štite jetru i održavaju jediku u energetskom balansu, kao što su propilen-glikol i holin (Ahmadzadeh-Gavahan i sar., 2021). Za prevenciju hipokalcemije kojoj su visokoproizvodne jedinke izložene na početku laktacije, zbog gubitka kalcijuma mlekom, koriste se zakiseljivači morkraće. Međutim, upotreba ovih suplemenata je često ekonomski neopravdana za farmera, pa se danas istraživanja vezana za upotrebu suplemenata u ishrani krava uglavnom usmeravaju na one koji potiču iz prirodnih izvora. To su, pre svega, tanini (Prodanović i sar., 2021), uljani ekstrakt belog luka (Meale i sar., 2014) i palmino ulje (Kirovski i sar., 2015) kao derivati biljaka, zatim derivati algi (Machado i sar., 2014) i mikroelementi inkorporisani u ćelije kvasaca kao što je hrom (Jovanović i sar., 2017; Pantelić i sar., 2018). Upravo je dokazano da pojedini od ovih suplemenata smanjuju emisiju gasova sa efektom staklene bašte, a pre svega metana. To je dokazano pri dodavanju tanina u obroke za krave. Tanini su biljni metaboliti, polifenoli rastvorljivi u vodi koji imaju afinitet vezivanja za proteine, aminokiseline, metalne jone i polisaharide, a takođe imaju i baktericidno dejstvo. S obzirom da deluju baktericidno na pojedine metanogene bakterije, oni mogu smanjiti enteričku proizvodnju CH₄ (Williams i sar., 2020). Dodatno, ekstrakt belog luka se može koristiti kao suplement kojim se postiže redukcija emisije CH₄ od strane mlečnih krava. Ovakav efekat ekstrakta belog luka se pripisuje organskim jedinjenjima sumpora među kojima se, kao kvantitativno i kvalitativno najznačajniji, ističe dialil disulfid, koji snažno inhibira enzimski sistem metanogenih arheja i suprimira populaciju protozoa u buragu, što je praćeno smanjenjem emisije metana za 60 – 70 procenata (Honan i sar., 2021). Konačno, poslednjih godina se kao nutritivni dodaci u ishrani goveda, koji smanjuju produkciju CH₄ u buragu i njegovu emisiju u spoljašnju sredinu, koriste ekstrakti različitih vr-

sta morskih algi, bilo samostalno bilo u kombinaciji sa drugim sastojcima koji stabilizuju mikrofloru buraga. Poznato je da crvene morske alge sadrže preko 1 500 metabolita od kojih se halogena ugljovodonična jedinjenja, uključujući bromometan i bromoform, dovode u vezu sa smanjenjem emisije CH₄ (Min i sar, 2021). Ova jedinjenja imaju dva ili tri ugljenikova atoma i deluju inhibitorno na enzime i koenzime metanogenih arheja, koji učestvuju u metanogenezi, što rezultira smanjenjem emisije metana za preko 95 procenata (Machado i sar, 2014). Međutim, uprkos dobrim rezultatima koji se postižu dodavanjem ekstrakta crvenih morskih algi, postoje podeljena mišljenja o opravdanosti njihove primene zbog toga što je ona praćena oslobađanjem halogenih ugljovodonika u atmosferu koji, različitim putevima, doprinose klimatskim promenama (Abbot i sar, 2020). Zbog toga su se, kao posebno interesantne, istakle braon morske alge, koje imaju veoma nizak sadržaj bromoforma, a bogate su polifenolima kao što su florotanini (Min i sar, 2021), koji imaju širok spektar antimikrobne aktivnosti i snažno suprimiraju rast celulolitičkih bakterija u buragu, dovodeći do smanjenja emisije metana za preko 90 procenata (Machado i sar, 2014).

ZAKLJUČAK

Poznavanje metabolizma krava je od izuzetnog značaja za utvrđivanje mesta interakcije pojedinih metaboličkih puteva i time, po potrebi, njihovo preusmeravanje prema poželjnijim krajnjim proizvodima metabolizma. Kada je u pitanju metabolički put proizvodnje metana, koji je nepoželjan krajnji proizvod metabolizma sa aspekta zaštite životne sredine, ključno mesto koje otvara mogućnost modulacije ovog puta je prihvatanje vodonika od strane metanogenih arheja. Svi alternativni putevi metabolizma u kojima se preuzima vodonik i uključe u procese u kojima će se sintetisati proizvodi koji povećavaju nutritivnu vrednost mleka ili mesa su interesantni u istraživanjima vezanim za smanjenje emisije metana iz buraga krava uz povećanu proizvodnju ovih jedinki uz očuvanje njihovog zdravlja i dobrobiti.

Zahvalnica:

Istraživanje je sprovedeno uz podršku Fonda za nauku Republike Srbije, broj projekta 7750295, "Mitigation of methane production from dairy cattle farm by nutritive modulation of cow`s metabolism-MitiMetCattle".

LITERATURA

1. Abbott D.W., Aasen I.M., Beauchemin K.A., Grondahl F., Gruninger R., Hayes M., Xing X. 2020. Seaweed and seaweed bioactives for mitigation of enteric methane: Challenges and opportunities. *Animals*, 10:24-32. doi: 10.3390/ani10122432. 2. Ahmadzadeh-Gavahan L., Hosseinkhani A., Taghizadeh A., Ghasemi-Panahi B., Hamidian G., Cheraghi-Saray S., Vakili A. 2021. Impact of supplementing feed restricted ewes' diet with propylene glycol, monensin sodium and rumen-protected choline chloride during late pregnancy on

blood biochemical indices, body condition score and body weight. *Animal Feed Science and Technology*, 273, 114801. **3.** Bauman D.E., Griinari J.M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 23:203–227. doi: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408. **4.** Bernard L., Leroux C., Chilliard Y. 2008. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606:67–108. doi: 10.1007/978-0-387-74087-4_2. **5.** Bougouin A., Appuhamy J.R.N., Ferlay A., Kebreab E., Martin C., Moate P.J., Eugène M. 2019. Individual milk fatty acids are potential predictors of enteric methane emissions from dairy cows fed a wide range of diets: Approach by meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 102:10616–10631. doi: 10.3168/jds.2018-15940. **6.** Chilliard Y., Martin C., Roual J., Doreau M. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *Journal of Dairy Science*, 92:5199–5211. doi: 10.3168/jds.2009-2375. **7.** Ellis J.L., Dijkstra J., Kebreab E., Bannink A., Odongo N.E., McBride B.W. 2008. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *Journal of Agricultural Science*, 146:213–233. **8.** Fievez V., Colman E., Castro-Montoya J.M., Stefanov I., Vlaeminck B. 2012. Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function – An update. *Animal Feed Science and Technology*, 172:51–65. **9.** Honan M., Feng X., Tricarico J. M., Kebreab E. 2021. Feed additives as a strategic approach to reduce enteric methane production in cattle: modes of action, effectiveness and safety. *Animal Production Science*. <https://doi.org/10.1071/AN20295>. **10.** Janssen P.H., Kirs M. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and environmental microbiology*, 74:3619–3625. doi: 10.1128/AEM.02812-07. **11.** Jose V.S., Sejian V., Bagath M., Ratnakaran A.P., Lees A.M., Al-Hosni Y.A., Gaughan J.B. 2016. Modeling of greenhouse gas emission from livestock. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 27. **12.** Jovanović L., Pantelić M., Prodanović R., Vujanac I., Đurić M., Tepavčević S. et al., 2017. Effect of peroral administration of chromium on insulin signaling pathway in skeletal muscle tissue of Holstein calves. *Biological trace element research*, 180:223–232. doi: 10.1007/s12011-017-1007-1. **13.** Kirovski D., Blond B., Katić M., Marković R., Šefer D. 2015. Milk yield and composition, body condition, rumen characteristics, and blood metabolites of dairy cows fed diet supplemented with palm oil. *Chemical and biological technologies in agriculture*, 2(1):1-5. **14.** Kirovski D., Sladojević Z. 2017. Prediction and diagnosis of fatty liver in dairy cows. *SM J Gastroenterology and Hepatology*, 3, 1-7. **15.** Liu Y., Whitman W.B. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125:171-189. doi: 10.1196/annals.1419.019. **16.** Lyu Z., Shao N., Akinyemi T., Whitman W.B. 2018. Methanogenesis. *Current Biology*, 28:727-732. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.021. **17.** Machado L., Magnusson M., Paul N.A., de Nys R., Tns omki N. 2014. Effects of marine and freshwater macroalgae on in vitro total gas and methane production. *PLoS One*, 9, e85289. doi: 10.1371/journal.pone.0085289. **18.** Meale S.J., Chaves A.V., McAllister T.A., Iwaasa A.D., Yang W.Z., Benchaar C. 2014. Including essential oils in lactating dairy cow diets: effects on methane emissions. *Animal Production Science*, 54:1215-1218. **19.** Min B.R., Parker D., Brauer D., Waldrip H., Lockard C., Hales K., Augyte S. 2021. The role of seaweed as a potential dietary supplementation for enteric methane mitigation in ruminants: Challenges and opportunities. *Animal Nutrition*, 7:1371-1387. doi: 10.1016/j.aninu.2021.10.003. **20.** Mohammed R., McGinn S. M., Beauchemin K.A. 2011. Prediction of enteric methane output from milk fatty acid concentrations and rumen fermentation parameters in dairy cows fed sunflower, flax, or canola seeds. *Journal of Dairy Science*, 94:6057–6068. doi: 10.3168/jds.2011-4369. **21.** Myhre G., Shindell D., Bréon F.M. 2013. Chapter 8, Anthropo-

genic and natural radiative. In *Climate Change 2013: the Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Eds. T.F. Stocker, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 659-740. **22.** Pantelić M., Jovanović L., Prodanović R., Vujanac I., Đurić M., Čulafić T. et al, 2018. The impact of the chromium supplementation on insulin signaling pathway in different tissues and milk yield in dairy cows. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102:41-55. doi: 10.1111/jpn.12655. **23.** Patra A. K. 2013. The effect of dietary fats on methane emissions, and its other effects on digestibility, rumen fermentation and lactation performance in cattle: A meta-analysis. *Livestock Science*, 155:244-254. **24.** Podpečan O., Zrimšek P., Mrkun J., Goličnik M., Radovanović A., Jovanović L. et al, 2020. Thresholds of blood variables obtained by receiver operating characteristic analysis for indication of fat and glycogen content in the liver of postpartum dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*, 19:303-309. **25.** Prodanović R., Nedić S., Simeunović P., Borozan S., Nedić S., Bojkovski J. et al, 2021. Effects of chestnut tannins supplementation of prepartum moderate yielding dairy cows on metabolic health, antioxidant and colostrum indices. *Annals of Animal Science*, 21:609-621. **26.** Reisinger A., Clark H., Cowie A.L., Emmet-Booth J., Gonzalez Fischer C., Herrero M. et al, 2021. How necessary and feasible are reductions of methane emissions from livestock to support stringent temperature goals?. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 379, 20200452. doi: 10.1098/rsta.2020.0452. **27.** Rico D.E., Chouinard P.Y., Hassanat F., Benchaar C., Gervais R. 2016. Prediction of enteric methane emissions from Holstein dairy cows fed various forage sources. *Animal*, 10:203-211. doi: 10.1017/S1751731115001949 **28.** Tapio I., Snelling T.J., Strozzi F., Wallace R.J. 2017. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. *Journal of animal science and biotechnology*, 8:1-11. doi: 10.1186/s40104-017-0141-0. **29.** Van Lingen H.J., Crompton L.A., Hendrix W.H., Reynolds C.K., Dijkstra J. 2014. Meta-analysis of relationships between enteric methane yield and milk fatty acid profile in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 97:7115-7132. doi: 10.3168/jds.2014-8268. **30.** Williams S.R.O., Hannah M.C., Eckard R.J., Wales W.J., Moate P.J. 2020. Supplementing the diet of dairy cows with fat or tannin reduces methane yield, and additively when fed in combination. *Animal*, 14:464-472. doi: 10.1017/S1751731120001032.

MODULATION OF COWS METABOLISM AS A TOOL FOR THE ENVIRONMENTALLY FRIENDLY CATTLE PRODUCTION

Danijela Kirovski, Sreten Nedić, Ljubomir Jovanović, Radiša Prodanović, Milica Stojković, Dušan Bošnjaković, Ivan Vujanac

Summary

The agricultural sector represents the single most significant anthropogenic source of methane, with dairy farms the dominant contributor to methane emissions. Methane is the second most important greenhouse gas, after carbon dioxide, which is physiologically produced in the rumen of ruminants. Namely, the rumen represents an environment inhabited by a community of microorganisms (microbiome), which includes various species of anaerobic bacteria, archaea, protozoa, fungi, and phages. The

primary role of these microorganisms is to break down plant components that cannot be broken down by the host's enzymatic system, which results in the release of the end products of fermentation - volatile fatty acids. After resorption from the digestive tract, these fermentation products are used to synthesize complex compounds in various tissues (muscles, mammary gland, etc.), including proteins, fats and others, which make animal products nutritionally valuable for humans. However, fermentation processes in the rumen are accompanied by the release of carbon dioxide and hydrogen, which methanogenic archaea use for the synthesis of methane, whose excessive release into the environment contributes to the greenhouse effect and global warming. Additionally, the synthesis of methane in the rumen is a metabolic pathway through which 2-12% of food energy is lost. Therefore, the interest in reducing methane emissions is not only in environmental protection but also in the potential increase in animal productivity, which brings economic benefits to farmers, which are one of the crucial links in planning measures to reduce methane emissions from cattle farms. Different nutritional supplements can modulate metabolic processes and thus contribute to reducing methane emissions by dairy cows. In this regard, tannins and other plant extracts, such as garlic oil extract, but also extracts from various seaweeds, including red and brown seaweeds, are recognized as the most important supplements in reducing methane emissions.

Keywords: *enteric fermentation, methane, methanogenic archaea, modulation of metabolism, nutritional supplements*

PREDIKCIJA PROIZVODNJE ENETRIČNOG METANA U ORGANIZMU PREŽIVARA NA OSNOVU HEMIJSKOG SASTAVA HRANE

*Aleksandra Ivetić¹, Stamen Radulović², Bojan Stojanović¹,
Vesna Davidović¹, Milivoje Ćosić³*

Kratak sadržaj

Procena i ublažavanje emisije metana iz govedarstva, posebno od mlečnih krava, dobile su globalni značaj za klimatski održivu govedarsku proizvodnju. Metan je gas koji ima 28 puta veći negativan uticaj na globalno zagrevanje od ugljen dioksida. Udeo enteričnog metana u globalnoj emisiji metana iznosi 27 procenata. On nastaje kao nusproizvod varenja hrane prvenstveno kod preživara enteričnom fermentacijom u buragu. Preživari (gajeni ili divlji) emituju metan najvećim delom eruktacijom. Proizvedeni enterični metan predstavlja gubitak energije hrane kod životinja. Količina enteričnog metana koja se emituje zavisi od tipa digestivnog trakta, starosti i težine životinje, kao i od kvaliteta i količine unete hrane.

Istraživanjima brojnih autora u proteklom periodu je razvijeno više metoda za procenu stvarnih emisija ECH_4 i to su: komore za disanje, tehnika praćenja sa sumpor heksafluoridom (SF_6), uzimanje uzoraka izdisaja tokom muže ili ishrane, "Green Feed" sistem i mnoge druge. Od navedenih, komora za disanje predstavlja zlatni standard i referentnu metodu za studije metabolizma životinja i emisije gasova. Direktno merenje ECH_4 je složeno i nepraktično na većem broju grla i zbog toga se za procenu proizvodnje CH_4 koriste predikcioni modeli. Definisane i primena matematičkih modela predikcije ima za cilj da omogući preciznost i adekvatno prilagođavanje prema uslovima odgajivanja, kako bi se dobila što realnija vrednost emisije ECH_4 . Međutim, definisanje preciznih modela predviđanja zahteva opsežne podatke. Složeni modeli koji koriste DMI, NDF, EE, MF i BW su imali najbolje performanse za predviđanje proizvodnje ECH_4 . Modeli koji zahtevaju samo podatke o DMI ili DMI sa NDF su imali najbolje prediktivne sposobnosti i predstavljaju alternativu složenim modelima. Dobra predikciona jednačina ukupne proizvodnje ECH_4 u skupu podataka je usko povezana sa informacijama o unosu suve materije, a zatim sa sadržajem NDF u obroku. Do danas su razvijeni različiti matematički modeli predikcije emisije enteričnog metana kao što su Holos, NorFor i drugi.

Ključne reči: enterični metan, ishrana preživara, potencijal globalnog zagrevanja

¹Dr Aleksandra Ivetić, naučni saradnik; dr Bojan Stojanović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Vesna Davidović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Stamen Radulović, docent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

³Dr Milivoje Ćosić, naučni saradnik, Institut za šumarstvo, Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: aleksandra@agrif.bg.ac.rs

UVOD

Metan (CH_4), ugljen dioksid (CO_2), azot oksid (N_2O) i halougljenici su gasovi sa efektom staklene bašte (GHG). Oni pojačavaju efekte sunčevog i toplotnog zračenja na površinske i atmosferske temperature i često se izražavaju u odnosu na CO_2 ekvivalent (CO_2eq), (Knapp i sar., 2014).

Metan nastaje anaerobnom fermentacijom organskih materija u buragu i debelom crevu domaćih i divljih životinja, (Crutzen *at al.*, 1986). Enterični metan (ECH_4) je nuzprodukt tokom digestivnog procesa kojim mikroorganizmi razlažu ugljene hidrate u jednostavne molekule, (IPCC, 2006). Proizvedena i emitovana količina ECH_4 zavisi od tipa digestivnog trakta, starosti i težine životinje, kao i od kvaliteta i količine unete hrane, (Ivetić i Ćosić, 2021). Građa rumena i struktura creva podstiču opsežnu fermentaciju unete hrane. Enterični metan se izbacuje 99 procenata preko usta i nozdruva, od čega se većina (87 procenata) oslobađa eruktacijom, (Murray i sar., 1976).

Preživari (goveda, ovce) su glavni izvori metana praćeni sa umerenim količinama proizvedenim od nepreživara (svinje, konji) i divljih preživara. Za životinju, proizvodnja metana predstavlja gubitak energije hrane dok za životnu sredinu, metan ima snažan efekat staklene bašte, (Muñoz-Tamayo i sar., 2019). Smanjenje emisije metana od strane preživara je bitan cilj održivog i efikasnog stočarstva.

Međunarodni panel za klimatske promene, *The Intergovernmental Panel on Climate Change* – IPCC, je naučno telo zaduženo za procenu rizika od klimatskih promena izazvanih ljudskim aktivnostima. Panel su osnovale Svetska meteorološka organizacija 1988. godine (WMO) i Program Ujedinjenih nacija za životnu sredinu (UNEP). Metode IPCC obezbeđuju osnovu za procenu emisije GHG i razvijene su na bazama podataka koristeći statistiku na nacionalnom nivou, ali nisu u potpunosti pogodne za upotrebu na lokalnom ili regionalnom nivou, (Ominski i sar., 2007). Kako merenje na celokupnoj nacionalnoj populaciji preživara nije moguće, neophodna je primena određenih mera procene za nacionalno izveštavanje o emisiji ECH_4 , (Niu i sar., 2021).

Holos je softverski model koji su razvili Ministarstvo poljoprivrede i Agri-Food Kanada koji procenjuje celokupnu emisiju GHG sa farmi i baziran je na detaljnijim podacima koji su uneti za individualnu farmu (Mc Geough i sar., 2012). On predstavlja empirijski model zasnovani uglavnom na IPCC proračunima, ali su algoritmi modifikovani tako da odražavaju uslove i poljoprivrednu praksu u Kanadi, (Mc Geough i sar., 2012). Za uslove u Norveškoj je model prilagođen u HolosNor i služi za izračunavanje emisije GHG sa govedarskih farmi za proizvodnju mleka i mesa (Ş. Özkan Gülzari i sar., 2018). Nordijski model NorFor pruža pomoć poljoprivrednicima da maksimalno povećaju profit, uz minimalan uticaj na životnu sredinu, sa fokusom na dobrobit životinja. Pristup IPCC može biti proširen ili preformulisan kako bi bio pogodniji za razvoj nacionalnih poljoprivrednih politika istovremeno omogućavajući usklađivanje između nacionalnih i međunarodnih potreba za podacima (Dick i sar., 2008). Projekat "Global Network" predstavlja međunarodnu inicijativu za saradnju naučnika u stočarstvu sa svih

kontinenta, izuzev Afrike, u cilju stvaranja globalne baze podataka o enteričnoj proizvodnji CH₄ (Niu i sar., 2018).

Kvalitet hrane, energija i sadržaj hranljivih materija su od suštinskog značaja u balansiranju ishrane životinja i efikasnosti proizvodnje farmi (Ivetic i sar., 2009). Changunda i Løvendahl, (2020) ukazuju da strategije koje povećavaju efikasnost proizvodnje štede resurse i poboljšavaju upravljanje spoljašnjim okruženjem, predstavljaju odličnu priliku za ublažavanje emisije ECH₄ po jedinici proizvoda u stočarstvu. Efekat prakse ublažavanja proizvodnje metana treba definisati u hranidbenim ogledima kako bi se rešilo pitanje adaptacije od strane ekosistema rumena u relevantnim uslovima industrije. To se posebno odnosi na krave visoke mlečnosti hranjene obrocima za dati region ili zemlju (Hristov i sar., 2015).

METAN

Koncept potencijala globalnog zagrevanja (engl. *Global Warming Potential* – GWP) razvijen je kako bi se uporedile sposobnosti svakog gasa staklene bašte da zarobi toplotu u atmosferi u odnosu na drugi gas, (Ivetic i sar., 2022), odnosno omogućava poređenje uticaja globalnog zagrevanja različitih gasova. Konkretno, on predstavlja meru koliko će energije emisije jedne tone nekog gasa biti apsorbirano u datom vremenskom periodu, u odnosu za emisiju jedne tone CO₂ (EPA, IPCC, 2014). Definicija GWP za određeni gas staklene bašte je odnos toplote zarobljene jednom jedinичnom masom gasa staklene bašte prema jednoj jedinici mase CO₂ u određenom vremenskom periodu, (Dick i sar, 2008).

Tabela 1. Procena potencijala globalnog zagrevanja GWP, (IPCC Sixth Assessment Report Global Warming Potentials, 2021)

Gas sa efektom staklene bašte	Vremenski period 100 godina			Vremenski period 20 godina		
	AR4* 2007	AR5 2014	AR6** 2021	AR4 2007	AR5 2014	AR6 2021
CO ₂	1	1	1	1	1	1
CH ₄ fosilnog porekla	25	28	29.8	72	84	82.5
CH ₄ ne-fosilnog porekla			27.2			80.8
N ₂ O	298	265	273	289	264	273

*U izveštaju AR6 uključen je dodatni GWP za metan kako bi se razlikovao metan koji potiče iz izvora fosilnih goriva, od metana iz ne-fosilnih izvora goriva, kao što je poljoprivreda

Ekvivalent ugljen-dioksida ili CO₂-eq predstavlja metrička meru koja se koristi za poređenje emisija različitih gasova sa efektom staklene bašte na osnovu njihovog GWP, pretvaranjem količina drugih gasova u ekvivalentnu količinu ugljen-dioksida sa istim potencijalom globalnog zagrevanja, (Eurostat). Pri ovo

proceni, emisija CH₄ se množi sa koeficijentom 25 da bi bila izražena u vidu CO₂-eq.

Na primer, GWP za metan je 25, a za azot suboksid 298. To znači da je emisija milion metričkih tona metana ekvivalentna emisiji 25 miliona metričkih tona ugljen-dioksida, (Eurostat). U slučaju kada je potrebno izraziti emisiju GHG-a kao ekvivalente ugljenika, onda se pomnoži iznos CO₂-eq sa 0,273 da bi se oni konvertovali u ekvivalente ugljenika (Ceq), (Dick i sar, 2008).

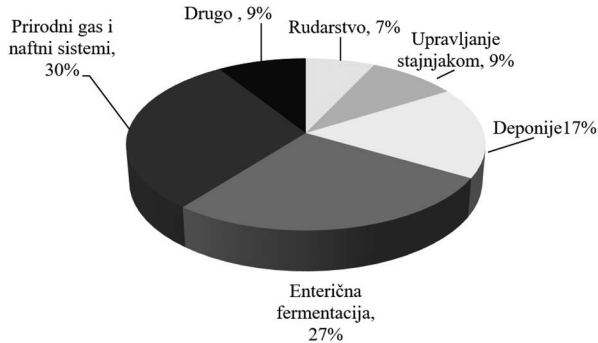
Po molekulu u atmosferi, metan ima jači uticaj globalnog zagrevanja od ugljen-dioksida. Međutim, zbog njihovog različitog poluveka, odnos između emisije metana i koncentracije metana u atmosferi se veoma razlikuje od odnosa za CO₂, (Allen i sar., 2018). Po predlozima navedenih autora, umesto GWP predlaže se GWP* sa ciljem da se precizno ukaže na uticaj emisije kako dugovečnih tako i kratkotrajnih zagađivača na temperature u širokom spektru vremenskih skala. Implementacijom Pariskog sporazuma, merenjem GWP*, smanjila bi se očekivana vrednost zagrevanja u 2030 godini zato što se ona odnosi na kumulativnu emisiju CO₂ do danas, sa trenutnom stopom emisije kratkotrajnih klimatskih zagađivača (tabela 2).

Tabela 2. GWP i GTP sa i bez uključivanja povratnih informacija o klimatskom ugljeniku (cc fb) kao odgovor na emisije naznačenih gasova koji nisu CO₂, (Myhre i sar., 2013)

Gas	Životni vek (godine)	cc fb	GWP20*	GWP100	GTP20**	GTP100
Metan CH ₄	12,4	Bez cc fb***	84	28	67	4
		Sa cc fb	86	34	70	11
Azot suboksid N ₂ O	121	Bez cc fb	264	265	277	234
		Sa cc fb	268	298	284	297

*Global Warming Potential; **Global Temperature Change Potential

Prema definiciji EPA, CO₂ ima GWP vrednost 1, bez obzira na vremenski period koji se koristi i ovaj gas se koristi kao referenca. U klimatskom sistemu CO₂ ostaje veoma dugo i emisija CO₂ izaziva povećanje njegove atmosferske koncentracije koja će trajati hiljadama godina. Procenjuje se da CH₄ ima GWP od 28–36 tokom 100 godina. Metan koji se emituje danas u proseku traje oko deceniju, što je mnogo manje vremena zadržavanja u atmosferi od CO₂. Međutim, CH₄ apsorbuje mnogo više energije od CO₂. Neto efekat kraćeg veka trajanja i veće energetske apsorpcije ogleda se u vrednosti GWP. Metan GWP prouzrokuje indirektno efekte zbog toga što je CH₄ preteča ozona, a ozon je sam po sebi GHG. Što je GWP veći, gas više zagreva atmosferu. Na primer, 100-godišnji GWP metana je 21, što znači da će metan izazvati 21 puta više zagrevanja od ekvivalentne mase ugljen-dioksida u vremenskom periodu od 100 godina.



Slika 1. Emisija metana prema izvorima u SAD-u, EPA, 2019

Merenje emisije metana je važno za: obezbeđivanje informacija, regulatornu kontrolu i podsticaje nacionalnih politika. Ukoliko su neto emisije precenjene, regulatorne kontrole primoraće poljoprivrednike da snose nepotrebne troškove prilagođavanja, a ušteda emisije GHG biće manja nego što je predviđeno. Takođe, ukoliko tehnike merenja nedovoljno uzmu u obzir ekološki kontekst u realnom upravljanju farmama, poljoprivrednici mogu dobiti nedovoljne podsticaje za smanjenje emisija, (Dick i sar., 2008).

Nastajanje enteričnog metana

Enterični metan se proizvodi fermentacijom hrane unutar sistema organa za varenje, a emisija metana je linearno proporcionalna količini unete hrane. Unos hrane je pozitivno povezan sa veličinom životinja, stopom rasta i proizvodnjom (npr. proizvodnja mleka, rast vune ili graviditet). Takođe, na obim proizvodnje metana utiče i sastav ishrane.

Liu i sar. (2017), su izvršili sistematski pregled objavljenih podataka u literaturi o govedarskoj proizvodnji, amonijaku (NH_3) i emisiji enteričnog metana kako bi se dobili statistički reprezentativni faktori emisije na osnovu unosa hranljivih materija ili energije u obroku, kao i da bi identifikovali najbitnije uzroke varijacija emisije. Autori su ustanovili da emisija navedenih gasova predstavlja gubitke hranljivih materija i energije u govedarskoj proizvodnji. Količina metana koju proizvodi preživar povezana je sa količinom organske materije koja se vari u rumenu, posebno vlakana, (Ivetić i Ćosić, 2021). Bitne determinante svakodnevne proizvodnje metana su na prvom mestu unos suve materije i zatim sastav obroka, prvenstveno sadržaja vlakana izolovanih neutralnim deterdžentima (Niu i sar., 2018).

Kada bakterije rumena, protozoe i gljivice, fermentišu ugljene hidrate i proteine iz biljnih materijala, one proizvode isparljive masne kiseline, uglavnom si-rćetnu, propionsku i buternu. Obroci sa visokim sadržajem vlakana favorizuju sintezu acetata. Sintaza acetata i butirata praćena je oslobađanjem metabolič-

kog vodonika, koji, ukoliko se dozvoli da se akumulira u tečnosti rumena, ima negativne efekte na mikrobiološki rast i varenje hrane, (Haque, 2018). Mikroorganizmi koji koriste metabolički vodonik sa CO_2 za proizvodnju metana i vode su arheje (*Archaea*) rumena. Metanogeni mikroorganizmi koriste vodonik (H_2) u rumenu za proizvodnju ECH_4 i na taj način održavaju pritisak H_2 niskim što favorizuje anaerobnu fermentaciju unetih materijala (Haque 2018).

Drugi izvor metana (koji nije enterični) je stočno đubrivo koje se pre svega sastoji od organskog materijala i vode. Krajnji proizvodi anaerobnog raspadanja su metan, ugljen dioksid i stabilizovani organski materijal. Proizvodni potencijal metana zavisi od specifičnog sastava đubriva, što zauzvrat zavisi od sastava i promenljivosti životinjske ishrane. Optimalni uslovi za proizvodnju metana uključuju anaerobno okruženje na bazi vode, visok nivo hranljivih materija za mikrobiološki rast, neutralnu pH vrednost (blizu 7,0) i tople temperature (Jun i sar., 2002).

Istraživanjima brojnih autora je, u proteklom periodu, razvijeno više metoda za procenu stvarne emisije ECH_4 . One se zasnivaju na različitim principima i imaju širok spektar optimalne upotrebljivosti. Metode uključuju komore za disanje, tehniku praćenja sa sumpor heksafluoridom (SF_6), uzimanje uzoraka izdijasa tokom muže ili ishrane, "GreenFeed" sistem, laser detektor metana i druge (Brouček, 2014). Svaka metoda meri različite komponente proizvodnje metana. Komora za disanje predstavlja zlatni standard i bila je jedina metoda decenijama unazad. Ona predstavlja referentnu metodu za studije metabolizma životinja i ukupne emisije gasova, uključujući ECH_4 (Haque, 2018). Solis i saradnici (2017) su opisali dizajn, konstrukciju i rad respiracionih komora za *in vivo* merenje proizvodnje metana kod goveda. Merenja disanja su opravdana zbog toga što se 99 procenata enteričnog metana izbacuje iz usta i nozdrva, od čega se veći deo (87 procenata) oslobađa eruktacijom, (Murray i sar., 1976).

Hristov i saradnici (2015) navode da je anaerobna fermentacija unetog biljnog materijala u retikulo-rumenu simbiotski proces između domaćina preživara i mikroorganizama koji snabdevaju domaćina energijom i proteinima, istovremeno obezbeđujući optimalan rast i hranljivih materija za mikroorganizme. Ova simbioza pruža preživara evolitivnu prednost koja im omogućava da efikasno koriste inače nesvarljivu vlaknastu hranu uprkos gubitku manjeg dela biljnog materijala u bruto energiji metana.

Pretragom podataka iz literature, Liu i saradnici (2017), su grupisali sledeće faktore koji utiču na emisiju ECH_4 :

1. Rasa životinja; 2. Status – laktacija ili zasušenje; 3. Dani u laktaciji i 4. Svarljivost hrane i unos energije. Bitni faktori koji mogu da utiču na emisiju ECH_4 su: svarljivost hrane i unos energije izraženi kao procentualni gubici energije obroka. U zavisnosti od svarljivosti unete hrane zavisi količina proizvedenog ECH_4 , odnosno što je veća energetska svarljivost hrane i viši nivo unosa energije kod preživara, manji procenat svarljive energije je iskorišćen za nastajanje ECH_4 .

Povećanje produktivnosti i efikasnosti konverzije hrane predstavljaju najveću mogućnost za ublažavanje emisije ECH_4 po jedinici proizvoda u govedarstvu.

Goveda spadaju u glavne uzročnike antropogene emisije gasa CH_4 u atmosferi (Gerber i sar., 2013). Upravo je ovaj gas sa efektom staklene bašte, poslednjih godina privukao veliku pažnju, ne samo zbog učešća u procesima globalnog zagrevanja koji vode ka klimatskim promenama, već i zato što predstavlja gubitak energije kod životinja. Najčešće emisije metana iznose oko 2 do 12 procenata bruto energetske unosa hrane (Johnson i Johnson, 1995). Proizvodnja ECH_4 je veoma usko povezana sa sastavom nestabilnih masnih kiselina stvorenih u rumenu (Johnson i Johnson, 1995). Primarni supstrat za metanogenezu je H_2 koji se generiše tokom fermentacije ugljenih hidrata iz biljnih ćelija. Proizvodi ove fermentacije su pre svega acetat i biturat (Moss i sar., 2000). Fermentacija skroba i drugih nestrukturnih ugljenih hidrata favorizuje proizvodnju propionata. Proizvodnja propionata je direktan put za iskoristivost H_2 u rumenu (Benchaar i Greathead, 2011). Za razliku od skroba, pri fermentaciji šećera od strane mikroorganizama rumena povećava se proizvodnja ECH_4 (Hindrichsen i sar., 2004). Mikrobiološka fermentacija šećera u rumenu dovodi do povećane proizvodnje butirata na račun propionata (Friggens i sar., 1998), što rezultira većom proizvodnjom ECH_4 .

Garnsworthy i saradnici (2019) navode da su preživari (*Ruminantia*) u evoluciji stekli sistem organa za varenje koji efikasno vari biljne materijale. Kao i većini sisara, preživarima nedostaje enzim celulaza potreban za razgradnju veza beta-glukoze u celulozi, ali su oni domaćini raznovrsnoj populaciji mikroorganizama u rumenu koji mogu da svare celulozu i druge materije biljnog porekla. Kada bakterije, protozoa i gljivice rumena fermentišu ugljene hidrate i proteine iz biljnih materijala, oni proizvode isparljive masne kiseline, uglavnom acetat, propionat i butirat. Obroci sa visokim sadržajem vlakana favorizuju sintezu acetata. Sintaza acetata i butirata praćena je oslobađanjem metaboličkog vodonika, koji, ako mu se dozvoli da se akumulira u tečnosti rumena, ima negativne efekte na rast bakterija i podstiče varenje hrane. Arheje rumena su mikroorganizmi koji kombinuju metabolički vodonik sa CO_2 za proizvodnju metana i vode. Arheje imaju vitalnu ulogu, u zaštiti rumena od viška metaboličkog vodonika, a metan koji one proizvode je neizbežan proizvod fermentacije u rumenu.

Količina metana koju proizvode preživari je povezana sa količinom organskih materija svarenih u rumenu, a posebno vlakana. U ovom procesu se takđe proizvodi određena količina acetata i metaboličkog vodonika. Važne determinante svakodnevne proizvodnje metana su unos suvih materija i sastav obroka. Što se više hrane konzumira i što je veći sadržaj vlakana u ishrani, to se više metana proizvodi na dnevnom nivou. Mills i saradnici (2001, 2003) su analizirali rezultate iz radova objavljenih o proizvodnji metana u komorama za disanje, kod preživara hranjenih različitim obrocima i ustanovili su visoku korelaciju ($r^2 = 0,76$) između proizvodnje ECH_4 i unosa suve materije. Autori su saopštili da mlečne krave sa manjom proizvodnjom mleka imaju tendenciju da gube više energije za ishranu u vidu ECH_4 po jedinici proizvedenog mleka. To se posebno odnosi na ve-

oma nizak nivo prinosa mleka, kod starijih krava. Preciznost i ponovljivost metoda su važni, ali podaci sa različitih izvora se mogu adekvatno prilagoditi ukoliko se kombinuju tako da na odgovarajući način budu povezani sa „stvarnom“ vrednošću ECH_4 (Garnsworthy i sar., 2019). Zbog toga su ovi autori uradili studiju uporedivosti različitih primenjenih metoda i dobili korelacije između poznatih „stvarnih“ vrednosti ECH_4 , korelacije između ponovljenih merenja ili pojedinačne korelacije. Saopšteno je da su sve testirane metode bile u visokoj korelaciji sa komorama za disanje, ali da nijedna korelacija nije bila veća od 0,90.

Matematički modeli za predikciju produkcije enteričnog metana

Postoji interesovanje za predviđanjem proizvodnje enteričnog metana korišćenjem modela zasnovanih na postojećim podacima kao što su: karakteristike životinje (težina, starost, rasa), karakteristike hrane (hranljivi i energetske sadržaj), podaci o unosu (suva materija ili hranjive materije) ili svarenim hranljivim sastojcima (Brouček, 2014). Prema Liang-u i saradnicima (2017), u većini slučajeva je IPCC (2006) jednačina korišćena za proračun emisije ECH_4 uz primenjeni model (2014) ili drugih autora. Unos suve materije (engl. *Dry Matter Intake* – DMI), energije (GE, ME), vlakana nerastvorljivih u neutralnom deterdžentu (Moraes-a i saradnika (engl. *Neutral Detergent Fibre* – NDF), vlakana nerastvorljivih u kiselom deterdžentu (engl. *Acid Detergent Fibre* – ADF), sirove masti (engl. *Ether Extract* – EE), lignin i odnos zastupljenih hraniva u obroku su korišćeni parametri u razvoju modela za predikciju emisije ECH_4 (Ellis i sar., 2007). Model koji su predložili Moraes i saradnici (2014) je korišćen za predviđanje ECH_4 i obuhvatio je unos bruto energije (GE), NDF-a i sadržaj ekstrakta etra (sirove masti) u obroku. Autori su predložili modele za svaku proizvodnu grupu u govedarstvu koji su predstavljeni u tabeli 1.

Količina DMI je najbitniji faktor za predviđanje proizvodnje ECH_4 . Iako su složeni, modeli koji koriste DMI, NDF, EE, MF i BW su ispoljili najbolje performanse za predviđanje CH_4 proizvodnje. Modeli koji zahtevaju samo DMI ili DMI sa NDF su imali najbolje prediktivne sposobnosti i nude alternativu složenim modelima, (Nui i sar., 2017).

Hardie i saradnici (2014) naglašavaju da je potrebna opreznost prilikom tumačenja rezultata zbog bruto procene DMI. Vrednosti DMI dobijene od poljoprivrednika su možda precenjene jer verovatno nisu računali na neiskorišćenu ili odbijenu hranu i pretpostavljaju da je DMI u sezoni ispaše bio identičan DMI tokom perioda bez ispaše u godini.

Na prvom mestu, dobra predikciona jednačina ukupne proizvodnje ECH_4 u skupu podataka je usko povezana sa informacijama o unosom suve materije a zatim sa sadržajem NDF u obroku (Niu i sar., 2018). Do danas su razvijeni različiti modeli predviđanja eteričkog metana koji zahtevaju različite nivoe dostupnosti informacija i mogu se lako implementirati u nacionalnim bazama GHG različitih nivoa složenosti. Upotreba takvih modela može umanjiti greške povezane sa

predviđanjem emisije metana i biti koristan alat za ispitivanje i predstavljanje politika koje regulišu emisiju GHG iz govedarstva.

Tabela 3. Modeli predikcije produkcije ECH₄ za različite nivoe ishrane i složenosti proizvodne grupe u govedarstvu (Moraes i sar., 2014)

Model	Jednačine predikcije*
Krave u laktaciji	
GE	$CH_4 = 3.247 (0.429) + 0.043 (0.001) \times GEI$
Ishrana	$CH_4 = 0.225 (0.713) + 0.042 (0.001) \times GEI + 0.125 (0.015) \times NDF - 0.329 (0.094) \times EE$
Grlo	$CH_4 = -9.311 (1.060) + 0.042 (0.001) \times GEI + 0.094 (0.014) \times NDF - 0.381 (0.092) \times EE + 0.008 (0.001) \times BW + 1.621 (0.119) \times MF$
Krave koje nisu u laktaciji	
GE	$CH_4 = 2.381 (0.153) + 0.053 (0.001) \times GEI$
Ishrana	$CH_4 = 2.880 (0.200) + 0.053 (0.001) \times GEI - 0.190 (0.049) \times EE$
Grlo	$CH_4 = 2.880 (0.200) + 0.053 (0.001) \times GEI - 0.190 (0.049) \times EE$
Junice	
GE	$CH_4 = 1.289 (0.185) + 0.051 (0.001) \times GEI$
Ishrana	$CH_4 = -0.163 (0.298) + 0.051 (0.001) \times GEI + 0.038 (0.006) \times NDF$
Grlo	$CH_4 = -1.487 (0.318) + 0.046 (0.001) \times GEI + 0.032 (0.005) \times NDF + 0.006 (0.0007) \times BW$
Junad	
GE	$CH_4 = 0.743 (0.119) + 0.054 (0.001) \times GEI$
Ishrana	$CH_4 = 0.743 (0.119) + 0.054 (0.001) \times GEI$
Grlo	$CH_4 = -0.221 (0.151) + 0.048 (0.001) \times GEI + 0.005 (0.0005) \times BW$

*Methane emissions (MJ/d);GEI, Gross energy intake (MJ/d); NDF, Dietary neutral detergent fiber proportion (% of dry matter); EE, Dietary ether extract proportion (% of dry matter); BW, Body Weight (kg); MF, Milk fat (%).

ZAKLJUČAK

Strožiji propisi o zagađenju vazduha stvorili su stalnu potrebu za inventarom emisije GHG zasnovanom na pouzdanim i reprezentativnim faktorima, kao i strategijama ublažavanja zagađenja spoljašnje sredine. Koncept potencijala globalnog zagrevanja je razvijen da bi se uporedile sposobnosti svakog gasa staklene bašte da zadrži toplotu u atmosferi u odnosu na neki drugi gas. Procenjuje se da metan ima potencijal globalnog zagrevanja 28–30 puta veći od ugljen dioksida tokom stogodišnjeg perioda. Metan koji se danas emituje traje u proseku oko deceniju, što je mnogo manje od CO₂. Međutim, CH₄ apsorbuje mnogo više energije od CO₂.

Evaluacija i ublažavanje emisije metana iz govedarstva, posebno od mlečnih krava, dobili su globalni značaj za klimatski održivu govedarsku proizvodnju. Direktno merenje ECH_4 je složeno i nepraktično na većem broju grla i zbog toga se predikcioni modeli koriste za procenu proizvodnje CH_4 . Međutim, definisanje preciznih modela predviđanja zahteva opsežne podatke. Potrebno je primeniti revidirane faktore konverzije emisija CH_4 za određene regione da bi se poboljšale procene na nacionalnom nivou. Prvenstveno, informacije o DMI su potrebne za dobru procenu a zatim i drugi parametri kao što su sadržaj NDF u cilju poboljšanja preciznosti matematičkog modela. Takođe, za predviđanje prinosa i intenziteta enteričnog CH_4 potrebne su informacije o prinosu mleka i njegovom hemijskom sastavu.

Sa druge strane, efikasnost proizvodnje gajenih životinja doprinosi smanjenju uticaja na životnu sredinu po jedinici proizvoda. Vrsta digestivnog sistema ima značajan uticaj na emisiju metana. Preživari imaju u prednjem delu svog digestivnog trakta burag, u kome se odvija intenzivna mikrobiološka fermentaciju biljne hrane što daje velike nutritivne prednosti, posebno uključujući sposobnost varenja celuloze. Međutim, preživari su i najveći proizvođači ECH_4 . Zbog toga, strategije koje povećavaju efikasnost proizvodnje i štede resurse poboljšavaju upravljanje faktorima spoljašnje sredine i predstavljaju izvršnu priliku za smanjenje emisije ECH_4 po jedinici proizvoda od preživara.

LITERATURA

Potpuni spisak referenci (47) se može dobiti na zahtev od autora za korespondenciju: aleksandra@agrif.bg.ac.rs

PREDICTION OF PRODUCTION OF ENTERIC METHANE IN RUMINANTS BASED ON CHEMICAL COMPOSITION OF FEED

***Aleksandra Ivetić, Stamen Radulović, Bojan Stojanović,
Vesna Davidović, Milivoje Ćosić***

Summary

The assessment and mitigation of methane emissions from beef, especially from dairy cows, has gained global significance for climate-sustainable cattle production. Methane is a gas that has 28 times the negative impact on global warming than carbon dioxide. The share of enteric methane ECH_4 in global methane emissions is 27%. It is created as a byproduct of the digestion of food primarily in survivors with enteric fermentation in the barrel. Ruminants (raised or wild) emit methane for the most part by eructation. Produced methane represents a loss of food energy in animals. The amount of methane emitted depends on the type of digestive tract, age, and weight of the animal, as well as the quality and quantity of food, ingested. Research by numerous

authors over the past period has developed several methods for assessing actual ECH_4 emissions: breathing chambers, sulfur hexafluoride tracking techniques taking breathing samples during husband or diet, GreenFeed system, and many more. Of these, the breathing chamber is the gold standard and is a reference method for animal metabolism studies and emissions. Direct measurement of ECH_4 is complex and impractical on larger numbers of animals; therefore, predictionary models are used to evaluate CH_4 production. Defining and applying mathematical prediction models aims to enable precision and adequate adjustment according to the conditions of breeding, to enable as realistic the value of ECH_4 emissions as possible. However, defining precise prediction models requires extensive data. Complex models using DMI, NDF, EE, MF, and BW had the best performance for predicting ECH_4 production, models that require only DMI or DMI data with NDF had the best predictive capabilities and were an alternative to complex models. A good predictive equation of total ECH_4 production in the data set is closely related to information about the dry matter intake and then to the content of the NDF in the ratio. To date, different mathematical models have been developed to predict emissions of essential methane, such as Holos, NorFor, and others.

Keywords: Enteric methane, global warming potential, ruminants nutrition

UPOTREBA ENZIMA U POVEĆANJU SVARLJIVOSTI HRANE I ZAŠTITI ŽIVOTNE SREDINE

*Dejan Perić, Radmila Marković, Stamen Radulović, Svetlana Grdović,
Dragoljub Jovanović, Dragan Šefer*

Kratak sadržaj

Potražnja za proteinima animalnog porekla nastavlja da raste sa povećanjem broja ljudi na planeti. Zbog toga je pred naučnu i stručnu javnost postavljen jasan zadatak, a to je kontinuirana dostupnost mesa, mleka, jaja i ribe. Rast sektora intenzivnog stočarstva postavlja ogromne zahteve za svetske prirodne resurse i kao što se na široko izveštava, dovešće do povećanja emisije gasova i efekta staklene bašte, kao i do većeg uticaja na životnu sredinu, odvođeci naše sisteme ishrane daleko izvan granica planete. Primarni kritični ekološki faktori su: zapremina stajnjaka, sadržaj azota i fosfora u stajnjaku, proizvodnja metana i miris. Održivost proizvodnje animalnih proteina je sada glavni i centralni zadatak nametnut čovečanstvu, a pozivi na promene su široko rasprostranjeni. Postoje različiti načini ublažavanja štetnih efekata stočarstva na životnu sredinu, a jedan od najsavremenijih je industrijska primena enzima u hrani za životinje. Enzimi, koji se svrstavaju u biološke katalizatore su proteini sposobni da ubrzaju brzinu hemijskih reakcija neophodnih za pravilno funkcionisanje svih ćelija. Zbog svoje raznolikosti, specifičnosti i katalitičkog kapaciteta, oni su široko prihvaćeni od strane naučne i industrijske zajednice. Mada su odavno poznati u nauci, enzimi se kao funkcionalni dodaci, u industriji hrane za životinje koriste tek poslednjih nekoliko decenija. Razlikujemo endogene enzime, koji se stvaraju u digestivnom sistemu, biljne enzime iz različitih biljnih hraniva i egzogene enzime koje proizvode različite bakterije i plesni. Cilj dodavanja enzima je dopuna aktivnosti endogenih enzima životinja, otklanjanje antinutritivnih materija (glukani, fitati) iz pojedinih hraniva, povećanje energetske i hranljive vrednosti hraniva na osnovu veće dostupnosti pojedinih hranljivih materija za resorpciju, kao i smanjivanje izlučivanja neiskorišćenih hranljivih materija u spoljašnju sredinu što se uklapa u koncept očuvanja životne sredine. Potraga za novim izvorima dobijanja enzima za upotrebu u hrani za životinje je trenutni fokus naučnika. Važan aspekt za istraživanje, koji u industriji hrane za životinje i u stočarstvu može biti primenjen kao faktor zaštite životne sredine, je razvoj enzima koji su otporni na varijabilne uslove u gastrointestinalnom traktu novim načinima inkapsulacije i zaštite aktivnih materija.

Ključne reči: *enzimi, ishrana životinja, nutritivna strategija, zaštita životne sredine*

¹Dr vet. Dejan Perić, asistent; dr sci. vet. med. Radmila Marković, redovni profesor; dr sci. vet. med. Stamen Radulović, docent; dr Svetlana Grdović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Dragoljub Jovanović, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Dragan Šefer, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: dperic@vet.bg.ac.rs

UVOD

Procenjuje se da svetska populacija farmskih životinja iznosi blizu 4 milijarde jedinki i da proizvodi oko 500 miliona tona stajnjaka godišnje. Potražnja za proteinima animalnog porekla nastavlja da raste sa povećanjem broja ljudi na planeti i zbog toga je pred naučnu i stručnu javnost postavljen jasan zadatak, a to je kontinuirana dostupnost mesa, mleka, jaja i ribe. Naučnici širom sveta su modelirali verovatne scenarije zahteva za animalnim proteinima. Svetski institut za resurse predviđa rast na 445 miliona tona godišnje do 2050. godine kako bi se zadovoljile potrebe stanovništva od 9,7 milijardi. U skladu sa brojkama koje je objavio FAO, to podrazumeva rast od oko 70 procenata u odnosu na današnju proizvodnju, s tim da će svetska populacija porasti za samo 40 procenata u istom periodu. Iako mnoge populacije moraju da povećaju unos animalnih proteina da bi postigle nivo uravnotežene, zdrave ishrane, postoje, sa druge strane, populacije u kojima će kontinuirana prekomerna konzumacija mesa biti glavni pokretač rasta. Ovaj rast proizvodnje životinja postavlja ogromne zahteve za svetske prirodne resurse i kao što se naširoko izveštava, dovešće do povećanja emisije gasova i efekata staklene bašte i većeg uticaja na životnu sredinu, odvođeci naše sisteme ishrane daleko izvan granica planete. Održivost proizvodnje animalnih proteina je sada glavni i centralni zadatak nametnut čovečanstvu, a pozivi na promene su široko rasprostranjeni (Blair i Jacob, 1995).

Povećanje nivoa proizvodnje hrane za životinje zahtevaće veće količine žitarica i drugih sirovina u proces proizvodnje. Ovo će zauzvrat zahtevati i više zemljišta. Prema podacima FAO, svetska površina iznosi oko 13 milijardi hektara, od čega poljoprivreda zauzima 4,9 milijardi. Od toga se samo 1,4 milijarde hektara trenutno koristi u svrhe biljne proizvodnje. Preostalih 3,5 milijarde hektara se koriste kao trajni pašnjaci i livade, od kojih je veliki deo nepogodan za biljnu proizvodnju. S obzirom na ova ograničenja zemljišta, izbori se moraju napraviti. Jedna od opcija je da hranimo farmske životinje žitaricama koje se koriste u ishrani ljudi (konkurentna hrana) ili da bi to izbegli, možemo povećati produktivnost postojećeg zemljišta upotrebom produktivnijih sorti i pojačanom upotrebom đubriva koje bi poboljšalo performanse zemljišta. Ovo povećava zabrinutost zbog prekomernog izlučivanja azota i fosfora u životnu sredinu.

Alternativno, mogli bi da nastavimo da povećavamo količinu zemljišta na raspolaganju za proizvodnju useva, što onda izaziva zabrinutost zbog daljeg gubitka biodiverziteta. Svaka opcija nosi velike dileme i zabrinutost javnog mnjenja. Iako postoje načini za povećanje produktivnosti sadašnjih poljoprivrednih površina, ipak je sve veća zabrinutost u pogledu stope primene hemijskih đubriva, poremećenih ciklusa hranljivih materija, zagađenja azotom i fosforom i smanjene plodnosti i produktivnosti zemljišta. Da bi proizveli više proteina animalnog porekla, moramo efikasnije da koristimo zemljište i poštujuemo granica resursa planete.

Problem odlaganja stajnjaka je pogoršan koncentracijom stočarske proizvodnje u sve većim jedinicama, kako bi se odgovorilo na zahteve potražnje za

jeftinom hranom. Primarni ekološki faktori su: zapremina stajnjaka, sadržaj azota i fosfora u stajnjaku, proizvodnja metana i miris. U mnogim zemljama sveta posebni pravilnici ograničavaju količinu stajnjaka koja se može primeniti po hektaru, a sve u cilju sprečavanja zagađenja životne sredine. Postoji niz strategija koje industrija stočarske proizvodnje može primeniti kako bi se smanjio uticaj na životnu sredinu. To uključuje preduzimanje koraka za poboljšanje efikasnosti pretvaranja hrane za životinje u jestive proizvode, smanjenje rasipanja hrane i formulisanje potpunih smeša koje bliže zadovoljavaju potrebe životinja za specifičnim hranljivim materijama. Trenutno se 50-80 procenata azota i fosfora kojima se hrane životinje ne iskorišćava već se putem stajnjaka i urina izlučuje u životnu sredinu (Greiner i Konietzny, 2006).

Primena održivih sistema ishrane je složena, zahteva vreme i zahteva transformaciju hranidbenih navika od strane potrošača. Za samu industriju, to zahteva inovativan način razmišljanja i spremnost da se brzo i u velikom obimu usvajaju nove tehnologije. Povećanje proizvodnje animalnih proteina, uz zadržavanje unutar planetarnih granica, zahtevaće povećanje efikasnosti, koje se obično postiže intenziviranjem. Ovo podrazumeva, između ostalog, promene u infrastrukturi farme, genetici životinja i uzgojnim praksama, ali uključuje i posebno poboljšanu ishranu, veću upotrebu precizno formulisanih potpunih smeša i naknadno rukovanje stajnjakom, posebno u vezi sa protokom azota i fosfora u životnu sredinu. Upravljanje stajnjakom, u skladu sa direktivama, je ovde od vitalnog značaja. Međutim, sve je jasnije da savremena nutritivna strategija dodatka enzima u hranu za životinje ima značajan uticaj na naknadni hemijski sastav stajnjaka zbog njihovog delovanja na resorpciju i metabolizam hranljivih materija u crevima životinja. Oni na taj način postaju važan alat u upravljanju stajnjakom i korišćenju zemljišta. Biotehnologija, sa svojim nastojanjem za proizvodnjom savremenih i efikasnih enzima, mogla bi da ima veoma važnu ulogu u smanjenju uticaja stočarske proizvodnje na životnu sredinu. Danas postoje naučna istraživanja koja navode da uključivanje enzima u hranu za životinje može smanjiti zapreminu stajnjaka do 14 procenata, a produkciju azota i fosfora do 13, odnosno 70 procenata (Yin i sar., 2001). Na osnovu ovakvih podataka, enzimi su prepoznati kao savremena nutritivna strategija za rast stočarske proizvodnje koja neće imati povećane negativne efekte na životnu sredinu. Oni imaju značajan direktan uticaj na poboljšanje svarljivosti proteina i ugljenih hidrata.

PRIMENA ENZIMA U INDUSTRIJI HRANE ZA ŽIVOTINJE

Enzimi spadaju u biološke katalizatore i to su proteini sposobni da povećaju brzinu hemijskih reakcija neophodnih za pravilno funkcionisanje svih ćelija. Zbog svoje raznolikosti, specifičnosti i katalitičkog kapaciteta su široko prihvaćeni kao dodaci hrani od strane naučne i stručne javnosti (Ojha i sar., 2019). Mada su odavno poznati u nauci, enzimi, se, kao funkcionalni dodaci, u industriji hrane za životinje koriste tek poslednjih godina. Razlikujemo endogene enzime, koji se stvaraju u digestivnom sistemu, biljne enzime iz različitih biljnih hraniva i egzo-

gene enzime koje proizvode različite bakterije i plesni. Cilj dodavanja enzima je dopuna aktivnosti endogenih enzima životinja, otklanjanje antinutritivnih materija (glukani, fitati) iz pojedinih hraniva, povećanje energetske i hranljive vrednosti hraniva na osnovu veće dostupnosti pojedinih hranljivih materija za resorpciju, kao i smanjivanje izlučivanja neiskorišćenih hranljivih materija u spoljašnju sredinu što se uklapa u koncept očuvanja životne sredine. Enzimi se danas industrijski dodaju u hranu za životinje. Uslovi zbog kojih je bitan izbor enzimskog preparata, koje enzim kao uspešan aditiv hrani za životinje treba da ispuni su:

- aktivnost pri normalnoj fiziološkoj pH vrednosti,
- rezistentnost na nizak pH želuca i endogene proteolitičke enzime životinja (enzimi su po hemijskoj prirodi proteini),
- stabilnost u toku dužeg perioda skladištenja i
- termostabilnost (ovo je važno ako materijal ide na peletiranje – enzim ne sme biti inaktiviran pri kratkotrajnom zagrevanju na oko 70 °C).

Pored nabrojanih stavki, na katalitičku aktivnost enzima utiču temperatura, pH i specifičnost supstrata. Enzimi koji se koriste kao aditivi u hrani za životinje moraju biti otporni na toplotu, stabilni i sposobni za očuvanje aktivnosti u digestivnom sistemu životinje, a sve su to važni faktori u katalitičkom odgovoru na pH vrednost, vreme zadržavanja, otpornost na endogene digestivne proteaze, mikrobiološke enzime, sadržaj vode i jonski broj (Ravindran, 2013). Jedan od načina da se osigura da egzogeni enzimi očuvaju svoju aktivnost do mesta na kome će delovati je inkapsulacija, kako bi postali otporni na uslove prilikom obrade hrane ili tokom prolaska kroz gastrointestinalni trakt. Svrha dodavanja enzima u hranu za životinje je poboljšanje efikasnosti hrane, zahteva proizvodnje i shodno tome, smanjenje troškova ishrane (Bedford, 2018).

Način delovanja svakog enzima je različit i međuzavisan. Njihova upotreba u kombinaciji sa formulacijama hrane mora da se sprovodi racionalno i pažljivo kako bi se postigao maksimalan efekat korišćenja. Enzimi deluju direktno ili indirektno na hranljive materije, imaju glavni efekat na supstrat na koji je usmeren, ali imaju i neke neželjene efekte. Na primer, u lignoceluloznom kompleksu, enzimi koji razgrađuju lignin će delovati na svoj supstrat kao glavni efekat, ali će delovati i na hranljive materije povezane sa ligninom (ugljeni hidrati ili proteini), kao neželjeni efekat (Beauchemin i sar., 2004).

U hrani za životinje se najčešće koriste enzimi celulitičkog enzimskog kompleksa (celulaza i pektinaza), enzimi za razgradnju neskrobnih polisaharida (β -glukanaza, ksilanaze, α -galaktozidaza), proteaze, amilaze i fitaza (Sinovec i Ševković, 1998). Upotrebom ovih enzima se omogućava perforiranje ćelijskih zidova i povećava dostupnost "zarobljenih" hranljivih sastojaka digestivnim enzimima, a istovremeno se hidrolizom NSP-a povećava i njihova iskoristljivost.

Dodavanje enzima može biti značajno i za ishranu preživara, mada se mehanizam razlaganja i usvajanja hranljivih materija kod njih bitno razlikuje u odnosu na nepreživare zbog činjenice da mikroflora njihovog digestivnog trakta

proizvodi sve neophodne enzime. U literaturi postoje navodi da je korišćenje proteolitičkih i amilolitičkih enzima u zamenama za mleko za mlade preživare veoma značajno u cilju boljeg korišćenja biljnih proteina i skroba. Takođe, u tovu junadi je značajno korišćenje celulaza, ali i multienzimskih preparata, radi efikasnijeg korišćenja kabaste hrane i koncentrata i smanjenja troškova ishrane (Matošić-Čajavec, 1983).

Veliki problem u ishrani nepreživara je prisustvo celuloznog kompleksa u hranivima biljnog porekla. Radi se o veoma dugim, nerazgranatim ili slabo razgranatim molekulima polisaharida za čije razlaganje monogastrične životinje nemaju enzime. Efikasnost iskorišćavanja ovakvih hraniva se može povećati upotrebom odgovarajućih enzimskih preparata koji sadrže celulolitičke enzime. Ovim se povećava količina šećera dostupnih organizmu, koji se oslobađaju delovanjem ovih enzima na celulozne supstrate. Takođe, dolazi i do razlaganja ćelijskih zidova biljaka i time se povećava dostupnost hranljivih materija digestivnim enzimima (Lyons i Walsh, 1993).

Skrob se kao nestrukturani ugljeni hidrat se bolje koristi kod nepreživara, ali pri unošenju velikih količina u digestivni trakt, jedan deo može proći potpuno neiskorišćen. Zbog toga se preporučuje dodavanje α -amilaze svim smešama namenjenim mladim i visokoproduktivnim životinjama čiji su obroci sastavljeni na bazi žitarica. Amilaza razlaže polisaharide na disaharide, konačno ih pretvarajući u monosaharide kao što su glukoza, fruktoza i galaktoza. Bolesne životinje koji ne mogu da svare masti uglavnom jedu šećer i ugljene hidrate kako bi nadoknadile nedostatak masti u ishrani. Ako smeša obiluje ugljenim hidratima, tada nastaje veći nedostatak enzima (Fierobe i sar., 2002). Amilaza ne razlaže samo ugljene hidrate, već i mrtve ćelije u gnoju. Kada u organizmu postoji nedostatak amilaze onda veća je verovatnoća za nastanak apscesa (Heinzelman i sar., 2009). Naročito je veliki značaj amilaze u ishrani prasadi koja nema dovoljno razvijen enzimski sistem za suhu hranu koja im se nudi već posle 10 dana života. Dodavanjem proteolitičkih enzima mogu se efikasnije koristiti smeše na bazi proteina biljnog porekla (Đorđević i Dinić, 2007).

Antinutritivne materije su supstance koje negativno utiču na zdravlje životinja zbog toga što ometaju procese varenja, resorpcije i iskorišćavanja hranljivih materija. One deluju na različite načine, od vezivanja važnih nutrijenata ili mineralnih materija i blokiranja njihove apsorpcije do direktne inhibicije enzima.

Najznačajnije antinutritivne materije u ishrani nepreživara su:

- neskrobni polisaharidi (NSP),
- galaktozidi,
- fitati i
- ostale antinutritivne materije, kao što su: lecitini, tanini i tripsin inhibitori (ove materije uglavnom ometaju rad endogenih enzima.)

Značajne antinutritivne materije u ishrani monogastričnih životinja su rastvorljivi neskrobni polisaharidi, pre svega β -glukani i arabinoksilani (pento-

zani). Oni su sastavni deo ćelijskih zidova žitarca, pri čemu su β -glukani najzastupljeniji u ječmu i ovsu, a pentozani u pšenici i raži. Beta glukani su polisaharidi napravljeni od molekula glukoze povezanih zajedno u dugačke lance koje monogastrične životinje ne mogu lako razložiti na prostija jedinjenja. Kako se radi o rastvorljivim i veoma dugačkim nerazgranatim ili slabo razgranatim molekulima, u digestivnom sistemu se stvaraju izrazito viskozni rastvori. Kao kod nesvarljivih vlakana, sadržaj u digestivnom traktu postaje do te mere viskoznan da se usporava peristaltika i dolazi do smanjenja dostupnosti hranljivih materija potrebnih za rast životinje (Whitcomb i Lowe, 2007). Primarni mehanizam antinutritivnih efekata aktivnosti rastvorljivog NSP se odnosi na njihova viskozna svojstva, koja posledično utiču na viskoznost vodene frakcije u sadržaju tankog creva. Povećan viskozitet himusa otežava difuziju čestica, smanjuje resorpciju hranjivih sastojaka i usporava pasažu crevnog sadržaja i delovanje enzima. Preterani viskozitet creva utiče na varenje i resorpciju hranljivih materija kod monogastričnih životinja smanjenjem transporta glukoze i natrijuma u epitelne ćelije i smanjenjem brzine oslobađanja enzima pankreasa i žučnih kiselina. Odgovarajući enzimi (β -glukanaze i arabinoksilanaze) mogu da razgrade ove komponente i tako smanje viskozitet himusa. Prisustvo β -glukana i pentozana u ishrani preživara ne predstavlja problem i mikroflora rumena proizvodi enzime potrebne za njihovo razlaganje. Međutim, negativan uticaj na monogastrične životinje, svinje i naročito živinu, je veoma izražen. Kod živine najčešće dolazi do pojave lepljivog fecesa.

Uključivanje ječma u hranu za živinu je ekonomski opravdano, ali prisustvo većih količina β -glukana u njemu onemogućava korišćenje većih količina ove žitarice. Brojnim istraživanjima su utvrđeni pozitivni efekti dodavanja β -glukanaze u hranu sa većim sadržajem ječma. Beta glukanaza hidrolizuje glukane prisutne u ovim sastojcima čime se smanjuje viskozitet digeste i pomaže se prirodna peristaltika, poboljšava proces varenja i povećava se ukupna nutritivna vrednost hrane za životinje. Utvrđeno je da β -glukanaza ne gubi u značajnoj meri aktivnost u uslovima koji vladaju u digestivnom traktu tako da dolazi do razlaganja β -glukana. Veoma je otporna na variranja temperature i pH vrednosti. Ovo omogućava uključivanje većih količina ječma u smeše za monogastrične životinje.

Uključivanje arabinoksilanaza (pentozanaza) u hranu zasnovanu na pšenici i pre svega raži, koje sadrže pentozane u većoj meri je imalo takođe pozitivne efekte. Pšenica je, pored kukuruza, najznačajniji sastojak hrane za svinje i brojle zbog toga što se, zbog malog sadržaja karotenoida u njoj, dobija meso poželjnih organoleptičkih karakteristika. Međutim, prisutni arabinoksilani predstavljaju antinutritivne faktore. U ispitivanjima koje su sprovedi Veldman i Vahl (1993) utvrđeno je da dodatak arabinoksilanaza u hranu pozitivno utiče na rast brojlera zbog toga što razlaže arabinoksilane u digestivnom traktu i tako smanjuju viskozitet himusa.

Zrna mahunarki se često koriste u ishrani nepreživara kao izvori proteina. Međutim, ona sadrže visok nivo NSP i oligosaharida koji imaju složeniju strukturu u odnosu na odgovarajuće materije prisutne u žitaricama. Naime, NSP mahunarki se uglavnom sastoje od pektinskih supstanci – galaktouronani, galaktani

i arabinani, za čiju razgradnju je neophodna složena enzimaska aktivnost. Veliki napredak u iskorišćavanju ovih proteinskih izvora bio bi postignut adekvatnim enzimskim delovanjem na NSP, ali takvi enzimi još nisu našli dovoljnu primenu (Chost, 2006).

Galaktozidi su galakto-oligosaharidi prisutni u većim količinama u sojinom zrnu i sačmi. Ova jedinjenja se ne razlažu u tankom crevu i fermentišu se u debelom crevu i izazivaju nadutost ili otežano varenje. Dodatkom enzima α -galaktozidaze, u obroke na bazi soje i nekih drugih mahunarki, postignuto je smanjenje nivoa α -galaktozida (Chost, 2006).

Još jedan, veoma značajan antinutritivni faktor u ishrani nepreživara je fitinska kiselina, odnosno njene soli – fitati. Oni vezuju fosfor u kompleks koji nepreživari u digestivnom sistemu ne mogu razgrađivati u većoj meri, te ga ne mogu iskoristiti. Pored fosfora, fitinska kiselina može da gradi komplekse i sa drugim mineralnim materijama (Ca, Mg, Cu, Fe, Zn), sa proteinima i aminokiselinama. Ovi kompleksi su teško rastvorljivi i zbog toga su niske usvojivosti, posebno za živinu.

Fosfor se svrstava u esencijalne elemente za metabolizam životinja zbog toga što učestvuje u više metaboličkih procesa nego i jedan drugi mineral. To su procesi transfera energije, formiranja koštanog tkiva, učešće u građi brojnih koenzima, u metabolizmu i funkciji nukleinskih kiselina i u razlaganju i biosintezi masnih kiselina. Potrebe u fosforu kod različitih vrsta životinja i kategorija su različite, a obezbeđuju se iz hraniva mineralnog, biljnog i životinjskog porekla. U njima je fosfor prisutan u organskim i neorganskim formama. U biljnim hranivima – zrnelju žitarca i leguminoza, kao i sporednim proizvodima prehrambene industrije, koji čine osnovu potpunih smeša za nepreživare on se nalazi u najvećoj količini u fitinskoj formi (i do 80 procenata). Iz hraniva mineralnog i životinjskog porekla, kao i iz nefitinske forme u hranivima biljnog porekla, fosfor se iskoristi i do 90 procenata, dok je njegova iskoristljivost iz fitinske forme do 40 odsto što zavisi od vrste hraniva kao i vrste životinja. Bolja je kod svinja nego kod živine (Ševković i sar., 1991).

Problem deficita fosfora se rešava na dva načina. Prvi je da se u obroke dodaju mineralna hraniva sa fosforom, što poskupljuje proizvodnju, predstavlja rizik po zdravlje ljudi i životinja i dugoročno ostvaruje negativan efekat na životnu sredinu. Drugi način je dodavanje enzima fitaze u obroke za nepreživare, što ima višestruko dejstvo. Pre svega, ovaj enzim hirolizuje fitate do inozitola i neorganskog fosfora, čime se usvajanje u digestivnom sistemu povećava za 50-60 procenata. Osim toga, oslobađaju se minerali i proteini, olakšava se delovanje digestivnih enzima i smanjuje se izlučivanje fosfora i azota u okolinu.

Fitaza može da se nađe u digestivnim sekretima (endogena), u pojedinim biljnim hranivima (biljna fitaza) i kao proizvod nekih plesni i bakterija (egzogena). Najveću produkciju fitaze imaju plesni iz roda *Aspergillus* i one se koriste za njenu industrijsku proizvodnju. Endogena i egzogena fitaza dopunjuju se i deluju u korelaciji, a da bi se bolje iskoristila biljna fitaza, smešama hrane se dodaju

enzimi koji razlažu neskrobne polisaharide zbog toga što su fitati locirani u aleuronskom sloju biljnih hraniva. Ti enzimi razlažu ćelijske zidove aleuronskog sloja i time olakšavaju delovanje fitaze. Brojna ispitivanja su dokazala da su kod smanjenog učešća fosfora mineralnog porekla u hrani za prasad, a uz dodatak fitaze, poboljšani prirast i konverzija hrane. Smanjenje neorganskog fosfora za oko 50 procenata ili bez njegovog dodatka u smešama za prasad dovodilo je do smanjenja prirasta za 3,2 odnosno 9,6 procenata i povećanja konverzije hrane za 7,9 odnosno 9,5 procenata. Dodavanjem fitaze smešama u kojima je dodat mineralni fosfor sa 50 procenata, povećan je prirast za 8,1 procenata, a konverzija hrane je smanjena za 10,8 procenata. Ukoliko je mineralni fosfor potpuno izostavljen iz obroka kod dodavanja fitaze, povećan je prirast za 22 procenta i poboljšano je iskorišćenje hrane za 9,1 procenat. Kod pilića kod kojih je u hrani smanjena količina iskoristivog fosfora i do 50 procenata, uz dodatak fitaze se postizani efekti u prirastu i iskorišćavanju hrane, kao i kod korišćenja smeša u kojima je obezbeđen iskoristljivi fosfor sa 100 odsto potreba, a bez dodatka fitaze (Ševković i sar., 1991). Augspurger i saradnici su (2003), utvrdili da se fosfor kod brojlera kod kojih je korišćena fitaza iz *Escherichia coli* oslobađa u manjoj meri (0,124 procenata na 500 fitazne jedinice (FTU) po kg) u poređenju sa 0,032 ili 0,028 procenata za ekvivalentnu dozu komercijalnih preparata koji potiču od *Aspergillus niger* ili *Peniophora licii* fitaze, tim redosledom. Ovi rezultati ukazuju da efikasnost fitaze hranu u velikoj meri varira u zavisnosti od porekla.

U eksperimentalne ili komercijalne svrhe može da se koristi jedna vrsta ili mešavina više enzima. Utvrđeno je da se bolji rezultati postižu upotrebom adekvatne smeše enzima u odnosu na korišćenje pojedinačnih enzima (Đorđević i Dinić, 2007).

Redukcija viskoziteta himusa, usled prisutva β -glukana, može biti postignuta pomoću jednog enzima, β -glukanaze, koji će dugački lanac polimera prekinuti na nekoliko mesta. Time se postiže smanjenje viskoziteta himusa i sprečava pojava lepljivog fecesa kod živine. Međutim, dodavanjem multienzimskih preparata, koji sadrže adekvatnu kombinaciju saharolitičkih enzima (celulolitički enzimi, β -glukanaze, arabinoksilaze, galaktozidaze), pored smanjenja viskoziteta himusa, postiže se i potpunije razlaganje ćelijskih zidova, naročito ćelija koje se nalaze van endosperma i čiji se ćelijski zidovi teže razgrađuju. Tako dolazi do povećanja dostupnosti različitih hraniva za delovanje digestivnih enzima i time do njihovog boljeg iskorišćenja. Takođe je, u ushrani prasadi nakon zalučenja, usled nepripremljenosti digestivnog sistema, potrebno dodavati odgovarajuće enzimske preparate koji sadrže amilaze i proteaze radi boljeg iskorišćavanja skroba i proteina u obrocima zasnovanim na žitaricama. Korišćenje multienzimskih preparata se pokazalo pogodnim kada se u hranu dodaju mahunarke kao izvor proteina, radi razlaganja složenih pektinskih supstanci koje se nalaze u njima.

Da bi ostvarili svoju funkciju, enzimi treba da sačuvaju aktivnost, kako za vreme procesiranja hrane, tako i u gastrointestinalnom traktu životinje. Enzimi koji se dodaju hrani za životinje su mikrobiološkog porekla (plesni, bakterije) i stabilni su na temperaturama okoline. Međutim, aktivnost im naglo opada na

temperaturama iznad 60 °C. U procesu peletiranja se postižu temperature iznad 60-70 °C, tako da je određeni gubitak enzimske aktivnosti neizbežan. Uočeno je, da enzimi inkorporirani u pelete, preživljavaju takve uslove u značajno većoj meri nego enzimi izloženi istim uslovima u rastvoru. To je zbog toga što je toploti potrebno određeno vreme da prodre u pelete, kao i zbog zaštitnog dejstva složenih organskih jedinjenja koja okružuju enzime. Mogući negativni efekat peletiranja na aktivnost enzima može biti izbegnut posebnim procesom dodavanja enzima nakon peletiranja kao što je prskanje tečnim preparatom enzima. Optimalan pH za enzime bakterijskog porekla je oko 7, a za enzime poreklom od plesni uglavnom je u intervalu između 4 i 6. Većina takvih enzima bi zato trebala da bude efikasna u uslovima koji vladaju u tankom crevu, gde je pH vrednost blizu 7. Često se u hranu dodaje mešavina enzima poreklom od plesni i od bakterija kako bi se obezbedila aktivnost u što širem intervalu pH vrednosti. Da bi ostvarili svoju ulogu u tankom crevu, enzimi moraju da prežive uslove koji vladaju u kranijalnim segmentima digestivnog sistema, pre svega u želucu. Utvrđeno je da većina enzima u velikoj meri preživljava uslove koji vladaju u želucu zbog zaštitnog dejstva drugih materija u sastavu hrane, kao i zbog njihove otpornosti na „napad” proteolitičkih enzima želuca. Iako većina enzima koji se dodaju hrani za životinje ne ispoljava aktivnost u želucu, treba istaći da bi dodavanje enzima koji bi pokazali takvu aktivnost imalo veoma pozitivne efekte (Chesson, 1993).

BUDUĆI RAZVOJ ENZIMA U ISHRANI ŽIVOTINJA

Enzimi se mogu dobiti od životinja, biljaka ili mikroorganizama. U početku je njihova upotreba bila ograničena poteškoćama u proizvodnji, kao i slabom stabilnošću. Međutim, trenutni biotehnološki napredak omogućava proizvodnju biološki aktivnih enzima u velikim količinama (McAllister i sar, 2001).

Razvoj tehnologije rekombinantne DNK (rDNA) omogućio je izolaciju i ekspresiju gena nekih mikroorganizama, kao što su *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces lactis* i *Trichoderma reesei* i proizvodnju enzima za industrijsku upotrebu. Proteinski inženjering se koristi za karakterizaciju i optimizaciju performansi enzima za specifične industrijske primene kao što su: promena pH, termička stabilnost i stabilnost protiv hemijske oksidacije i promene zahteva za kofaktorima kao što su joni metala (Pariza i Cook, 2010).

Industrija posvećena proizvodnji hrane za životinje treba da usmeri svoje napore u istraživanja o razvoju i dizajnu novih enzima koji mogu imati ključnu ulogu u poboljšanju i nutritivnom kvalitetu hrane. Razvoj termostabilnih enzima će pojednostaviti primenu predgranulacije suvog proizvoda i promovisaće upotrebu enzima u granuliranoj hrani. Da bi se to postiglo, neophodno je da se nastavi rad na racionalnom redizajniranju postojećih enzima i standardizaciji kombinatorne metode koja usavršava željenu funkcionalnost enzima, kao i korišćenje robusnih računarskih metoda u kombinaciji sa skrining tehnologijama koje

su usmerene na poboljšanje svojstava enzima i primenu višestepenih reakcija korišćenjem multifunkcionalnih enzima (Adrio i Demain, 2014).

Upotreba enzima u hrani za životinje je dinamična oblast istraživanja i razvoja. Sadašnja istraživanja imaju za cilj da procene njihov uticaj na zdravlje i mikrofluoru creva životinja, kao i da se utvrdi da li postoji ili ne, sinergistički efekat između sastava hrane i enzimskog delovanja na poboljšanje svarljivosti, zdravlje creva i proizvodne rezultate. Potraga za novim izvorima dobijanja enzima za upotrebu u hrani za životinje je trenutni fokus naučnika. Važan aspekt za istraživanje koji u industriji hrane za životinje i u stočarstvu može biti primenjen kao faktor zaštite životne sredine je razvoj enzima koji su otporni na varijabilne uslove u gastrointestinalnom traktu preko novih načina inkapsulacije i zaštite datih materija.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Adrio J.L., Demain A.L. 2014. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4, 117–39.
2. Augspurger N.L., Webel D.M., Lei X.G., Baker D.H. 2003. Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. *J. Anim. Sci.* 81:474–83.
3. Bedford M.R. 2018. The evolution and application of enzymes in the animal feed industry: The role of data interpretation. *Br. Poult. Sci.*, 59, 486–93.
4. Blair B., Jacob J. 1995. Feeding animals to minimized pollution from manure: The science of eco-nutrition. Personal communication.
5. Chesson A. 1993. Feed enzymes; *Animal Feed Science and Technology*, 45, s. 65-79.
6. Chost M. 2006. Enzymes for the feed industry; *World's Poultry Science Journal*, Vol. 62, 5-15.
7. Đorđević N., Dinić B. 2007. Hrana za životinje. Cenzore tech-Europe d.o.o. Aranđelovac, Srbija.
8. Fierobe H.P., Bayer E.A., Tardif C., Czjzek M., Mechaly A., Belaich A. et al. 2002. Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. Substrate targeting versus proximity of enzyme components. *J. Biol. Chem.*, 277: 49621-30.
9. Greiner R., Konietzny U. 2006. Phytase for food applications. *Food Technol. Biotechnol.* 44(2): 125-140.
10. Heinzelman P., Snow C.D., Wu I., Nguyen C., Villalobos A., Govindarajan S. et al. 2009. A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106: 5610-5.
11. Lyons T.P., Walsh G.A. 1993. Application of enzymes in feed manufacturing; *Enzymes in animal nutrition, Proceedings of 1st Symposium Kartause Ittingen, Switzerland, October 13-16.*
12. Matošić-Čajavec V. 1983. Prikaz rezultata primjene pojedinih inertnih punila u hranidbi životinja, *Krmiva*, 25, 228-32.
13. McAllister T.A., Hristov A.N., Beauchemin K.A., Rode L.M. Cheng, K.J. 2001. Enzymes in ruminant diets. *Enzym. Farm Anim. Nutr.* 273–98.
14. Ojha B.K., Singh P.K., Shrivastava N. 2019. Enzymes in the Animal Feed Industry. In *Enzymes in Food Biotechnology*; Mohammed, K., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 93–109.
15. Pariza M.W. 2010. Cook, M. Determining the safety of enzymes used in animal feed. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56, 332–42.
16. Sinovec Z., Ševković N. 1998. primena biotehnologije u ishrani životinja. VI savetovanje o

primeni premiksa u stočnoj hrani. Zbornik radova, 3-14. **17.** Ševković N., Pribićević S., Rajić I. 1991. Ishrana domaćih životinja; Beograd, Naučna knjiga. **18.** Veldman A., Vahl H.A. 1993. Xylanase in wheat-based broiler diets; Enzymes in animal nutrition, Proceedings of the 1st Symposium Kartause Ittingen, Switzerland, October 13-16. **19.** Whitcomb D.C., Lowe M.E. 2007. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.*, 52(1): 1-17. **20.** Yin Y.L., Baidoo S.K., Jin L.Z., Liu Y.G., Schulze H., Simmins P.H. 2001. The effect of different carbohydrase and protease supplementation on apparent (ileal and overall) digestibility of nutrients of five hullless barley varieties in young pigs. *Livest. Prod. Sci.* 71, 109-20.

THE USE OF ENZYMES IN INCREASING FEED DIGESTION AND PROTECTING THE ENVIRONMENT

**Dejan Perić, Radmila Marković, Stamen Radulović, Svetlana Grdović,
Dragoljub Jovanović, Dragan Šefer**

Summary

The demand for proteins of animal origin continues to grow with the increase in the number of people on planet earth. A clear task has been set before the scientific and professional public, namely the continuous availability of meat, milk, eggs and fish. The growth of the intensive livestock sector is placing enormous demands on the world's natural resources and, as has been widely reported, will lead to increased greenhouse gas emissions and greater environmental impacts, taking our food systems far beyond the planet's boundaries. The primary critical environmental factors are manure volume, manure nitrogen and phosphorus content, methane production, and odor. The sustainability of animal protein production is now the main and central task imposed on humanity, and calls for change are widespread. There are many ways to mitigate the harmful effects of animal husbandry on the environment, and one of the most modern is the industrial application of enzymes in animal feed. Enzymes, which are considered biological catalysts, are proteins capable of accelerating the rate of chemical reactions, which are necessary for the proper cellular functioning of all living beings. Due to their diversity, specificity and catalytic capacity, they are widely accepted by the scientific and industrial community. Although they have long been known in science, enzymes, as functional additives, have only been used in the animal feed industry in the last few decades. We distinguish between endogenous enzymes, which are created in the digestive system, plant enzymes, from various plant nutrients, and exogenous enzymes produced by various bacteria and molds. The aim of adding enzymes is to supplement the activity of endogenous animal enzymes, to remove anti-nutritive substances (glucans, phytates) from certain nutrients, to increase the energy and nutritional value of nutrients based on greater availability of certain nutrients for resorption, as well as to reduce the excretion of unused nutrients into the external environment, which fits into the concept of environmental protection. The search for new sources of enzymes for use in animal feed is the current focus of scientists. An important aspect for research that can be applied in the animal feed industry and in animal husbandry as an environmen-

tal protection factor is the development of enzymes that are resistant to changing conditions in the gastrointestinal tract through new ways of encapsulation and protection of given substances.

Key words: *animal nutrition, enzymes, environmental protection, nutritional strategy*

**BALANCED PROTEIN IN LAYER DIETS TO IMPROVE
BIRDS' WELFARE**

**IZBALANSIRANI SADRŽAJ PROTEINA U ISHRANI KOKA NOSILJA
SA CILJEM UNAPREĐENJA DOBROBITI**

Akram El Kadi¹, Dragan Šefer², John Willis³

Abstract

Balanced protein content in poultry diets has the potential to significantly reduce Nitrogen (N) excretion and consequently improve litter quality, flock health and bird welfare while maintaining growth performance. It is a common practice to set minimum requirements for protein, energy, minerals, and amino acids in the formula. An unbalanced amino acid will be used as an expensive nutrient source, degraded, and subsequently excreted. The excesses are excreted and eventually contribute to environmental pollution and birds' health related problems.

Recent experiments have shown that reductions of dietary Crude Protein (CP) by 30g/kg did not affect growth or carcass parameters, while improving litter quality. A study was conducted with 5,000 broilers, the study showed that growth performance was not affected with reductions of dietary CP to ~180g/kg while N utilization and footprint quality were improved, and litter volume was reduced ($P < 0.05$). These findings confirm that dietary CP levels can be reduced while balancing the Amino Acid (AA) profile without impairing performance. This is further accompanied by improved litter/waste management and overall flock health and welfare. However, there appears to be a threshold where further CP reductions negatively influence performance, especially in terms of Feed Conversion Ratio (FCR) and increased fat deposition.

For example, in July 2021, the Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs of the Republic of Korea announced to revise the standards and specifications to limit the content of Crude Protein in major Livestock feeds and they will firstly apply this on pig feeds in December 2024.

Additional studies have shown that reduced protein diets and amino acid concentration alter the intestinal barrier functions. The study showed that reducing dietary protein, without supplementation of all the essential amino acids will increase the effect of aflatoxins on broiler performance and nutrient utilization.

¹Engineer, Akram El Kadi, Technical Sales Manager, National Feed, Abu Dhabi, United Arab Emirates

²Dr Dragan Šefer, full professor, University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

³Dr John Willis, Poultry Nutritionist, National Feed, Abu Dhabi, United Arab Emirates

*contact person e-mail: elkadiakram@gmail.com

Our commercial experiment at National Feed uses reduced CP using Corn/Soybean Meal Diet and focused mainly on AA limitations such as addition of L-Lysine 95%, and increased ratios of essential AA, for example, DL-Methionine Liquid 88% (Liquid MHA), L-Threonine, L-Arginine and L-Valine. Reductions in CP levels in isoenergetic conditions are also accompanied with considerable changes in dietary factors such as:

- *Soybean meal content is reduced and to higher lysine HCl supplementation levels*
- *Inclusion level of Corn is increased (thus, higher levels of starch in the diet)*
- *Inclusion level of oils is reduced (leading to lower levels of dietary crude fat and changes in the starch: lipid ratio)*

The above three points are under investigation with their influence factors on the layer performance. Two-layer diets are being used on the production cycle starting at 18 weeks of age. Layer 16% as the control diet to the farm compared to our balanced protein feed. In this context, the following factors were assumed to have impact on the utilization of reduced-CP diets and therefore we are monitoring the layers Egg Production (EP), Birds Body Weight (BW), and Feed Consumption (FC) for the coming 20 weeks. Feed samples were collected for proximate, mineral analysis, and amino acid analysis.

Key words: *amino acids, balanced protein, body weight, egg production*

Kratak sadržaj

Izbalansirani sadržaj proteina u ishrani živine ima potencijal da značajno smanji izlučivanje azota (N) i posledično poboljša kvalitet legla, zdravlje jata i dobrobit ptica uz održavanje performansi rasta. Uobičajena je praksa da se u formulaciji smeša postavljaju minimalni zahtevi za proteine, energiju, minerale i aminokiseline. Neuravnotežena aminokiselina će se koristiti kao skup izvor hranljivih materija, razgraditi i potom izlučiti. Višak se izlučuje i na kraju doprinosi zagađenju životne sredine i zdravstvenim problemima ptica.

Nedavni eksperimenti su dokazali da smanjenje količine sirovog proteina u ishrani (CP) za 30 g/kg nije uticalo na rast ili parametre trupa, dok je istovremeno poboljšavalo kvalitet prostirke. Studija je sprovedena sa 5 000 brojlera i dokazala je da na performanse rasta nije uticalo smanjenje CP u ishrani na ~180g/kg, dok su iskorišćenost N i kvalitet jastučića bili poboljšani, a zapremina prostirke je bila smanjena ($P < 0,05$). Ovi nalazi potvrđuju da se nivoi CP u ishrani mogu smanjiti uz balansirane profile aminokiselina (AA) bez narušavanja performansi. Ovo je dalje praćeno poboljšanim upravljanjem prostirkom/otpadom i ukupnim zdravljem i dobrobiti jata. Međutim, izgleda da postoji prag gde dalje smanjenje CP negativno utiče na performanse, posebno u pogledu odnosa konverzije hrane (FCR) i povećanog taloženja masti.

Na primer, u julu 2021. godine, Ministarstvo poljoprivrede, hrane i ruralnih pitanja Republike Koreje je najavilo reviziju standarda i specifikacija kako bi se ograničilo sadržaj sirovih proteina u namirnicama i prvo će to primeniti na hranu za svinje u decembru 2024. godine. Dodatne studije su ukazale da smanjenje proteina i koncentracije aminokiselina u obroku menjaju funkcije crevne barijere. Studija je dokazala da će

smanjenje proteina u ishrani, bez suplementacije svim esencijalnimh aminokiselinama, povećati efekat aflatoksina na performanse brojlera i iskoristivost hranljivih materija.

Naš komercijalni eksperiment u National Feed kompaniji podrazumeva smanjeni CP koristeći obrok od kukuruznog/sojinog brašna i fokusiran je uglavnom na ograničenja AA kao što je dodavanje L-lizina 95% i povećani odnosi esencijalnih AA, na primer, DL-metionin tečni 88% (tečni MHA), L-treonin, L-arginin i L-valin. Smanjenje nivoa CP u izoenergetskim uslovima je takođe praćeno značajnim promenama faktora u ishrani kao što su:

- Sadržaj sojine sačme je smanjen i na viši nivo dodatka lizina i HCl
- Povećava se nivo inkluzije kukuruza (dakle, viši nivoi skroba u ishrani)
- Nivo uključenosti ulja je smanjen (što dovodi do nižih nivoa sirove masti u ishrani i promena u odnosu skrob : lipidi

Gore navedene tri tačke se istražuju sa svojim faktorima uticaja na performanse prostirke. U proizvodnom ciklusu se koriste dve vrste smeša, počevši od 18 nedelja starosti. Nivo od 16% proteina je služio kao kontrolna grupa na farmi u poređenju sa našom uravnoteženom proteinskom hranom. U ovom kontekstu, pretpostavljeno je da će sledeći parametri uticati na korišćenje ishrane sa smanjenim CP i stoga ih pratimo: proizvodnja jaja (EP), telesna masa ptica (BW) i potrošnja hrane (FC) za narednih 20 nedelja. Uzorci stočne hrane su sakupljeni za hemijsku analizu, analizu sadržaja minerala i analizu sadržaja amino kiselina.

Ključne reči: aminokiseline, izbalansirani proteini, proizvodnja jaja, telesna masa

TEMATSKO ZASEDANJE VI
PLENARY SESSION VI

**HEMATOLOŠKE I BIOHEMIJSKE ANALIZE KRVI U
PROCENI ZDRAVSTVENOG STANJA ŽIVOTINJA**
***HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL BLOOD
ANALYSES IN ASSESSMENT OF
THE ANIMAL HEALTH STATUS***

ULOGA RACIONALNE I TAČNE LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE U SAVREMENOJ VETERINARSKOJ MEDICINI

Andelo Beletić

Kratak sadržaj

Laboratorijska dijagnostika je nezaobilazna u biomedicinskom području, a samim tim i u veterinarskoj medicini, gde obuhvata različite discipline i nalazi brojne primene. Zahvaljujući naprednim tehnološkim rešenjima, postalo je moguće i da se pojedina testiranja obave „uz pacijenta“ tj. van laboratorije. Laboratorijski dijagnostički proces se u cilju lakšeg razumevanja, osmišljavanja i sprovođenja deli na tri faze: preanalitičku, analitičku i postanalitičku. U radu je na sažet način prikazan (pato)biološki/klinički i analitički značaj svake pojedinačne faze laboratorijskog dijagnostičkog procesa, sa posebnim naglaskom na specifičnosti u veterinarskoj medicini. Naglašeni su oni segmenti za čiju je uspešnu realizaciju ključna saradnja kliničara i stručnjaka iz oblasti laboratorijske dijagnostike: izbor testova, priprema pacijenta, konsultacije vezane za tumačenje dobijenih nalaza i slično. U prikazu analitičke faze naglašena je činjenica da stručnjaci iz oblasti laboratorijske dijagnostike moraju posedovati i usaglašavati multidisciplinarna znanja kako bi osigurali kvalitet laboratorijske dijagnostike. Zaključak ukazuje na pokazatelje unapređenja koji se odnose na dinamičnu interakciju između laboratorijske dijagnostike i kliničke veterinarske medicine.

Ključne reči: interpretacija, laboratorijska dijagnostika, metodologija, preanalitika, veterinarska medicina

UVOD

Sveobuhvatni napredak laboratorijske dijagnostike osigurava da ova disciplina nosi epitepe racionalne i tačne, te da bude nezaobilazna u biomedicinskom području, a samim tim i u veterinarskoj medicini. Laboratorijska dijagnostika u kliničkoj veterinarskoj medicini tj. klinička patologija obuhvata ispitivanja iz oblasti kliničke hemije, hematologije, hemostaze, transfuziologije, citologije, endokrinologije i imunohemije. Nalazi su neophodni za postavljanje dijagnoze, praćenje odgovora na terapiju, prognostičke procene, otkrivanje faktora rizika i dr. (Arnold i sar., 2019). Takođe je veoma važna činjenica da u cilju pružanja što kvalitetnije, efikasnije i bezbednije veterinarske zdravstvene zaštite u ambulanta-

¹Dr EuSpLM, Andelo Beletić, viši naučni saradnik; Centar za medicinsku biohemiju, Univerziteti klinički centar Srbije, Beograd, R. Srbija i Laboratorija za proteomiku, Klinika za unutarnje bolesti, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
*e-mail autora za korespondenciju: andjelo.beletic78@gmail.com

ma i klinikama postaje sve zastupljenije *Point-of-care* testiranje (POCT) odnosno testiranje „uz pacijenta“ tj. van kliničke laboratorije. Tehnološka rešenja POCT uređaja mogu varirati od veoma jednostavnih (npr. trake za analizu urina), preko jednostavnih mernih instrumenata poput glukometara, do manjih biohemijskih i hematoloških, odnosno gasnih analizatora. No, ono što je za sve POCT uređaje zajedničko je da su veoma jednostavni za rukovanje, da za njihovo korišćenje nije potrebno posebno obrazovanje iz oblasti laboratorijske dijagnostike, ali i da je potrebno veoma precizno definisati situacije kada je dobijene nalaze obavezno proveriti klasičnim laboratorijskim testiranjem (Flatland i sar., 2013).

Laboratorijski dijagnostički proces se u cilju lakšeg razumevanja, osmišljavanja i sprovođenja deli na tri faze: preanalitičku, analitičku i postanalitičku. Takođe, „upravljanje“ kvalitetom celokupnog procesa ispitivanja je *sine qua non* savremene laboratorijske dijagnostike. Nivo kvaliteta koji je potrebno dostići zavisi od brojnih faktora (vrste laboratorije odnosno ustanove čiji je ona deo, raspoloživosti kadrova sa odgovarajućim znanjem i iskustvom, opremljenosti i troškova), pri čemu polazne elemente za njegovo definisanje predstavljaju propisi, procedure i uputstva. Nakon toga je neophodno proceniti u kom stepenu postignuti nivo kvaliteta rada odgovara onom koji je definisan kao potreban i u tom cilju su na raspolaganju postupci kontrole odnosno ocenjivanja kvaliteta. Kontrola kvaliteta obuhvata primenu statističkih metoda za procenu da li su analitičke karakteristike metoda u skladu sa neophodnim nivoom kvaliteta. Kada se ove aktivnosti dopune praćenjem pre- i postanalitičke faze, kao i kada se prošire učešćem laboratorija u programima spoljašnje kontrole, govori se o ocenjivanju kvaliteta. Ukoliko se otkriju odstupanja između neophodnog i postignutog nivoa kvaliteta kroz aktivnosti unapređenja kvaliteta se otkrivaju uzorci neslaganja i planira njihovo uklanjanje. U zavisnosti od laboratorijske discipline postoje specifičnosti u „upravljanju“ kvalitetom (Klee and Westgard, 2018).

Cilj rada je da na sažet način prikaže elemente odnosno (pato)biološki/klinički i analitički značaj svake pojedinačne faze laboratorijskog dijagnostičkog procesa, sa posebnim naglaskom na specifičnosti u veterinarskoj medicini.

PREANALITIČKA FAZA

Preanalitička faza obuhvata izbor testova, uzorkovanje biološkog materijala, transport u laboratoriju i pripremu za ispitivanje. U velikom delu ona zahteva saradnju kliničara i stručnjaka za laboratorijsku dijagnostiku, te je veoma izazovna, o čemu svedoče i podaci vezani za humanu laboratorijsku medicinu koji govore da se tokom preanalitičke faze javlja i do 70 procenata grešaka (Plebani i sar., 2015). Izbor testova predstavlja veoma važan korak u preanalitičkoj fazi i najčešće ga obavlja kliničar, u skladu sa dijagnostičkom „situacijom“. Međutim, neretko postoji potreba i za konsultacijom stručnjaka iz oblasti laboratorijske dijagnostike u vezi osetljivosti i specifičnosti testova, dodatnih ispitivanja i mogućnosti interferencija. Dobar primer u ovom smislu predstavljaju endokrinološka testiranja, kod kojih je ključno poznavanje uticaja preanalitičkih faktora:

fiziološke fluktuacije u nivou hormona, uticaja bioloških faktora, stresa, gladovanja, prisustva komorbiditeta i jatrogenih efekata. Dragoceni „alat“ u ovoj oblasti predstavljaju vodiči, koji sadrže precizne algoritme koji test izabrati, koliko često testirati i kako pripremiti pacijenta (Arnold i sar., 2019; Behren i sar., 2018).

Za preanalitičku fazu je neophodno da budu dostupna i precizna uputstva o vrsti uzorka za ispitivanje (serum, plazma, puna krv, urin, likvor), načinu uzorkovanja (mesto, tehnika, redosled ukoliko se uzima više uzoraka, antikoagulans, konzervans) i transporta, čuvanja i laboratorijske pripreme. Takođe, za pojedine vrste životinja, poput ptica i gmizavaca, potrebno je pripremiti posebna uputstva. U cilju zaštite laboratorijskog osoblja ključno je da postoji i primenjuje se procedura o postupanju sa uzorcima ukoliko postoji sumnja na zoonozu. Komunikacija laboratorijskog i kliničkog osoblja se nastavlja i nakon dostavljanja (ukoliko je potrebno) dopuniti podatke na pratećoj dokumentaciji odnosno, ukoliko uzorak nije prihvatljiv za laboratorijsko ispitivanje (neodgovarajuća vrsta biološkog materijala, koagulisao uzorak krvi uzete sa antikoagulansom, nedovoljna količina uzorka, hemolizirani uzorci) (Arnold i sar., 2019; American Society for Veterinary Clinical Pathology: Draw Order Guideline).

ANALITIČKA FAZA

U najkraćem, analitička faza započinje izborom odgovarajućih metoda ispitivanja, koje se zatim validiraju, odnosno verifikuju. Nakon toga, otpočinje „rutinska“ primena metode, uz stalnu kontrolu kvaliteta odnosno statističku procenu preciznosti i tačnosti. Za razliku od preanalitičke faze, sve aktivnosti u analitičkoj fazi su u potpunoj odgovornosti stručnjaka iz oblasti laboratorijske dijagnostike, odnosno kliničke patologije (Arnold i sar., 2019).

Inicijalni kriterijumi za izbor metode se ne razlikuju između humane i veterinarske medicine. Neophodno je da preciznost i tačnost metode odgovaraju kliničkoj nameni, da postoji mogućnost automatizacije, da su prihvatljivi troškovi, da je moguća nabavka odgovarajućih instrumenata i kompleta reagenasa (Arnold i sar., 2019). Međutim, za laboratorijsku dijagnostiku u veterinarskoj medicini je specifično i od ključnog značaja pitanje: da li je metoda podjednako prihvatljiva za različite životinjske vrste? Odgovor zavisi od parametra koji se određuje, principa na kome se metoda zasniva, kao i discipline u okviru laboratorijske dijagnostike. Struktura metabolita je identična kod svih životinjskih vrsta kod kojih su prisutni, što ukazuje da se identične spektrofotometrijske metode, koje se takođe koriste i u humanoj laboratorijskoj medicini, mogu koristiti za analizu u uzorcima dobijenim od različitih životinjskih vrsta. Isti zaključak je primenljiv i za aktivnost enzima, budući da se određivanje zasniva na promeni koncentracije supstrata ili proizvoda reakcije koju katalizuju. Analogno tome i elektrohemijske metode za elektolite i gasove nemaju ograničenja u primeni. Međutim, izbor postaje složeniji ukoliko se metoda zasniva na imunohemijskim principima, odnosno kada se analiziraju pojedinačni proteinski biomarkeri. Između vrsta postoji manja ili veća razlika u strukturi pojedinačnih proteina, a i

razlike u matriksu uzorka, koje se takođe mogu pojaviti, utiču na kalibraciju imunoeseja. Dodatno, izuzetno je komplikovano u prihvatljivoj meri prečistiti protein koji bi se onda koristio kao kalibrator, dok primenu rekombinantnih proteina u tom smislu ograničavaju postranslacione modifikacije koje utiču na kinetiku reakcije sa odgovarajućim antitelima. Tako na primer, prilikom određivanja C-reaktivnog proteina, veoma značajnog markera inflamacije, u uzorcima dobijenim od pasa se može pojaviti izuzetno velika varijacija u zavisnosti od metode koja se koristi. Međutim, postoje i proteini, kao što je troponin I, čija je struktura veoma slična kod različitih vrsta, pa se čak prilikom analize, imunoeseji mogu kalibrisati i korišćenjem humanog troponina I. Za očekivati je da će planirane aktivnosti na harmonizaciji imunoeseja dodatno unaprediti ovu oblast dijagnostike (Eckersall, 2019). Poznavanje specifičnosti različitih životinjskih vrsta ključno je prilikom izbora analizatora za hematološka ispitivanja, a treba imati na umu da se iz istih razloga za hematološke analize kod ptica, riba i egzotičnih životinjskih vrsta koriste „ručne“ tj. metode sa hemocitometrom i mikroskopske analize razmaza (Arnold i sar., 2019).

Validacijom metode se utvrđuje da li je greška u dobijenim rezultatima prihvatljiva za kliničku namenu ispitivanja. Validacija je neophodna kod novih metoda razvijenih u samoj laboratoriji (*in house* metode), kao i ukoliko su postojeće metode modifikovane (primena za ispitivanje uzoraka od drugih životinjskih vrsta, promena biološkog materijala, modifikacija reagenasa, reakcionih uslova i mernih principa). Obavezno je u sklopu validacije odrediti analitičku nepreciznost i odstupanje, kao i opseg referentnih vrednosti i/ili *cut-off* vrednosti za određene „kliničke odluke“. Dodatno se preporučuje da podaci o validaciji uključuju i opseg merenja, limit detekcije (ukoliko se veoma niske vrednosti od kliničkog značaja) i uticaj najčešćih interferencija (hemolize, lipemije, hiperbilirubinemije). U kliničkim laboratorijama se najvećim delom koriste komercijalni kompleti reagenasa, te je u njima dominantno zastupljen postupak verifikacije, koji je jednostavniji i za cilj ima da eksperimentalno dokaže da karakteristike metode odgovaraju navodima proizvođača. Nezavisno od toga da li se sprovodi validacija ili verifikacija metoda, od suštinskog značaja je da sve eksperimentalne procedure budu u skladu sa preporukama profesionalnih udruženja (Arnold i sar., 2019; Friedrichs i sar., 2012).

Tokom „rutinske“ primene metode neophodno je pridržavati se preporuka za uslove radne sredine u laboratoriji, proveravati kvalitet vode, kalibrisati i održavati laboratorijski pribor, odnosno pratiti uputstva proizvođača za održavanje instrumenata. Međutim, posebna pažnja se uvek poklanja kontroli kvaliteta. Podaci koji se statistički obrađuju dobijaju se analizom kontrolnih materijala, zajedno sa uzorcima pacijenata. Koliko često će se analizirati kontrolni uzorci zavisi od karakteristika metode, utvrđenih kroz validaciju, kliničkog značaja testa i vremena koje je na raspolaganju da se koriguje pogrešan rezultat (Arnold i sar., 2019). Inicijalno se tačnost metode može proceniti poređenjem dobijenih rezultata sa ciljnim, odnosno opsegom prihvatljivih vrednosti, koje definiše proizvođač kontrolnog materijala. Dodatne podatke pruža primena *Westgard*-ovih kon-

trojnih pravila, kojima se na osnovu više rezultata analize kontrolnih materijala procenjuje verovatnoća prisustva slučajne ili sistematske greške (Westgard i sar., 1981). Detaljniju procenu tačnosti i preciznosti metode omogućava statistička analiza odnosno poređenje sa ciljnim „nivoom kvaliteta“, koji se najčešće definiše na osnovu ukupne dozvoljene greške, parametra koji u sebi kombinuje nepreciznost (slučajnu grešku) i odstupanje (sistematsku grešku), te omogućava da se odredi prihvatljiva varijacija u metodi koja ne utiče na kliničku interpretaciju rezultata (Nabity i sar., 2018; Harr i sar., 2013). Takođe, za definisanje ciljnog „nivoa kvaliteta“ mogu poslužiti i *cut-off* vrednosti za određene „kliničke odluke“, kao i podaci o biološkoj varijabilnosti (Arnold i sar., 2019). Kontrola kvaliteta se dodatno nadograđuje učešćem laboratorije u programima spoljašnje kontrole kvaliteta. Organizator programa dostavlja laboratorijama uzorke, najčešće četiri puta godišnje. Po obavljenoj analizi, rezultati se prikupljaju, statistički analiziraju poređenjem sa rezultatima dobijenim u drugim laboratorijama istom ili različitom metodom i statistički izveštaji se vraćaju stručnjacima u laboratorijama učesnicama na tumačenje i planiranje korektivnih mera, ukoliko se za njima ukaže potreba. Iako je značaj spoljašnje procene kvaliteta neupitan, treba imati na umu da ona predstavlja retrospektivnu evaluaciju, te kao takva ne može zameniti svakodnevnu kontrolu kvaliteta. Dostupan je spisak udruženja i kompanija koje organizuju programe spoljašnje kontrole kvaliteta, a međulaboratorijsko poređenje, odnosno analiza usklađenosti rezultata dobijenih analizom istih uzoraka u više laboratorija, smatra se prihvatljivom alternativom kada nije moguće učestvovanje u programima spoljašnje kontrole kvaliteta (Camus i sar., 2015). Važno je napomenuti da je prilikom planiranja i sprovođenja kontrole odnosno ocenjivanja kvaliteta potrebno uzeti u obzir i razlike u (pato)fiziološkim karakteristikama između životinjskih vrsta, kao i specifičnosti pojedinih disciplina (hematologija, citologija, transfuziologija) u oblasti kliničke patologije (Arnold i sar., 2019).

POSTANALITIČKA FAZA

Postanalitička faza obuhvata verifikaciju rezultata ispitivanja, pripremu i distribuciju izveštaja, konsultacije na zahtev kliničara, kao i adekvatno čuvanje uzoraka i rezultata u određenom vremenskom roku. Sve češće se pojmom post-postanalitičke faze označava učešće stručnjaka iz oblasti laboratorijske dijagnostike u krajnjem prisajedinjavanju laboratorijskih nalaza ostalim elementima dijagnostičkog procesa, formiranju preporuka za dalja testiranja i lečenje, kao i proceni zdravstvenih ishoda. U ovoj fazi je takođe prisutna saradnja sa kliničarima, koja je još izraženija nego kod preanalitičke faze (Arnold i sar., 2019).

Za pouzdanu verifikaciju rezultata je neophodno da postoje uputstva sa precizno definisanim kompetencijama osoblja, u skladu sa nivoom obrazovanja i iskustvom. U zavisnosti od broja i vrste uzoraka koji se ispituju, moguće je primeniti i autoverifikaciju, pri čemu je obavezno pažljivo osmisliti, validirati i doslovno slediti pravila koja određuju kada je i na koji način autoverifikaciju treba da potvrdi laboratorijsko osoblje. Izveštaji o ispitivanju moraju sadržati podatke o

pacijentu, vlasniku, ordinirajućem kliničaru, vremenu uzorkovanja i dostavljanja materijala u laboratoriju, zapažanja o „kvalitetu“ uzorka koja bi mogla uticati na tumačenje rezultata i vreme verifikacije. Ukoliko je primenljivo, obavezno je u izveštaj uključiti i odgovarajuće referentne vrednosti. Takođe, posebnu pažnju treba posvetiti „kritičnim“ vrednostima, tj. nalazima o kojima je neophodno da kliničar bude što pre obavješten (Arnold i sar., 2019; Friedrichs i sar., 2012).

U zavisnosti od discipline u okviru laboratorijske dijagnostike, u manjoj ili većoj meri se može javiti potreba da se u izveštaj uključe i interpretativni komentari. Citologija predstavlja primer gde su oni nezaobilazni, dok se u drugim disciplinama za njima najčešće javlja potreba u slučaju neočekivanih rezultata ili novih testova, kao i kada je u okviru zahteva za ispitivanje postavljeno specifično kliničko „pitanje“ (npr. razlikovanje transudata i eksudata). Ovlašćenja laboratorijskog osoblja za davanje interpretativnih komentara zavise od nivoa obrazovanja i iskustva, te su najčešće „rezervisani“ za specijaliste u određenoj oblasti (Arnold i sar., 2019). Takođe, iskustva iz humane laboratorijske medicine ukazuju da davanje interpretativnih komentara treba posmatrati kao veštinu iz oblasti kontinuiranog profesionalnog razvoja, o čemu svedoče i posebni programi spoljašnje procene kompetentnosti (Vasikaran, 2015).

ZAKLJUČAK

Razvoj laboratorijske dijagnostike je značajno unapredio preventivne, dijagnostičke, terapijske i prognostičke mogućnosti veterinarske medicine. Zauzvrat, izazovi sa kojima se susreće savremena veterinarska medicina predstavljaju motiv za dalja unapređenja laboratorijske dijagnostike, pomažući joj da očuva epitete racionalne i tačne. Ovako dinamična interakcija ima mnoštvo pokazatelja, ali svakako najvredniji među njima predstavlja kvalitetna i efektivna saradnja kliničara i laboratorijskih stručnjaka.

LITERATURA

1. Arnold J.E, Camus M.S., Freeman K.P, Giori L., Hooijberg E.H., Jeffery U. et al. 2019. ASVCP Guidelines: Principles of quality assurance and standards for Veterinary Clinical Pathology (version 3.0). *Veterinary Clinical Pathology*, 48:542-618. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12810>. 2. American Society for Veterinary Clinical Pathology Draw Order Guideline. Available at: http://www.asvcp.org/resource/resmgr/QALS/Other_Publications/ASVCP_Draw_Order_Guide.pdf. Accessed 21.7.2022. 3. Behrend E., Holford A., Lathan P., Rucinsky R., Schulman R. 2018 AAHA Diabetes management guidelines for dogs and cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 54:1-19. <http://dx.doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6822>. 4. Camus M.S., Flatland B., Freeman K.P., Cruz Cardona J.A. 2015. ASVCP quality assurance guidelines: external quality assessment and comparative testing for reference and in-clinic laboratories. *Veterinary Clinical Pathology*, 44:477-492. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12299>. 5. Eckersall P.D. 2019. Calibration of novel protein biomarkers for Veterinary Clinical Pathology: a call for international action. *Frontiers in Veterinary Science*, 6:210. <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2019.00210>. 6. Flatland

B., Freeman K.P., Vap L.M., Harr K.E. 2013. ASVCP guidelines: quality assurance for point-of-care testing in veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*, 42/4:405-423. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12810> **7.** Friedrichs K.R., Harr K.E., Freeman K.P., Szladovits B., Walton R.M., Barnhart K.F. et al, 2012. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41:441-453. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12006>. **8.** Harr K.E., Flatland B., Nabity M., Freeman K.P. 2013. ASVCP guidelines: allowable total error guidelines for biochemistry. *Veterinary Clinical Pathology*, 42:424-436. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12101>. **9.** Klee G.G., Westgard J.O. 2018. Quality management. In Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Eds. N. Rifai, A.R. Horvath, C.C. Wittwer, Elsevier, Missouri, pp. 163-203. **10.** Nabity M.B., Harr K.E., Camus M.S., Flatland B., Vap L. M. 2018. ASVCP guidelines: Allowable total error hematology. *Veterinary Clinical Pathology*, 47:9-21. <http://dx.doi.org/10.1111/vcp.12583>. **11.** Plebani M., Sciacovelli L., Aita A., Pelloso M., Chiozza M.L. 2015. Performance criteria and quality indicators for the pre-analytical phase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53:943-948. <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2014-1124>. **12.** Vasikaran S.D. 2015. Anatomy and history of an external quality assessment program for interpretative comments in clinical biochemistry. *Clinical Biochemistry*, 48:467-471. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.12.014>. **13.** Westgard W.O., Barry P.L., Hunt M.R., Groth T. 1981. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clinical Chemistry*, 27:493-501.

THE FIVE MOST COMMON PREANALYTICAL ERRORS IN HAEMATOLOGY – ARE WE AWARE OF THEM?

PET NAJČEŠČIH PREANALITIČKIH GREŠAKA U HEMATOLOGIJI – DA LI SMO IH SVESNI?

*Alenka Nemeč Svete**

Summary

Haematology refers to the study of the number and morphology of the cellular elements of the blood – erythrocytes, leukocytes, and platelets – and the use of these results in the diagnosis and monitoring of disease. Total quality in haematology testing is therefore essential to obtain reliable results and establish the most appropriate clinical decision-making. Significant advances in instrumentation, automation, computerization, and quality control have greatly improved the quality of laboratory results in veterinary medicine. Therefore, analytical errors are no longer the main factor affecting the reliability of laboratory results. Errors in the preanalytical phase are currently the main cause of unreliability of laboratory results in haematological testing and other types of analysis. The five most common preanalytical errors in haematology that we may not even be aware of during sample collection and processing are an inappropriate sample-to-anticoagulant ratio, clotted samples, in vitro haemolysis, incorrect sample labelling and unlabelled samples. An excessive amount of sample volume relative to the amount of anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) can result in spuriously low platelet count and clot formation due to inadequate mixing, while an insufficient amount of sample volume results in a high concentration of the anticoagulant EDTA. The latter may cause platelet aggregation in vitro, resulting in pseudothrombocytopenia, pseudoleukocytosis, and pseudoleukopenia, as well as spuriously low haematocrit. In addition, haemolysis causes significant changes in several haematological parameters, such as a decrease in erythrocyte count, haematocrit, and mean corpuscular volume, and an increase in the red cell distribution width, mean corpuscular haemoglobin, mean corpuscular haemoglobin concentration, and platelet count. Following the recommended procedures for collecting a blood sample for haematology and handling the collected samples are key to avoiding errors in the preanalytical phase and thus avoiding misinterpretation of haematology results.

Key words: *clinical laboratory, ethylenediaminetetraacetic acid, haematology, haemolysis, laboratory errors, preanalytical phase; veterinary medicine*

¹Prof. dr. Alenka Nemeč Svete, B.Che.E., University of Ljubljana, Veterinary faculty, Small Animal Clinic, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana, Slovenia

*e-mail of the author for correspondence: alenka.nemecsvete@vf.uni-lj.si

Kratak sadržaj

Hematologija se bavi proučavanjem ćelijskih elemenata krvi – eritrocitima, leukocitima i trombocitima i korišćenjem naučnih saznanja vezanih za ove ćelije u dijagnostici i praćenju bolesti. Ukupni kvalitet hematološkog testiranja je stoga od suštinskog značaja za dobijanje pouzdanih rezultata i uspostavljanje najprikladnijeg kliničkog odlučivanja. Značajan napredak u instrumentalnoj tehnologiji, automatizacija, kompjuterizacija i kontrola kvaliteta su značajno poboljšali kvalitet laboratorijskih rezultata u veterinarskoj medicini. Analitičke greške više nisu glavni faktor koji utiče na pouzdanost laboratorijskih rezultata. Greške u preanalitičkoj fazi su trenutno glavni uzrok nepouzdanosti laboratorijskih rezultata u hematologiji i drugim vrstama analiza. Pet najčešćih preanalitičkih grešaka u hematologiji kojih možda nismo ni svesni tokom prikupljanja i obrade uzoraka su: neodgovarajući odnos uzorka i antikoagulansa, zgrušani uzorci, in vitro hemoliza, pogrešno obeležavanje uzorka i neobeleženi uzorci. Prekomerna količina uzorka, u odnosu na količinu antikoagulansa, etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA) može dovesti do lažno niskog broja trombocita i formiranja ugruška usled neadekvatnog mešanja, dok nedovoljna količina prekomerno povećava koncentraciju antikoagulansa EDTA. Ovo poslednje može izazvati agregaciju trombocita in vitro, što dovodi do pseudo-trombocitopenije, pseudo-leukocitoze i pseudo-leukopenije, kao i do lažno niskog hematokrita. Pored toga, hemoliza uzrokuje značajne promene u nekoliko hematoloških parametara, kao što su smanjenje broja eritrocita, hematokrita i prosečne zapremine eritrocita i povećanje širine distribucije crvenih krvnih zrnaca, prosečne količine i koncentracije hemoglobina u eritrocitima i broja trombocita. Praćenje preporučenih procedura za uzimanje uzorka krvi za hematologiju i rukovanje prikupljenim uzorcima su ključni za izbegavanje grešaka u preanalitičkoj fazi i na taj način izbegavanje pogrešnog tumačenja hematoloških rezultata.

Ključne reči: etilendiamintetrasirćetna kiselina, hematologija, hemoliza, klinička laboratorija, laboratorijske greške, preanalitička faza, veterinarska medicina

INTRODUCTION

Haematology refers to the study of the number and morphology of the cellular elements of the blood – erythrocytes, leukocytes, and platelets – and the use of these results in the diagnosis and monitoring of disease. Therefore, accurate results in haematological testing are of utmost importance to the veterinarian. With the availability of newer automated haematological analysers for veterinary medicine, new measurement techniques are being introduced into daily routine. Nowadays, routine automated haematology analysis in veterinary medicine includes determination of complete blood count (CBC) with white blood cell differential count (WBC differential count) and reticulocyte count, if applicable. Modern haematology analysers provide rapid and accurate results in most cases; however, the results can only be as good as the sample.

Blood for haematologic evaluation of mammals is routinely anticoagulated with dipotassium (K_2) or tripotassium (K_3) salts of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) due to superior preservation of cells for counting, staining and

morphologic evaluation (Arnold et al., 2019). Besides potassium salts, disodium salt of EDTA (Na_2EDTA) may also be used; however, the potassium salts have an advantage over the sodium salt in that they are more readily soluble in the blood when present in the dry form in the blood collection tubes (England et al., 1993). The main property of EDTA, a polyprotic acid containing four carboxylic acid groups and two amine groups with lone pair electrons, is the ability to chelate or complex calcium and several other metal ions in 1:1 metal-EDTA complexes. Calcium is necessary for a wide range of enzymatic reactions of the coagulation cascade and its removal irreversibly prevents blood clotting within the blood collection tube (Banfi et al., 2007). Heparin may be used when EDTA tubes are not available or for select species such as reptiles, birds, and horses; however, the results obtained may be compromised (Arnold et al., 2019; Braun et al., 2015). Back in 1993 the International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommended the use of K_2EDTA (available in a spray-dried form) as the anticoagulant of choice in specimen collection for blood cell counting and sizing due to its less hyperosmolar effect on blood cells and the lack of dilutional effect on small sample volumes compared to K_3EDTA (in liquid form) (Banfi et al., 2007; NCCLS, 2003; England et al., 1993). Nevertheless, either is acceptable if tubes are filled sufficiently and if testing is conducted in a timely fashion, which is within 6 hours of sample collection (Arnold et al., 2019; Flatland and Vap, 2012; England et al., 1993; Goossens et al., 1991).

Providing quality care to animal patients is an important goal of veterinary clinicians and often involves the use of veterinary clinical pathology laboratory that provides clinically relevant and reliable data (Arnold et al., 2019; Vap et al., 2012). The purpose of the veterinary clinical laboratory is integral activity that provides reliable results, which are used to define, classify, or confirm a pathophysiologic disorder or disease, eliminate a possible cause of the animal's illness and assess changes in a pathologic state either due to natural progression of the disease or because of medical or surgical therapy, as well as to control for the presence of hidden disorders in apparently healthy animals (Stockham and Scott, 2008; Bush, 1998). Veterinary clinical laboratories are not subjected to the legislative and the licensing requirements that apply to human clinical laboratories (ISO 15189), although the requirement for quality results is similar. In some respects, quality results may be more difficult to attain in a veterinary clinical pathology laboratory owing to the significant species differences (Vap et al., 2012). In December 2009, the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standards committee published the updated and peer reviewed ASVCP Quality Assurance Guidelines on the Society's website (Vap et al., 2012); the latest version of the guidelines was published in 2019 (Arnold et al., 2019). These guidelines are 'aimed at advancing the ethos of continuous quality improvement in the veterinary laboratory setting, by raising awareness of potential sources of laboratory error, by providing recommendations for evaluation of current practices/identifications of potential

areas of improvement, and by providing actionable goals and tools for launching and refining systems of total quality management' (Arnold et al., 2019).

There are three basic phases of laboratory work: the preanalytical, analytical, and postanalytical; therefore, laboratory errors are divided into preanalytical, analytical, and postanalytical depending on where in the laboratory cycle the error occurs (Whipple et al., 2020; Arnold et al., 2019; Hooijberg et al., 2012; Stockham and Scott, 2008). Significant advances in instrumentation, automation, computerization, and quality control have greatly improved the quality of laboratory results in veterinary medicine. Therefore, analytical errors are no longer the main factor affecting the reliability of laboratory results. Significant attention must be directed towards the preanalytical components of laboratory testing (Whipple et al., 2020; Braun et al., 2015; Hooijberg et al., 2012; Vap et al., 2012; Lippi et al., 2006). The preanalytical phase is defined by ISO 15189 as 'The processes that start, in chronological order, from the clinician's request, and include the examination request, preparation and identification of the patient, collection of the primary sample(s), and transportation to and within the laboratory, and end when the analytic examination begins' (Braun et al., 2015). Errors in the preanalytical phase are currently the main cause of unreliability of laboratory results not only in haematological testing, but also in biochemistry and other types of analysis in human (De la Salle, 2019; Upreti et al., 2013; Zandecki et al., 2007a; 2007b; Lippi et al., 2006; Narayanan, 2003) and veterinary medicine (Whipple et al., 2020; Arnold et al., 2019; Braun et al., 2015; Flatland and Vap, 2012; Hooijberg et al., 2012; Stockham and Scott, 2008). In the study of Whipple et al. (2020), preanalytical errors were the most common (75.3%) of all laboratory errors, with the majority (83.6%) of these errors occurring outside of the veterinary clinical pathology laboratory, which is frightening. The five most common preanalytical errors occurring in human and veterinary haematology testing that we may not even be aware of during sample collection and processing are an inappropriate sample-to-anticoagulant ratio, clotted samples, *in vitro* haemolysis, incorrect sample labelling and unlabelled samples (Whipple et al., 2020; Arnold et al., 2019; De la Salle, 2019; Braun et al., 2015; Upreti et al., 2013; Zandecki et al., 2007a; 2007b; Narayanan, 2003). Highly sophisticated testing technology cannot produce a reliable result from a poor-quality specimen. Proper collection, handling and processing of blood specimens are, therefore, of the utmost importance to protect patient results quality and thus prevent misinterpretation of laboratory results (Whipple et al., 2020; Arnold et al., 2019; Flatland and Vap, 2012; Hooijberg et al., 2012; Vap et al., 2012; Lippi et al., 2006; Bush, 1998).

Inappropriate sample-to-anticoagulant ratio

Historically, EDTA has been recommended as the anticoagulant of choice for haematological analyses because it allows the best preservation of cellular components and blood cell morphology. In addition, EDTA showed optimal

long-term stabilisation of blood cells and particles. Disodium and dipotassium salts are usually used in dry form, while tripotassium EDTA salt is used in liquid form (Banfi et al., 2007; NCCLS, 2003). All three types of EDTA salts are hyperosmolar and cause water loss from cells, resulting in erythrocyte shrinkage and thus in spuriously low mean corpuscular volume (MCV) and haematocrit, and consequently spuriously high mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC). However, cell shrinkage is less evident when K_2 EDTA and Na_2 EDTA are used (Banfi et al., 2007; Zandecki et al., 2007a, England et al., 1993). EDTA tubes have a fixed filling volume that gives an optimal concentration of the anticoagulant, namely 1.4 - 2.0 mg/mL of blood or 1.5 - 2.2 mg/mL of blood when using Na_2 EDTA and K_2/K_3 EDTA, respectively (NCCLS, 2003). However, EDTA, even when used at recommended concentrations, has deleterious effects on platelet, erythrocyte and leukocyte counts, as well as on erythrocyte (haematocrit, MCV, mean corpuscular haemoglobin (MCH), MCHC) and platelet (mean platelet volume) indices (Ross and Dickinson, 2021; Arnold et al., 2019; De la Salle et al., 2019; Banfi et al., 2007; Zandecki et al., 2007a; 2007b; Narayanan, 2003; Goossens et al., 1991).

The phenomenon of *in vitro* EDTA-induced platelet clumping or agglutination is a well-known artefact that is frequently reported in human medicine and less frequently in veterinary medicine. The mechanism of agglutination or adherence appears to involve EDTA-dependent platelet agglutinins (specific antibodies) present in the plasma, which target antigens such as glycoprotein IIb/IIIa complex sequestered within the platelet membrane. These antigens become exposed when EDTA chelates calcium. EDTA-induced platelet clumping causes spuriously low platelet counts (pseudothrombocytopenia), which may lead to erroneous diagnosis, unnecessary and costly additional laboratory examinations, and inappropriate medical and surgical therapy or the unjustified withdrawal of essential medication (Banfi et al., 2007; Zandecki et al., 2007b; Narayanan, 2003). EDTA-induced platelet aggregation has been reported in dogs and cats (Riond et al., 2015; Wills and Wardrop, 2008; Norman et al., 2001). Pseudothrombocytopenia and concomitant platelet aggregation due to the effects of EDTA have also been confirmed in bulls (Nemec et al., 1998). EDTA-induced pseudothrombocytopenia may be accompanied by either spuriously high leukocyte counts (pseudoleukocytosis) or occasionally spuriously low leukocyte counts (PLT-WBC adherence – pseudoleukopenia). Pseudoleukocytosis results from the formation of PLT clumps large enough to mimic white cells on the WBC side of an impedance counter (Coulter S Plus IV /V, Technicon H*6000, Ortho ELT 8), whereas pseudoleukopenia may be due to “gating out” of large PLT-WBC masses (Banfi et al., 2007; Nemec et al., 2005).

Both underfilling and overfilling of EDTA tubes can lead to erroneous results of CBC, as well as the automated WBC differential count (Ross and Dickinson, 2021; Arnold et al., 2019; De la Salle et al., 2019; Zandecki et al., 2007a; 2007b; Nemec et al., 2005; Pewarchuk et al., 1992). Underfilling of tubes containing EDTA salts produces erroneous results from the exposure to high-salt content, and potentially

from the dilution by the liquid anticoagulant. The higher the EDTA concentration, the greater the osmotic withdrawal of water from the cells, leading to a greater reduction in PCV/haematocrit, and a greater likelihood of the occurrence of pseudothrombocytopenia, pseudoleukocytosis, and pseudoleukopenia, as well as more pronounced changes in other haematological parameters (Ross and Dickinson, 2021; Arnold et al., 2019; Banfi et al., 2007; Zandecki et al., 2007a; 2007b; Nemec et al., 2005; Nemec et al., 1998). The effect of EDTA on erythrocyte shrinkage and thus on PCV is concentration dependent and is more pronounced in the K_3 EDTA than in the K_2 EDTA salt (Goossens et al., 1991). On the other hand, Xu et al. (2010) investigated whether spray-dried K_2 EDTA tubes still need to be completely filled. It is possible that the use of solid rather than liquid EDTA tubes reduced the importance of the anticoagulant-to-blood ratio in terms of effects on haematological parameters. The research group reported that drawing at least 1.0 mL of whole blood in a 4-mL K_2 EDTA tube had no significant effect on routine CBC parameters, reticulocytes, and WBC differential counts (Xu et al., 2010). Nemec and colleagues (2005) studied the effect of high K_3 EDTA concentration (5.4 mg/mL) on CBC and WBC differential counts in healthy beagle dogs using the Technicon H1 laser-based automated haematology analyser and multispecies software. The authors reported significantly lower haematocrit and MCV values and significantly higher MCHC values in samples with high (5.4 mg/mL) K_3 EDTA concentration than in samples with normal (1.8 mg/mL) K_3 EDTA concentration. While the decrease in haematocrit ranged from 3.7 to 20.7% (mean \pm SD: 13.4 \pm 4.8%) and MCV from 4.3 to 19.1% (mean \pm SD: 11.9 \pm 4.2%), the increase in MCHC ranged from 4.8 to 25.8% (mean \pm SD: 14.0 \pm 5.9). Based on the results, the authors recommended maintaining the required blood to anticoagulant ratio when using K_3 EDTA tubes (Nemec et al., 2005). In addition, excessive sample volume relative to the amount of anticoagulant (EDTA) due to overfilling of EDTA tubes may result in spuriously low platelet counts and clot formation due to insufficient mixing. It has been reported that overfilling of EDTA blood collection vacuum tubes can result in insufficient mixing of samples, which, in combination with settling of cell contents in the blood collection tubes, can lead to abnormal haematological parameters indicative of pseudopolycythemia, pseudothrombocytopenia, and pseudoleukopenia (Pewarchuk et al., 1992).

As recommended in the ASVCP guidelines, EDTA tubes should be filled to the fill line to avoid deleterious effects of underfilling and overfilling on the results of haematological analysis. In addition, samples must be adequately mixed not only immediately after blood collection but also immediately prior to any haematological testing to ensure homogeneity; settling of erythrocytes may not be grossly visible and can significantly affect the quality of results (Arnold et al., 2019).

Haemolysis

Haemolysis, from the Latin *hemo* (blood) and *lysis* (to break open), is the release of haemoglobin and other intracellular components from erythrocytes to

the surrounding plasma, following damage or disruption of the cell membrane. Visually, haemolysis is defined for free haemoglobin concentrations above 0.3 g/L, which confers a detectable pink to red hue to serum or plasma and becomes clearly visible in specimens containing as low as 0.5% lysated erythrocytes (Lippi et al., 2008). Haemolysis may occur *in vivo*, which is related to a clinical-pathological condition, or *in vitro* because of preanalytical errors. It is the most undesirable condition that influences the accuracy and reliability of laboratory testing (Ercan et al., 2021; Whipple et al., 2020; Arnold et al., 2019; de Jonge et al., 2018; Lippi et al., 2012; Lippi et al., 2008; Zandecki et al., 2007a, 2007b; Lippi et al., 2006).

Haemolysis is the main cause of inappropriate specimens in clinical laboratories and is usually detected only after the separation of serum or plasma. Therefore, haemolysis may easily be overlooked by the laboratory personnel if the veterinarian or physician requests haematological analysis only. In the postanalytical phase, well-trained staff may observe deviations in some of the results of haematological analyses that could indicate the haemolysis. Some haematology laser beam analysers, such as ADVIA® (Siemens), directly measure haemoglobin concentration in individual erythrocytes to provide the Cellular Haemoglobin Concentration Mean (CHCM), which is then compared to calculated MCHC values, generating a flag for discordant data. Indeed, the difference between MCHC and CHCM values may indicate a high concentration of free haemoglobin in EDTA blood samples. Sample haemolysis increases MCHC because the proportion of free haemoglobin relative to intact erythrocytes in the sample is increased. Increased MCHC is almost always an artifact and should prompt investigation of *in vivo* or *in vitro* haemolysis, the presence of agglutination, lipemia, or large number of Heinz bodies (which falsely increased the haemoglobin concentration (Arnold et al., 2019; Flatland and Vap, 2012; Zandecki et al., 2007a). Haemolyzed specimens are common in both human and veterinary clinical laboratory and are often rejected due to biological and analytical interferences that affect the reliability of laboratory tests (Whipple et al., 2020; Arnold et al., 2019; De la Salle, 2019; Lippi et al., 2008; Lippi et al., 2006). At the same time, haemolyzed samples, if detected by the analyst, may necessitate the collection of a new blood sample, delaying patient care. *In vitro* haemolysis is usually the result of inadequate sample collection and handling, such as the excessive suction to draw blood into a syringe (especially when using small-gauge needles), drawing blood into a large volume evacuated tube (e.g. Vacutainer) due to the force with which it enters and strikes the tube wall, excessive stasis of venous blood when a vein is occluded during blood collection, transfer of alcohol residue from the skin to the sample, difficulty in locating venous access, small and fragile veins that are easily traumatized, and attempts at unsatisfactory puncture, application of excessive negative pressure to blood in the syringe, underfilling of the blood collection tube (excessive concentrations of additives, especially EDTA, can cause rupture of erythrocyte cell membranes), vigorous shaking and mixing of blood samples

after collection, and exposure to excessively hot or cold temperatures (Lippi et al., 2008; Bush, 1998).

While there are numerous publications reporting the effects of high, normal, or low EDTA concentration on haematological parameters, there are few reports on the effects of *in vitro* haemolysis on the results of haematological analyses (Ercan et al., 2021; de Jonge et al., 2018; Lippi et al., 2012; Zandecki et al., 2007a; 2007b). It can be expected that haemolysis results in lower erythrocyte count (RBC) and haematocrit, and higher MCHC; however, information on the extent of changes in all haematological parameters included in CBC and WBC differential counts is important for veterinarians and medical doctors. Detection of changes in some haematologic parameters due to haemolysis depends on the type of the haematologic analyser used. Using the impedance-type haematology analyser (Hemacounter 60- RT 7600; Hemogram, Brazil), de Jonge et al. (2018) reported that samples with a high degree of haemolysis exceeded quality specifications for desirable bias and showed a significant decrease in RBC, haematocrit, and MCV, and a significant increase in red cell distribution width (RDW), mean corpuscular haemoglobin (MCH), MCHC, and platelet count. On the other hand, samples with a mild degree of haemolysis showed modest increases in MCH, MCHC, and platelet count. The authors (de Jonge et al., 2018) observed that RBC had a bias of -6.4% (-22.8% to +10.0%) and haematocrit had a bias of -8.3% (-25.7% to +9.2%), exceeding the permitted specifications of + 1.7% for samples with a high degree of haemolysis. Therefore, these two parameters may be underestimated by up to 22% for erythrocytes and up to 25.7% for haematocrit or overestimated by up to 10% and 9.2%, respectively (de Jonge et al., 2018). Similar results were reported by Lippi et al. (2012), who investigated the effects of *in vitro* haemolysis on haematological parameters using the ADVIA 2120 automated laser-based haematology analyser. Lippi et al. (2012) reported a decrease in RBC and haematocrit of -18.2% (-27.2% to -9.3%) and -20.6% (-33.3% to -7.9%), respectively. In addition, de Jonge et al. (2018) reported that in samples with high and mild haemolysis, the bias for MCH and MCHC exceeded the allowable specifications of 1.4% for MCH and $\pm 0.8\%$ for MCHC, which is also consistent with the findings of Lippi et al. (2012). It is worth mentioning that both research groups (de Jonge et al., 2018; Lippi et al., 2012) reported significant increase in platelet count because of *in vitro* haemolysis. The spurious increase in platelet count is well-recognized artifact, previously described by Zandecki et al. (2007b), and attributable to the interference of damaged cells and their cytoplasmic fragments in platelet enumeration and sizing. De Jonge et al. (2018) reported that haemolysis caused 7.3% (- 34.2% to 48.7%) and 42.6% (-16.8% to 101.9%) bias for PLT count at mild and high degree, respectively, while Lippi and colleagues reported that platelet count was biased 18.1% (4.2% to 32%) and 40.6% (20.1% to 61.1%) at mild and high degrees of haemolysis. In addition, both research groups reported significant changes in some other haematological parameters (WBC differential counts, RDW, etc.) due to haemolysis that exceeded the quality specifications for desirable bias (de Jonge et al., 2018; Lippi et al.,

2012). With exception of platelet counts, similar results were reported by Ercan et al. (2021), who examined the effects of haemolysis on CBC and WBC differential counts using the Abbot Alinity hq haematology analyser.

Taken together, all three research groups have shown that *in vitro* haemolysis, which often occurs in the preanalytical phase of laboratory routine, provides unreliable results for most haematological parameters, leading to misinterpretation of haematology results. Therefore, special attention should be paid to the quality of a whole blood sample when the results of haematological analyses are not consistent with the clinical condition of an animal patient.

Clotted samples

Nowadays, clotted specimens are still quite common in veterinary clinical pathology laboratories. Therefore, anticoagulated specimens should be visually inspected for macroclots upon receipt, as these can lead to varying degrees of erroneous results. Because the degree of inaccuracy is unpredictable, clotted specimens should not be analysed (Arnold et al., 2019; Flatland and Vap, 2012). The specimens with macroclots are easily detected; however, microclots are difficult to detect in the haematology laboratory. In veterinary medicine, the high rate of clotted specimens is mainly due to poor quality of blood collection and inadequate mixing of the collected specimens. The presence of clots in EDTA specimens may be due to an increased ratio of blood to anticoagulant (insufficient EDTA because of overfilling of EDTA tubes), as well as improper mixing or even “non-mixing” of the specimen immediately after collection (De la Salle, 2019; Upreti et al., 2013; Flatland and Vap, 2012; Zandecki et al., 2007a; 2007b; Pewarchuk et al., 1992). The ASVCP guidelines recommend that tubes should be inverted at least eight times immediately after filling to avoid *in vitro* clot formation. This should be done by gently inverting the tubes, avoiding vigorous shaking (Arnold et al., 2019). Special care should be taken when collecting blood from cats, as the phenomenon of platelet clumping in cats after blood collection in EDTA tubes is well known (Riond et al., 2015).

In routine clinical practise, we can observe that when blood samples were collected with syringes in EDTA tubes, the tubes were sometimes overfilled, leaving too little or no air space to allow proper mixing when inverted. Therefore, overfilling of EDTA blood collection vacuum tubes results in insufficient mixing of the blood sample, which is one of the reasons for blood clot formation (Arnold et al., 2019; Upreti et al., 2013; Flatland and Vap, 2012; Zandecki et al., 2007a; 2007b; Pewarchuk et al., 1992). Tubes containing blood samples must have an air bubble constituting at least 20% of the tube volume to ensure adequate mixing (England et al., 1993). In addition, clots or inadequate mixing of the sample due to overfilling of the vacuum tubes used for blood collection may result in an aspiration of an aliquot that is not representative of the blood sample. It has been reported that insufficient sample mixing (due to overfilling) combined with settling of cell contents in the blood collection tubes

resulted in abnormal haematological parameters such as pseudopolycythemia, pseudothrombocytopenia, and pseudoleukopenia (Pewarchuk et al., 1992). To avoid insufficient mixing of blood after collection, blood collection tubes should not be overfilled but filled to the fill line (Arnold et al., 2019).

Incorrect sample labelling and unlabelled samples

The correct types and sizes of venous blood collection tubes should be selected and labelled prior to blood collection. Identification of the patient is crucial. The veterinarian must ensure that the blood specimen is being collected from the patient designated on the request form (Arnold et al., 2019; Flatland and Vap, 2012; Vap et al., 2012; Stockham and Scott, 2008; Bush, 1998). Nowadays, incorrect sample labelling and unlabelled samples are still frequent preanalytical errors in veterinary clinical pathology laboratory. It is no doubt that incorrect sample labelling can have serious adverse effects or can lead to completely wrong treatment of the patients. Unfortunately, this type of preanalytical error cannot be easily detected by the laboratory personnel. On the other hand, unlabelled samples are subjected to rejection without hesitation. According to the ASVCP guidelines (Arnold et al., 2019), the patient name/ID (ideally two unique identifiers), date, and type of specimen (e.g., whole blood, plasma, urine, cavitory fluid, joint fluid, mass aspirate, etc..) should be written on the tube/specimen label.

REFERENCES

1. Arnold J.E., Camus M.S., Freeman K.P., Giori L., Hooijberg E.H., Jefferey U. et al. 2019. ASVCP Guidelines: Principles of Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology (version 3.0): Developed by the American Society for Veterinary Clinical Pathology's (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS) Committee. *Veterinary Clinical Pathology*, 48:542-618. <https://doi.org/10.1111/vcp.12810>.
2. Banfi G., Salvagno G.L., Lippi G. 2007. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45:565-576. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.110>.
3. Braun J. P., Bourges-Abella N., Geffre A., Concordet D., Trumel C. 2015. The preanalytic phase in veterinary clinical pathology. *Veterinary Clinical Pathology*, 44:8-25. <https://doi.org/10.1111/vcp.12206>.
4. Bush B.M., 1998. Interpretation of laboratory results for small animal clinicians, Oxford: Blackwell Science, 1-30.
5. De Jonge G., dos Santos T., Cruz B.R., Simionatto M., Bittencourt J.I.M., Krum E.A. et al. 2018. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32:e22396. <https://doi.org/10.1002/jcla.22396>.
6. De la Salle B. 2019. Pre- and Postanalytical errors in haematology. *International Journal of Laboratory Hematology*, 41: (Suppl. 1): 170-6. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13007>.
7. England J.M., Rowan R.M., van Assendelft O.W., Bull B.S., Coulter W. et al. 1993. Recommendations of the international council for standardization in haematology for ethylenediaminetetraacetic acid anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. *American Journal of Clinical Pathology*, 100:371-2. <https://doi.org/10.1093/ajcp/100.4.371>
8. Ercan M., Akbulut E.D., Bayraktar N., Ercan S. 2021. Effects of specimen haemolysis

on complete blood count by Abbott Allnity hq system. *Biochemia Medica* (Zagreb), 31:030706. <https://doi.org/10.11613/BM.2021.030706>. **9.** Flatland B, Vap L M. 2012. Quality management recommendations for automated and manual in-house hematology of domestic animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 42:11-22. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.09.004>. **10.** Goossens W, Van Duppen V, Verwiltghen R.L. 1991. K2- or K3-EDTA: the anticoagulant of choice in routine haematology? *Clinical & Laboratory Haematology*, 13:291-5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.1991.tb00284.x>. **11.** Hooijberg E, Leidinger E, Freeman K. P. 2012. An error management system in a veterinary clinical pathology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24:458-68. <https://doi.org/10.1177/1040638712441782>. **12.** Lippi G, Guidi G. C., Mattiuzzi C, Plebani M. 2006. Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44:358-65. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.073>. **13.** Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, Green S, Kitchen S, Palicka V. et al. , 2008. Haemolysis: and overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 46:764-772. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2008.170>. **14.** Lippi G, Musa R, Avanzini P, Aloe R, Pipitone S, Sandei F. 2012. Influence of in vitro hemolysis on hematological testing. *International Journal of Laboratory Hematology*, 34:179-184. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2011.01378.x>. **15.** Narayanan S. 2003. Pre-analytical issues in hematology, *Laboratoriums Medizin*, 27:243-8. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0477.2003.03045.x>. **16.** NCCLS, 2003, Tubes and additives for venous blood specimen collection; approved standard – fifth edition, Document H1-A5, Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1-33. **17.** Nemeč A., Snoj T., Čebulj-Kadunc N., Cestnik V. 1998. The influence of antikoagulant K3EDTA on CBC (complete blood count) in bulls, *Research Reports [of the] Veterinary Faculty*, 35, 43-48. **18.** Nemeč A., Drobnič-Košorok M., Butinar J. 2005. The effect of high anticoagulant K3-EDTA concentration on complete blood count and white blood cell differential counts in healthy beagle dogs. *Slovenian Veterinary Research*, 42:65-70. **19.** Norman E.J., Barron R.C.J., Nash A.S., Clampitt R.B. 2001. Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Veterinary Clinical Pathology*, 30:137-140. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2001.tb00422.x>. **20.** Pawarchuk W., VanderBoom J., Blajchman M.A. 1992. Pseudopolycythemia, pseudothrombocytopenia, and pseudoleukopenia due to overfilling of blood collection vacuum tubes. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 116:90-92. PMID: 1734839. **21.** Riond B., Waßmuth A.K., Hartnack S., Hofmann-Lehmann R., Lutz H. 2015. Study on the kinetics and influence of feline platelet aggregation and deaggregation. *BMC Veterinary Research*, 11:276. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0590-7>. **22.** Ross E.H., Dickinson A. 2021. Dilutional effect of ethylenediaminetetraacetic acid on packed cell volume in healthy dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 57:199-204. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-7060>. **23.** Stockham S.L., Scott M.A. 2008. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*, 2nd edition, Ames: Blackwell Publishing, 3-51. **24.** Upreti S., Upreti S., Bansal R., Jeelani N., Bharat V. 2013. Types and frequency of preanalytical errors in haematology lab. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7:2491-2493, doi: 10.7860/JCDR/2013/6399.3587. **25.** Vap L.M., Harr K.E., Arnold J.E., Freeman K.P., Getzy K., Lester S. et al. 2012. ASVCP quality assurance guidelines: control of preanalytical and analytical factors for hematology for mammalian and non-mammalian species, hemostasis, and crossmatching in veterinary laboratories. *Veterinary Clinical Pathology*, 41:8-17. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00413.x>. **26.** Xu M., Robbe V.A., Jack R.M., Rutledge J.C. 2010. Under-filled blood collection tubes

containing K2EDTA as anticoagulant are acceptable for automated complete blood counts, white blood cell differential, and reticulocyte count, *International Journal of Laboratory Hematology*, 32:491-497. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2009.01211.x> **27**. Whipple K.M., Leissinger M.K., Beatty S.S. 2020. Frequency and classification of errors in laboratory medicine at a veterinary teaching hospital in United States. *Vet Clin Pathol*, 49:240-248. <https://doi.org/10.1111/vcp.12851>. **28**. Wills T.B., Wardrop K.J. 2008. Pseudothrombocytopenia secondary to the effects of EDTA in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 44:95-97. <https://doi.org/10.5326/0440095>. **29**. Zandecki M., Genevieve F., Gerard J., Godon A. 2007a. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes. *International Journal of Laboratory Hematology*, 29:21-41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.2006.00871.x>. **30**. Zandecki M., Genevieve F., Gerard J., Godon A. 2007b. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: Platelets. *International Journal of Laboratory Hematology*, 29:4-20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.2006.00871.x>.

OSNOVNE LABORATORIJSKE PROCEDURE U DIJAGNOSTICI IMUNSKI-POSREDOVANE HEMOLITIČKE ANEMIJE PASA

Milica Kovačević Filipović

Kratak sadržaj

Da bi se ostvario napredak u dijagnostici pojedinih patoloških stanja, neophodno je uspostaviti protokole koji će omogućiti kvalitetno i reproducibilno testiranje kada postoji osnovana sumnja za dato oboljenje. Algoritam dijagnostike imunski-posredovane hemolitičke anemije (IMHA) je publikovan 2019. godine u časopisu Američkog udruženja veterinarske interne medicine. Na osnovu tog algoritma, dijagnoza ovog oboljenja se može postaviti kada pas ima regenerativnu ili neregenerativnu anemiju, dve ili više promena koje ukazuju na imunski-posredovanu hemolizu kao što su pozitivan test aglutinacije sa fiziološkim rastvorom i povećanje broja sferocita na krvnom razmazu i barem jednu od promena koje ukazuju na povećan obim hemolize. Algoritam dijagnostike takođe omogućava da se u pojedinim slučajevima postavi dijagnoza suspektne bolesti ili dijagnoza osnovane sumnje da pacijent boluje od IMHA. Takođe, neophodno je ispitati da li se radi o primarnoj ili sekundarnoj IMHA i kada postoji sekundarna IMHA, mora se istovremeno lečiti primarno oboljenje. Terapija IMHA je kompleksna, zahteva personalizovani pristup pacijentu i zasniva se na imunosupresivnoj terapiji, korekciji anemije, antitrombotičnoj terapiji i „menadžmentu“ dugotrajne terapije imunosupresivnim lekovima. IMHA je oboljenje koje često ima nepovoljan ishod, ali uz brzu dijagnostiku i dobro organizovanu terapiju, procenat pacijenata sa dugoročnim preživljavanjem se povećava.

Ključne reči: *duhovi eritrocita, hiperbilirubinemija, hemoglobinemija, sferociti, test aglutinacije*

UVOD

Anemija je relativno čest znak bolesti kod pasa i mačaka. Osnovna patogenetska podela anemija se odnosi na: 1) poremećaje u stvaranju eritrocita; 2) ubrzanu hemolizu i 3) akutnu hemoragiju (Fleischman, 2012). Poremećaji u stvaranju eritrocita izazivaju neregenerativnu anemiju, a ubrzana hemoliza i hemoragija dovode do nastanka regenerativne anemije. Pojedina patološka stanja mogu dovesti do nastanka anemije kombinacijom navedenih mehanizma. U Laboratoriji za kliničku hematologiju i biohemiju, Katedre za patološku fiziolo-

¹Dr sci. vet. med. Milica Kovačević Filipović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: milica@vet.bg.ac.rs

giju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu kod jedne petine pacijenata kod kojih se u okviru dijagnostičke procedure određuje i krvna slika, može se utvrditi anemija (Kovačević Filipović i sar., 2022). U oko 80 procenata slučajeva, dijagnostikovana je blaga do umerena neregenerativna anemija, dok je u oko 20 procenata, anemija bila teška ili jako teška i često regenerativnog karaktera. U manjem broju slučajeva, prepoznato je da je anemija hemolitičkog karaktera. Hemolitičke anemije mogu imati različite patogenetske mehanizme i različite etiološke faktore. Ukoliko u patogenezi anemije važnu ulogu igraju anti-eritrocitna antitela, naziv koji se poslednjih godina ustalio kao dijagnoza je „imunski-posredovana hemolitička anemija“ ili IMHA (engl. *Immune Mediated Hemolytic Anemia*). Tokom 2022 godine, u našoj laboratoriji je, u više slučajeva teške regenerativne, ali i neregenerativne anemije, dijagnostikovana IMHA. U zavisnosti od osnovnog etiološkog faktora, prognoza IMHA je različita. Literaturni podaci se slažu da je u najmanje 50 procenata dijagnostikovanih slučajeva, ishod ove anemije nepovoljan (Garden i sar., 2019; Woolhead i sar., 2021). Naša iskustva su slična navodima iz literature.

HEMOLITIČKA ANEMIJA

Fiziološki, makrofagi slezine u toku jednog dana uklone iz cirkulacije oko 1 odsto ostarelih eritrocita, dok se istovremeno u kostnoj srži stvori podjednak broj retikulocita koji ulaze u cirkulaciju. Na taj način, broj eritrocita se u fiziološkim uslovima ne menja značajno. Obim hemolize može da se poveća usled stvaranja auto-antitela protiv antigena koji se nalaze na membrani eritrocita. Na osnovu razloga nastanka antitela, IMHA se može okarakterisati kao primarna ili sekundarna. Primarna IMHA je ona koja se javlja zbog poremećaja imunskog sistema koji se najčešće zasniva na gubitku regulatornih T limfocita i posledičnoj pojavi auto-antitela. Ipak, u praksi se dijagnoza ovog tipa anemije postavlja tako što se isključe svi poznati uzroci sekundarne IMHA. Rase koje su predisponirane za pojavu primarne IMHA su: koker španijel, springer španijel, stari engleski ovčarski pas, bišon frize, pudle, retriveri i bradati koli (Woolhead i sar., 2021). Sekundarna IMHA nastaje zbog vezivanja antigena za membranu eritrocita i stvaranja antitela protiv tih „vezanih“ antigena. Izvor antigena mogu biti infektivni agensi, neoplastične ćelije, inflamirano tkivo i lekovi. Za naše područje se najverovatnije može tvrditi da se primarna IMHA pojavljuje ređe u odnosu na sekundarnu. Primarna IMHA ima veću učestalost kod mlađih sterilisanih ženki pasa i kod mladih mačora. Oba tipa IMHA su povezana sa teškom kliničkom slikom i sa visokim mortalitetom. U slučaju sekundarnih IMHA, ukoliko se uspešno leči primarna bolest, prognoza može biti povoljna. Najčešći poznati agensi koji izazivaju IMHA su kod pasa: *Babesia gibsoni*, druge vrste *Babesia*, *Bartonella* spp. *Anaplasma phagocytophilum*, *Ancylostoma caninum* i *Blastomyces dermatitides* (Garden i sar., 2019).

PREPORUKE ZA LABORATORIJSKU DIJAGNOSTIKU IMUNSKI-POSREDOVANIH HEMOLITIČKIH ANEMIJA

Američki koledž za veterinarsku internu medicinu je 2015. godine, formirao radnu grupu sastavljenu od 22 člana. Njihov zadatak je bio da na osnovu pouzdanih publikacija i sopstvenog iskustva napišu preporuke, odnosno postavte relevantne kriterijume neophodne za definitivnu dijagnostiku IMHA kod pasa i mačaka. Publikacija je izašla 2019. godine u *Journal of Veterinary Internal Medicine* (Garden i sar., 2019). U daljem tekstu će biti navedeni i objašnjeni kriterijumi koji se moraju zadovoljiti da bi se postavila dijagnoza IMHA.

ANEMIJA

Prvi kriterijum koji treba da bude zadovoljen je da pas ili mačka imaju anemiju. U metodološkom smislu se može evaluirati hematokritska vrednost dobijena analizom krvi na hematološkom analizatoru ili dobijena mikrohematokritskom metodom. Anemija može biti regenerativna, ali i neregenerativna. Naime, dokazano je da se u oko 2/3 slučajeva, IMHA pojavljuje u regenerativnoj, a kod jedne trećine u neregenerativnoj formi. Broj retikulocita svakako treba zabeležiti i pratiti tokom terapije (Garden i sar., 2019).

ZNACI IMUNSKI-POSREDOVANE DESTRUKCIJE ERITROCITA

Sferociti su eritrociti koji nastaju tako što u slezini dolazi do fagocitoze dela njihove membrane za koji su vezana antitela. Površina membrane se smanjuje i eritrociti dobijaju oblik sfere. Na krvnom razmazu se prepoznaju kao mikrociti bez centralnog prosvetljenja. Mogu se uočiti samo kod pasa, zbog činjenice da njihovi eritrociti fiziološki imaju centralno prosvetljenje. Krvni razmaz mora biti pravilno napravljen i obojen, a prisustvo sferocita se procenjuje na površini gde su eritrociti razvučeni u monosloj i ne preklapaju se. Mimo tog područja može se dobiti lažno pozitivan nalaz usled prisustva artefakata. Neophodno je da se na jednom vidnom polju, na uveličanju $\times 100$ (imerzioni objektiv), izbroji pet sferocita. Nalaz treba potvrditi brojanjem sferocita na 10 vidnih polja. Ukoliko na jednom vidnom polju ima tri do četiri sferocita, a ne mogu se utvrditi drugi etiološki faktori koji bi mogli dovesti do nastanka sferocitoze i taj manji broj sferocita može podržati dijagnozu IMHA. Faktori koji mogu dovesti do pojave sferocitoze su: neoplastična oboljenja, hemolitičko-uremijski sindrom i trovanje pojedinim lekovima (Garden i sar., 2019).

Test aglutinacije sa fiziološkim rastvorom je veoma jednostavan i ekonomičan i izvor je važnih informacija vezanih za dijagnostiku IMHA. Izvodi se tako što se na jedan kraj mikroskopske pločice supsti kap pune krvi, a na drugi kraj pločice se spuste pomešane 4 kapi fiziološkog rastvora i jedna kap krvi i pokriju ljusticama pokrovnica. Oba polja se pregledaju na uveličanju $\times 10$ i $\times 40$. U slučaju inflamacije eritrociti su agregirani i formiraju tzv. *rouleaux* formacije, slažući se

jedan na drugi. Dodavanje fiziološkog rastvora oslabi veze koje ih drže vezane i rasprši ih u monosloj ispod pokrovnice. Ukoliko su eritrociti međusobno vezani posredstvom antitela, dolazi do aglutinacije, koja gomilice eritrocita pretvara u tvorevine nalik punim grozdovima, čija se zrna ne mogu rastaviti uz pomoć fiziološkog rastvora. Lažno pozitivan test aglutinacije se može pojaviti u slučaju hiperproteinemije kod lajšmanijaze, infektivnog peritonitisa mačaka i multiplog mijeloma. Test ne treba raditi sa uzorcima krvi koji su držani u frižideru i tada mogu nastati lažno pozitivni rezultati (Garden i sar., 2019).

Dokazivanje anti-eritrocitnih antitela. Test detekcije anti-eritrocitnih antitela se naziva i direktni Coombs-ov test ili direktni anti-globulinski test (DAT). U isprane eritrocite pacijenta se dodaju antitela protiv imunoglobulina G klase i prati se pojava aglutinacije. Može se izvoditi u pločama od 96 polja, ili u optimizovanim uslovima na gelu. Takođe se može raditi uz pomoć protočne citometrije. Međutim, ukoliko je aglutinacija prisutna i posle pranja eritrocita, nije potrebno raditi ovaj test. Nedavna opsežnija ispitivanja su dokazala da se među uzorcima koji su poslani da se IMHA dokaže uz pomoć Coombs-ovog testa, u oko 50 procenta može detektovati stimulirana aglutinacija (Idalan i sar., 2021). Tokom poslednjih dvadesetak godina se na tržištu pojavljuju različite varijante ovog testa i njegova osetljivost i specifičnost za IMHA se poboljšavaju. Na performanse testa negativno utiču: stajanje krvi, transfuzija i prethodna terapija kortikosteroidima, a lažno pozitivne reakcije se mogu dobiti kod inflamatornih stanja. Svaka teža sistemska inflamacija dovodi do stvaranja anti-eritrocitnih antitela, mada svakako nema svaka inflamacija za posledicu nastanak IMHA (Garden i sar., 2019).

DOKAZIVANJE HEMOLIZE

Sferocitoza – kao što je već rečeno, postajanje sferocitoze upućuje kod pasa na hemolizu.

Hiperbilirubinemija – ikterus, hiperbilirubinemija ili bilirubinurija mogu biti dokaz povećanog obima hemolize ukoliko se eliminiše sumnja da postoji smanjena funkcionalna masa jetre, opstruktivnaolestaza ili sepsa.

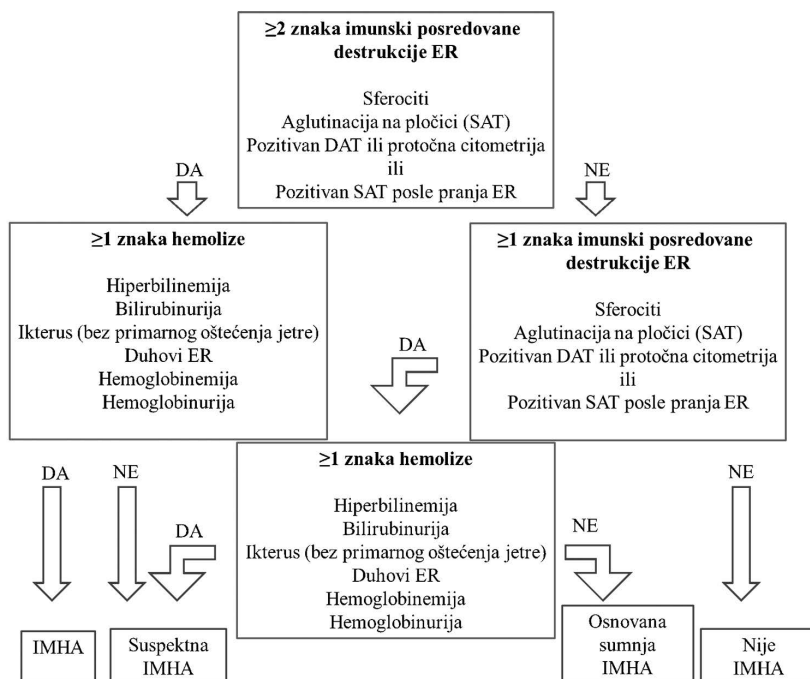
Hemoglobinemija/hemoglobinurija – hemoglobinemija se može uočiti pri likom izdvajanja seruma ili plazme i/ili merenjem slobodnog hemoglobina, ali vađenje krvi mora da bude izvedeno tako da ne proizvede hemolizu kao artefakt. Vađenje krvi iz jugularne vene ređe dovodi do hemolize nego vađenje krvi iz vene safene. Hemoglobinurija se može utvrditi ukoliko sediment urina ne sadrži eritrocite i ukoliko nema mioglobinurije.

Duhovi eritrocita – kada je prisutna intravaskularna hemoliza na razmazu se mogu videti membrane eritrocita koji su se raspukli.

Ukoliko postoji opravdana sumnja da psi imaju vektorski prenosive patogene koji su izazvali IMHA ili oni postoje kao ko-morbiditet, neophodno je izvršiti kompletnu dijagnostiku uključivši i molekularnu dijagnostiku (Milanović i sar., 2020; Beletić i sar., 2021).

Komplikacija IMHA – kod pasa u komplikacije IMHA spadaju: tromboza, tromboembolija i diseminovana intravaskularna koagulacija.

Terapija može biti uspešna, pogotovu ukoliko se radi o sekundarnoj IMHA, odnosno ukoliko se otkrije i leči uzrok stvaranja auto-antitela. Po povlačenju kliničkih znakova bolesti relapsi se javljaju u oko 15 procenata slučajeva.



Šema 1. Algoritam dijagnostike imunski-posredovane hemolitičke anemije (IMHA). Direktni anti-globulinski test (DAT). Prema Garden i sar., (2019).

TERAPIJA

Kada je utvrđena dijagnoza IMHA, može se sprovesti odgovarajuća, dosta složena terapija koja uključuje primenu imunosupresivnih lekova, ali i takozvani „menadžment“ te terapije. Sama IMHA, ali i imunosupresori, kod pasa, mogu izazvati trombozu, a kao najteži oblik plućnu tromboemboliju. Kao prognostički nepovoljni faktori su identifikovani porast koncentracije uree i bilirubina (Swann i sar., 2019).

Imunosupresivna terapija - početak imunosupresivne terapije se preporučuje tek kada se obavi kompletna dijagnostika i odbaci sumnja na eventualno prisustvo neoplazija ili infektivnih agenasa. Prednizolon ili prednizon treba davati *per os* u dozi od 2-3 mg/kg/dan ili 50-60 mg/m²/dan kod pasa težih od 25 kg. Terapija se može davati jedanput dnevno ili dva puta podeljeno na jednake doze.

Ukoliko životinja ne toleriše prednizolon, može se i.v. aplikovati deksametazon (0,2-0,4 mg/kg/dan) tokom prvih nekoliko dana terapije. Ako pacijent odgovori na terapiju porastom hematokrita već u prve dve nedelje, doza se može smanjiti ispod 2 mg/kg/dan i to za 25 procenata. Potom treba smanjivati za narednih 25 procenata na svake 3 nedelje ili eventualno svake 2 nedelje. Kriterijumi za smanjenje doze mogu biti vraćanje bilirubina u referentne vrednosti, gubitak aglutinacije i sferocitoze. Treba proveriti krvnu sliku pre svakog smanjenja doze.

Ukoliko pacijent loše podnosi kortikosteroide, ili oni nisu efikasni, treba uvesti drugi imunosupresivni lek. Indikacije mogu biti sledeće: teška klinička slika pri pregledu, hematokrit pada za više od 5 procenata za 24 sata, neophodne su transfuzije i posle 7 dana terapije.

Kao drugi imunosupresivni lek može se uključiti (lekovi su navedeni abecednim redom): 1. azatioprin 2 mg/kg/dan ili 50 mg/m²/dan *per os*. Posle 2-3 nedelje se može davati svakog drugog dana i potom dalje proredjivati do prestanka davanja. 2. Ciklosporin 5 mg/kg/12 sati *per os*. 3. Mikofenolat mofetil 8-12 mg/kg/12 sati *per os*. Ne preporučuje se davanje ciklofosfamida (Mason i sar., 2003). Na žalost, ni za jedan od navedenih lekova se ne može u potpunosti tvrditi da značajno povećavaju šansu za dugoročnije preživljavanje pacijenata.

Kombinovanje tri i više od tri imunosupresivna leka se ne preporučuje. Ukoliko se drugi imunosupresor uvodi da bi se smanjila doza glukokortikosteroida, nju treba smanjiti za 25 do 50 procenata ukoliko je pacijent stabilan. Kao jedna od mogućnosti se navodi da se drugi imunosupresivni lek nastavi četiri do osam nedelja posle prestanka davanja glukokortikosteroida. Poslednji korak u terapiji je uvođenje trećeg imunosupresivnog leka ili splenektomija. Očekivano je da terapija traje između tri i šest meseci.

Transfuzija – uopšteno gledano, odluka da li treba dati transfuziju zavisi od individualnih slučajeva. Psu kome se anemija brzo pogoršava potrebno je dati transfuziju pre nego psu kod koga se anemija sporo razvija čak iako prvi pas ima nešto viši hematokrit od drugog. Granična hematokritska vrednost kada treba primeniti transfuziju je 12 procenata. Bolje je primeniti transfuziju samih eritrocita nego punu krv. Aglutinacija eritrocita može biti problem prilikom određivanja krvnih grupa kao i kompatibilnosti krvnih grupa. Taj problem moraju razrešiti proizvođači testova koji se koriste. Kod terapije IMHA se ne preporučuje infuzija sveže zamrznute plazme zato što je dokazano da ne utiče na veću stopu preživljavanja. Takođe, intravenska aplikacija imunoglobulina se ne preporučuje i nema dokaza da utiče pozitivno na ishod bolesti.

Monitoring neželjenih efekata imunosupresivne terapije - vlasnici se moraju obučiti da pažljivo nadgledaju svoje ljubimce. Analiza urina sa urinokulturom se preporučuje na svakih 8 do 12 nedelja. Preporučuje se da se biohemijske analize urade pre davanja imunosupresora i da se potom prate promene.

Neželjeni efekti terapije glukokortikosteroidima su: poliurija, polidipsija, polifagija i dahtanje. Dugoročni neželjeni efekti su: stanjivanje kože, kalcinoza, pojavljivanje modrica, atrofija mišića, redistribucija masti u regiju abdomena,

hepatomegalija, piodermija, demodikoza, urinarne infekcije, pogoršanje kongestivne srčane slabosti i predispozicija za šećernu bolest ili pankreatitis. Neželjeni efekti terapije azatioprinom su mijelosupresija i hepatotoksičnost, tako da na svaka dva meseca treba kontrolisati krvnu sliku i biohemijske parametre. Ukoliko se pojavi mijelosupresija treba prestati administraciju leka. Ukoliko je broj neutrofilnih granulocita manji od $1 \times 10^9/l$, preventivno treba dati antibiotike. Može se prepisati rekombinantni faktor rasta granulocita i monocita. Neželjeni efekti terapije ciklosporinom su nauzeja, povraćanje i dijareja, ali nema mijelosupresije. Gastroprotektivna terapija se sprovodi inhibitorima protonske pumpe.

Antitrombotični tretman – termin „tromboprofilaksa“ ili „antitrombotična terapija“ uključuje lekove koji inhibiraju funkciju trombocita kao i aktivnost faktora koagulacije. Preporučuje se da se tromboprofilaksa sprovede kod svih pasa kojima je dijagnostikovana IMHA, osim kod onih kod kojih je broj trombocita manji od $30 \times 10^9/l$. Tromboza se kod pacijenata sa IMHA prevashodno javlja u venama. Tromb nije bogat trombocitima, ali jeste fibrinom. Najveći rizik za trombotične događaje postoji u prve dve nedelje po tretmanu. Preporučuje se davanje klopidogrela i/ili aspirina i nefrakcionisanog heparina uz kontrolu aktiviranog parcijanog tromboplastinskog vremena i individualano prilagođavanje doze heparina. Detaljniji prikaz antitrombotične terapije je prikazan u radu Swann i sar. (2019).

ZAKLJUČAK

U radu su prikazane sve ključne analize važne za dijagnostiku IMHA. Za sve analize koje zahtevaju rad sa mikroskopom, neophodno je imati određeni stepen laboratorijske veštine, ali upornost u primeni navedenih procedura će biti nagrađena većim brojem postavljenih dijagnoza i pravilno vođenih terapija.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Beletić A, Janjić F, Radaković M, Spariosu K, Francuski Andrić J, Chandrashekar R., et al., 2021. Systemic inflammatory response syndrome in dogs naturally infected with *Babesia canis*: Association with the parasite load and host factors. *Veterinary Parasitology*, 291:109366. 2. Fleischman W. 2012. Anemia: determining the cause. *Compendium in Continual Education Veterinary* 34:E1.2692674. 3. Garden O.A., Kidd L., Mexas A.M., Chang Y.M., Jeffery U., Blois S.L., et al. 2019. ACVIM consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33:313-34. 4. Idalan N., Zeitz J.O., Weber C.N., Müller E., Giger U. 2021. Comparative study of immunohematological tests with canine blood samples submitted for a direct antiglobulin (Coombs') test. *Canine Medicine and Genetics* 13; 8 :10. 5. Kovačević

Filipović M., Spariosu K., Janjić F., Radaković M., Ilić Božović A., Davitkov D., et al. 2022. Kliničko-patološki pristup anemijama različite etiologije. Twenty-third regional symposium on small animal clinical pathology and therapy. Fruška Gora 09-11. June, 29. **6.** Mason N., Duval D., Shofer F.S., Giger U. 2003. Cyclophosphamide exerts no beneficial effect over prednisone alone in the initial treatment of acute immune-mediated hemolytic anemia in dogs: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17:206-12. **7.** Milanović Z., Beletić A., Vekić J., Zeljković A., Andrić N., Božović A.I., et al. 2020. Evidence of acute-phase reaction in asymptomatic dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 282:109140. **8.** Swann J.W., Garden O.A., Fellman C.L., Glanemann B., Goggs R., LeVine D.N., et al. 2019. ACVIM consensus statement on the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33:1141-72. **9.** Woolhead V.L., Szladovits B., Chan A., Swann J.W., Glanemann B. 2021. Breed predispositions, clinical findings, and prognostic factors for death in dogs with nonregenerative immune-mediated anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35:252-60.

VALIDACIJA POINT-OF-CARE IMUNOFLUORESCENTNOG UREĐAJA ZA ODREĐIVANJE HORMONA U KRVI PASA I MAČAKA I UPOTREBA U RUTINSKOJ DIJAGNOSTICI

Marko R. Cincović¹, Branislava Belić², Mira Majkić¹,
Sandra Nikolić¹, Nikolina Novakov¹

Kratak sadržaj

„Point-of-Care“ ispitivanje je priručno laboratorijsko ispitivanje uz životinju koji ima sledeće osobine: 1. da daje uporedive rezultate sa onima koje dobija centralna laboratorija 2. da je malih dimenzija, jednostavno za korišćenje, odnosno da iziskuje minimalan broj radnih operacija 3. da mora biti otporno na transport, čuvanje i primenu 4. da ima osiguranu kontrolu kvaliteta, uključujući i automatsku kalibraciju, 5. da je održavanje jednostavno i besplatno, izuzev rutinskog ispiranja, 6. da se može povezati sa računarom radi čuvanja rezultata i kontrole kvaliteta i 7. da se nabavlja od pouzdanog distributera, koji može osigurati neophodan servis. Na tržištu Srbije se pojavio novi POCT uređaj HV-FIA 3000 proizvođača HealVet. Radi se o tehnologiji suve imunohemije sa impregnacijom testova na test-stripovima. Test stripovi se čuvaju na sobnoj temperaturi i dugog su roka (24 meseca). Aparat ima “touch-screen” platformu koja se lako koristi. Nakon mešanja uzorka sa puferom, koji se nalazi u svakom pakovanju testa, test se postavlja u analizator. Analizator meri koncentraciju analita, po pred-programiranom i unapred kalibrisanom procesu. Analizator je zatvorenog tipa i podržava samo testove istog proizvođača. Pomoću ovih metoda može se odrediti koncentracija kortizola, T4, TSH i progesterona u krvi pasa i mačaka. Vršili smo validaciju upotrebe ovog POCT uređaja i poređenje sa rezultatima dobijenim na uređaju TOSOH AIA-360. Preciznost POCT metoda je veoma visoka, tako da je greška aparata pri ponovljenom merenju iz istog uzorka bila CV<10% za sve hormone. Koeficijent determinacije između POCT i TOSOH metode bio je u rasponu od 85 do 98%. Metode su se dobro pokazale na testu razređenja za sve hormone. Aparat je precizno detektovao visoke, normalne i niske koncentracije hormona i ne dovodi do pogrešne klasifikacije uzorka sa visokim, niskim i normalnim koncentracijama. Za pravilnu dijagnostiku potrebno je poznavati i dijagnostičke kriterijume koje su propisali proizvođači ovog POCT analizatora. Upotre-

¹Dr sci. vet. med. Marko Cincović, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Mira Majkić, docent; dr sci. vet. med. Nikolina Novakov, vanredni profesor; dr vet. Sandra Nikolić, asistent, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu - Laboratorija za patološku fiziologiju, Novi Sad, R. Srbija

²Dr sci. med. Branislava Belić, redovni član akademije, Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva

*e-mail autora za korespondenciju: mcincovic@gmail.com

ba HV-FIA 3000 POCT analizatora je korisna u rutinskoj dijagnostici endokrinopatija, posebno ako se izvrši kvalitetna validacija.

Ključne reči: dijagnostika, endokrinološka analiza, imunochemija, mačke, POCT aparati, psi

ZNAČAJ POINT-OF-CARE TESTIRANJA U VETERINARSKOJ MEDICINI

Merenje vrednosti različitih analita iz biološkog materijala predstavlja nezaobilazan istraživački i dijagnostički alat koji se svakodnevno koristi, a bez dopunske laboratorijske dijagnostike nije moguće potvrditi dijagnozu niti adekvatno usmeriti terapiju, posebno u endokrinologiji (Belić i Cincović, 2019). Pored navedenog, u svakodnevnom edukovanju doktora veterinarske medicine kao i studenata dodiplomskih ili postdiplomskih studija koriste se rutinske laboratorijske procedure, koje oni svakodnevno izvode na nastavi ili uz pacijenta, kako bi se stekle adekvatne veštine u dijagnostici različitih oboljenja (Cincović, 2020). U studijama brojnih autora je definisano "Point-of-Care, testiranje, njegove osnovne karakteristike i izazovi (Luppa i sar., 2011; Shaw, 2016; Nicholas, 2020), a ono je definisano i u nacionalnim smernicama za ove vrste ispitivanja. "Point-of-Care" ispitivanje je priručno laboratorijsko ispitivanje uz životinju koji ima sledeće osobine: 1. da daje uporedive rezultate sa onima koji se dobijaju u centralnoj laboratoriji, 2. da je uređaj malih dimenzija i jednostavan za korišćenje, odnosno da iziskuje minimalan broj radnih operacija, 3. da uređaj bude otporan na transport, čuvanje i primenu, 4. da ima osiguranu kontrolu kvaliteta, uključujući i automatsku kalibraciju, 5. da je održavanje uređaj jednostavno i besplatno, izuzev rutinskog ispiranja, 6. da se može povezati sa računarom radi čuvanja rezultata i kontrole kvaliteta i 7. da se nabavlja od pouzdanog distributera, koji može osigurati neophodan servis. Point-of-care testiranje (POCT) se odnosi na bilo koje laboratorijsko testiranje koje se obavlja van konvencionalne referentne laboratorije i podrazumeva blisku blizinu pacijenata. Instrumentalni POCT sistemi se sastoje od malih, ručnih ili stonih analizatora. Oni su potencijalno korisni u mnogim veterinarskim okruženjima, uključujući privatne klinike, akademske veterinarsko-medicinske centre, zajednicu (npr. veterinarske medicinske timove na udaljenim područjima) i za istraživačke aplikacije u akademskim krugovima, vladi i industriji. Ove vrste testiranja su vrlo primamljive za veterinare, zbog toga što zahtevaju minimalni manuelni rad, testovi su veoma stabilni i dosta brzo se dobijaju rezultati koji mogu poslužiti za dalje dijagnostičke ili terapijske svrhe. Ipak, iako ove metode testiranja izgledaju kao da nije potrebno nikakvo dodatno znanje niti angažovanje oko opreme ili rada, sam proces uspostavljanja ove vrste testiranja i njen monitoring se ne razlikuju mnogo od konvencionalnih metoda koji se koriste u većim laboratorijama. Karakteristika ove opreme i metoda je da se radi o relativno jeftinoj opremi koja koristi mikrofluide u dijagnostičke svrhe, a celokupne analize su u tolikoj meri integrisane da se često nazivaju i laboratorija na čipu (Sia i Kricka, 2008; Sista i sar., 2008; Chin i sar., 2013).

Flatland i sar. (2013) su konstatovali da postoji zabrinutost za kvalitet veterinarskih ispitivanja na klinikama i predložili su smernice za POCT testiranje.

Glavne preporuke uključuju (1) zauzimanje formalizovanog pristupa POCT-u, u okviru objekta, (2) korišćenje pisanih politika, standardnih operativnih procedura, obrazaca i dnevnika, (3) obuku operatera, uključujući periodičnu procenu veština, (4) procenu analitičke performanse instrumenata i korišćenje i statističku kontrolu kvaliteta i programa eksterne procene kvaliteta, (5) korišćenje pravilno uspostavljenih ili validiranih referentnih intervala i (6) obezbeđivanje tačnog izveštavanja o rezultatima pacijenata. Oni navode da se, tamo gde je to moguće, s obzirom na analitičke performanse instrumenta, preporučuje korišćenje validiranog 13s kontrolnog pravila za interpretaciju kontrolnih podataka. Smernice nesumnjivo ukazuju da je neophodno da se POCT aparati i testiranja kontrolišu i da je potrebno znati njihove analitičke performanse. U narednoj godini su Bell i sar. (2014) sprovedli anketu kojom je utvrđeno da postoje različiti problemi u znanjima, shvatanjima i praksi veterinaru kada se radi o POCT laboratoriji. Mnogi veterinaru nisu sprovodili kontrolu kvaliteta, nisu validirali aparate i nisu formirali sopstvene referentne vrednosti, već su se držali isključivo laboratorijskih preporuka, koje takođe moraju biti validirane. Određivanje sopstvenih referentnih vrednosti je od velikog značaja za interpretaciju dobijenih rezultata, a postoje različite propisane i modifikovane metode za njihovo utvrđivanje (Belić i Cinović, 2020) Ipak, u radu koji su publikovali Busin i sar. (2016) opisane su velike mogućnosti upotrebe POCT metoda u veterinarskoj medicini.

HEALVET IMUNOFLUORESCENTNI POINT OF CARE LABORATORIJSKI TESTOVI ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE HORMONA U KRVI PASA I MAČAKA – RUTINSKA DIJAGNOSTIKA

Na tržištu Srbije se nedavno pojavio novi POCT uređaj HV-FIA 3000 proizvođača HealVet. Radi se o tehnologiji suve imunoheemije sa inpregniranim testovima na test-stripovima (trakama). Test stripovi se čuvaju na sobnoj temperaturi i dugog su roka (24 meseca). Aparat ima "touch-screen" platformu koja se lako koristi. Nakon mešanja uzorka sa puferom, koji se nalazi u svakom pakovanju testa, test se postavlja u analizator. Analizator meri koncentraciju analita, po pred-programiranom i unapred kalibrisanom procesu. Analizator je zatvorenog tipa i podržava samo testove istog proizvođača. Pomoću ovih metoda se može odrediti koncentracija kortizola, T4, TSH i progesterona u krvi pasa i mačaka. Ovaj test koristi kvantitativnu kompetitivnu fluorescentnu imunoesesku tehniku. Test kompetitivnog vezivanja se zasniva na konkurenciji obeleženog i neobeleženog analita za ograničen broj mesta vezivanja antitela. Nevezana antitela i imunokompleksi migriraju duž nitrocelulozne membrane napred do test linije. Nevezana antitela se zatim "hvataju" antigenima imobilisanim na test liniji. Što je više hormona u uzorku pacijenta, formira se više imunokompleksa, tako da je manje fluorescentno obeleženih antitela uhvaćeno na test liniji. Intenzitet fluorescentnog signala odražava količinu uhvaćenog hormona i obrađuje se u Healvet TM FIA 3000.

Protokol je jednostavan i za sve analize istovetan i uključuje sledeće korake: 1. Postaviti uređaj za testiranje na čisto, ravno horizontalno mesto; 2. Uveriti se

da se broj serije test uređaja poklapa sa brojem ID čipa. Umetnuti ID čip u merač. Imati na umu da se dodiruje vrh za umetanje ID čipa; 3. Pipetirati 75 µl pripremljenog uzorka u pufer i dobro promešati; 4. Odmah pipetirati 75 µl pomešanog uzorka da bi ga dodali u uzorak uređaja za testiranje. Mešani uzorak se mora dodati u roku od 2 minuta. Izbegavati stvaranje mehurića; 5. a) Režim brzog testiranja: pokrenuti tajmer odmah nakon dodavanja mešavine uzorka u komoricu za uzorke. Ostaviti test uređaj na sobnoj temperaturi 15 minuta. Zatim odmah umetnuti uređaj za testiranje u držač merača i kliknuti Test. Instrument će automatski skenirati uređaj za testiranje i prikazati rezultat testa. b) Standardni režim testiranja: umetnuti uređaj za testiranje u držač uređaja na meraču odmah nakon dodavanja uzorka u komoricu za uzorak, kliknite na Test. Merač će početi da odbrojava i automatski očitava rezultat testa; 6. Rezultati se prikazuju na glavnom ekranu ili se štampaju klikom na komandu Štampaj.

Interpretacija dobijenih rezultata zavisi od koncentracije izmerenih hormona. Kada je kortizol u pitanju, detekcioni limit je od 10 do 1000 nmol/l. Posle stimulacije sa ACTH, u količini od 2,2 IU/kg, a sa maksimalnom dozom koja ne prelazi 40 IU meri se koncentracija kortizola nakon dva časa. Interpretacija rezultata je data u tabeli 1. Prilikom upotrebe testa supresije sa malim dozama deksametazona (engl, *LDDST – Low Dose Dexamethasone Suppression Test*), a posle davanja 0,01 mg/kg heksadekadrola, prikazane su koncentracije kortizola izmerene 4 i 8 časova posle testa (tabela 2). Upotreba desetostruko većih doza je takođe moguća i tada se radi o testu supresije visokim dozama deksametazona (HDDST), a rezultati su prikazani takođe u tabeli 2. Detekcioni rang za tiroksin (T4) je od 6,4 do 120 nmol/l, a laboratorijska interpretacija pomoću Healvet aparata je data u tabeli 3. Detekcioni rang za TSH iznosio je 0,1-100 mIU/l(0,01-5 ng/ml), a interpretacija rezultata je prikazana u tabeli 4. Detekcioni rang za progesteron je iznosio 1-50 ng/ml (3,18-159 nmol/l), a interpretacija nalaza je prikazana u tabeli 5.

Tabela 1. Koncentracija kortizola pre i posle ACTH stimulacije i dijagnostička vrednost

Kortizol pre stimulacije	Kortizol posle stimulacije	Dijagnostička vrednost
<55 nmol/l	<55 nmol/l	Potrebno ga je proceniti u kombinaciji sa vrednošću testa kortizola nakon stimulacije, Addisonova bolest.
	55-166 nmol/l	Neizvesna
55-166 nmol/L	55-166 nmol/l	Neizvesna
	166-500 nmol/l	Normalne vrednosti
	500-663 nmol/l	Sumnjiv na Kušingov sindrom
	>663 nmol/L	Kušingov sindrom, zahteva test supresije visokim dozama deksametazona za razlikovanje između adrenalnih i pituitarnih uzroka (PDH - Pituitary-dependent hyperadrenocortism i ATH – adrenalnom promenom izazvan hiperadrenokorticizam)

Tabela 2. Rezultati i interpretacija kod primene testa supresije sa niskim (LDDST) ili visokim dozama deksametazona (HDDST)

Vrsta testa	Bazične vrednosti kortizola	Vrednost kortizola posle 4 časa	Vrednost kortizola posle 8 časova	Dijagnoza
LDDST	normalan	<39 nmol/l	<39nmol/l	Normalno
	normalan ili povišen	>39 nmol/l i >50% bazalne vred.	>39nmol/l i >50% bazalne vred.	Kušingov sindrom
	normalan ili povišen	<39 nmol/l ili <50% bazalne vred.	>39nmol/L i >50% bazalne vr.	PDH
	normalan ili povišen	>39 nmol/l ili >50% bazalne vred.	>39 nmol/l i <50% bazalne vred.	PDH
	normalan ili povišen	<39 nmol/l ili <50% bazalne vred.	>39 nmol/l i <50% bazalne vred.	PDH
HDDST	normalan ili povišen	<39 nmol/l ili <50% bazalne vred.	>39 nmol/l i >50% bazalne vred.	PDH
	normalan ili povišen	>39nmol/l i >50% bazalne vr.	<39 nmol/l ili <50% bazalne vred.	PDH
	normalan ili povišen	<39nmol/l ili <50% bazalne vr.	<39 nmol/l ili <50% bazalne vred.	PDH
	normalan ili povišen	>39nmol/l i >50% bazalne vred.	>39 nmol/l i >50% bazalne vred.	Dodatni testovi za razlikovanje PDH i ADH

Tabela 3. Interpretacija izmerene koncentracije tiroksina (T4)

	Ocena	nmol/l	µg/dl
Psi	Nisko	<12,9	<1,0
	Normalno	12,9-50	1,0-3,9
	Visoko	>50	>3,9
Mačke	Nisko	<10,3	<0,8
	Normalno	10,3-60	0,8-4,7
	Visoko	>60	>4,7

Tabela 4. Interpretacija izmerene koncentracije TSH

	Ocena	mIU/l	ng/ml
Psi	Normalno	0-37	0-0,6
	Abnormalno	>37	>0,6
Mačke	Normalno	0-21	0-0,3
	Abnormalno	>21	>0,3

Tabela 5. Interpretacija izmerene koncentracije progesterona

Status	ng/ml	nmol/l
Nije u teranju ili proestrus	<1,0	<3,18
Rani nivo ovulacije	1-5	3,18-15,9
Ovipozitivni period	5-10	15,9-31,8
Najbolji period za pripust ili VO	10-20	31,8-63,6
Starenje jajnih ćelija	>30	>95,4

Opšta ograničenja u interpretaciji rezultata:

1. Ovaj test je razvijen za testiranje seruma pasa ili mačaka, ili uzorka krvne plazme.
2. Rezultate Healvet TM brzog kvantitativnog testa kortizola treba proceniti sa svim dostupnim kliničkim i laboratorijskim podacima. Ako se rezultati testa ne slažu sa kliničkom procenom, potrebno je izvršiti dodatne testove u skladu sa tim.
3. Lažno pozitivni rezultati uključuju unakrsne reakcije sa nekim komponentama krvi od pojedinih molekula do antitela. Može nastati i nespecifična adhezija nekih komponenti u krvi pasa ili mačaka koje imaju slične epitope za hvatanje i detekciju antitela. U slučaju lažno negativnih rezultata, najčešći faktori su: nereagovanje antigena i antitela tako što određene nepoznate komponente maskiraju njegov epitop, tako da antigen ne može da se "vidi" od strane antitela; nestabilnost antigena kortizola, što dovodi do degradacije tokom vremena i/ili temperature, tako da antitela više ne mogu da ih prepoznaju i degradiranje drugih komponenti testa. Performanse testa su veoma osetljive na uslove skladištenja i rukovanja kompletima i uzorcima uzoraka u optimalnim uslovima.
4. Postoji mogućnost da faktori kao što su tehničke ili proceduralne greške, kao i dodatne supstance u uzorcima krvi, mogu ometati test i prouzrokovati pogrešne rezultate.

VALIDACIJA RUTINSKE HEALVET METODE

Validacija ili vrednovanje metode je postupak utvrđivanja, odnosno potvrđivanja, da je metoda prikladna za korišćenje u određenu svrhu. Validacijom potvrđujemo da će metoda dati tačne rezultate (Krajiović-Zogović i Matović, 2006; Trogljić i sar., 2009). Postoje dva pristupa validaciji: međulaboratorijski (spoljašnje vrednovanje) i laboratorijski (unutrašnje vrednovanje). Ukoliko je razvijena metoda za široku primenu, potreban je međulaboratorijski pristup validaciji. U tom pristupu, dve ili više laboratorija ispituju identičan analitički uzorak uz dogovorene uslove u svrhu provere izvedbenih uslova ispitivanja. Prednost ovog pristupa validaciji je velika zbog toga što objavljeni podaci (preciznost i tačnost)

značajno skraćuju opseg posla za buduće laboratorije koji će koristiti određenu validiranu metodu (Božić, 2020). Tačnost metode je bliskost dobijene vrednosti tačnoj vrednosti. Za određivanje tačnosti postoje mnoge metode: rikaveri test (engl. *recovery test*), poređenje sa rezultatima druge validirane ili generalno prihvaćene metode, međulaboratorijske studije i analiza sertifikovanog referentnog materijala. Mi smo vršili validaciju upotrebe ovog POCT uređaja i poređenje sa rezultatima dobijenim na uređaju TOSOH AIA-360. Preciznost POCT metoda je veoma visoka, tako da je greška aparata pri ponovljenom merenju iz istog uzorka bila sa $CV < 10\%$ za sve hormone. Tačnost metoda je bila visoka jer je koeficijent determinacije između POCT i TOSOH metode bio: 85% za TSH, 95% za progesteron, 96% za T4 i 98% za kortizol. T-test parova za razlikovanje koncentracije hormona dobijenih na TOSOH AIA-360 i Healvet POCT uređaja nije ukazao na statističku značajnost razlika. Bias između metoda je utvrđen tako da je vrednost u Healvet aparatu u odnosu na TOSOH odstupala na sledeći način: za kortizol (+7,1%; 95%CI 5,5-8,6%), za T4 (+9,1%; 95%CI 7,5-10,6%), za TSH (+10,5%; 95%CI 8-13%) i za progesteron (-4,1%; 95%CI 2-6,05%). Najveći broj neslaganja se nalazio upravo u navedenim rasponima, pa možemo zaključiti da postoji dobro slaganje između TOSOH i HEALVET tehnologije, osim za TSH. Aparat je tačno detektovao visoke, normalne i niske koncentracije hormona i ne dovodi do pogrešne klasifikacije uzorka sa visokim, niskim i normalnim koncentracijama. Metoda ispoljava senzitivnost i sa razređenjem, vrednost koncentracije hormona linearno opada.

ZAKLJUČAK

Upotreba POCT aparata je veoma korisna i široko rasprostranjena u veterinarskoj medicini. Nova Healvet tehnologija u endokrinologiji je veoma korisna u kliničkoj praksi. Za pravilnu dijagnostiku potrebno je poznavati i dijagnostičke kriterijume koje su propisali proizvođači ovog POCT analizatora. Da bi u potpunosti bili sigurni u rezultate koje nam aparat daje potrebno je sprovesti postupak validacije metoda u laboratoriji prilikom nabavke aparata i uvođenja metoda, što se postiže kroz međulaboratorijsku razmenu uzoraka ili poređenjem dve metode, od čega je jedna od metoda dobro validirana i njen kvalitet i upotrebnost vrednost su poznati od ranije. Korišćenje POCT aparata u dijagnostici je po svojoj prirodi jednostavno i dostupno veterinarima ali je ipak potrebno da se usvoje dodatna znanja i veštine i sprovede validacije aparata/metode, kako bi bili sigurni u pouzdanost i tačnost rezultata.

LITERATURA

1. Belić B., Cincović M. 2019. Laboratorijske tehnike u patološkoj fiziologiji. Poljoprivredni fakultet Novi Sad – Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad.
2. Belić B., Cincović M. 2020. Referentne vrednosti važnijih laboratorijskih parametara u krvi životinja. Monografija. Poljoprivredni fakultet-Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad.
3. Bell R., Harr K., Rishniw M., Pion, P. 2014. Survey of point-of-care instrumentation,

analysis, and quality assurance in veterinary practice. *Veterinary Clinical Pathology*, 43: 185-92. **4.** Božić J. 2020. Validacija analitičkih metoda. University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Chemistry. **5.** Busin V., Wells B., Kersaudy-Kerhoas M., Shu W., Burgess S.T. 2016. Opportunities and challenges for the application of microfluidic technologies in point-of-care veterinary diagnostics. *Molecular and cellular probes*, 30: 331-41. **6.** Chin C.D., Chin S.Y., Laksanasopin T., Sia S.K. 2013. Low-cost microdevices for point-of-care testing. In *Point-of-care diagnostics on a chip* (pp. 3-21). Springer, Berlin, Heidelberg. **7.** Cincović Marko (ur.): Kvalitet u veterinarskom visokom obrazovanju. Monografija. Poljoprivredni fakultet Novi Sad, 2020. **8.** Flatland B., Freeman K.P., Vap L.M., Harr K.E. 2013. ASVCP guidelines: quality assurance for point-of-care testing in veterinary medicine. *Vet Clin Pathol*. 42: 405-423. doi: 10.1111/vcp.12099. PMID: 24320778. **9.** Karajović Zogović M., Matović V. 2006. Validacija metoda ispitivanja. 33. Nacionalan konferencija o kvalitetu Festival kvaliteta, pp A134-A138 **10.** Lippa P.B., Müller C., Schlichtiger A., Schlebusch H. 2011. Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(6):887-98. **11.** Nichols J.H. 2020. Point-of-care testing. In *Contemporary Practice in Clinical Chemistry* (pp. 323-336). Academic Press. **12.** Shaw J.L. 2016. Practical challenges related to point of care testing. *Practical laboratory medicine*, 4: 22-9. **13.** Sia S.K., Kricka L.J. 2008. Microfluidics and point-of-care testing. *Lab on a Chip*, 8(12): 1982-1983. **14.** Sista R., Hua Z., Thwar P., Sudarsan A., Srinivasan V., Eckhardt A., ... Pamula, V. 2008. Development of a digital microfluidic platform for point of care testing. *Lab on a Chip*, 8(12): 2091-2104. **15.** Trogrlić E., Strineka A., Sekulić D. 2009. Međulaboratorijska ispitivanja i njihova primjena, *Građevinar* 61: 643-54.

LABORATORIJSKI PROFIL SINOVIJALNE TEČNOSTI KOD ŠEST RADNIH KONJA RAZLIČITE STAROSTI

Lazar Marković^{1}, Stefan Đoković¹, Milena Radaković¹,
Jelena Francuski Andrić¹, Ivan Milošević¹, Anđelo Beletić^{2,3},
Milica Kovačević Filipović¹*

Kratak sadržaj

Inflamatorni i degenerativni procesi na zglobovima konja se mogu postepeno razvijati, pri čemu klinički znaci patoloških promena često nisu vidljivi. Cilj ove studije je bio da se na osnovu rutinskog pregleda sinovijalne tečnosti (ST) poreklom iz metakarpometatarzofalangealnih (MCP/MTP) zglobova radnih konja, koji su bili upućeni na klanje i njenih biohemijskih karakteristika utvrdi da li je postojala lokalna inflamacija. Studija je sprovedena na 6 konja starosti 3 do 12 godina (medijana 8), odnosno 24 MCP/MTP zgloba. Post mortem, iz svakog zgloba je uzorkovana ST. Kliničkim pregledom pre klanja, nisu uočene promene u izgledu i funkciji mišićno-skeletnog sistema. Urađen je rutinski pregled ST kojim je opisana boja, prozirnost, viskoznost i broj ćelija. Određena je koncentracija sledećih biohemijskih parametara: ukupnih proteina, albumina, aktivnost alkalne fosfataze (ALP), aspartat aminotransferaze (AST), kreatin kinaze (CK), kao i koncentracije haptoglobina (Hp) i ceruloplazmina (Cp). Kod svih uzoraka, ST je bila bistra, providna, viskozna i blede do blede žute boje. Najmlađi konj, star tri godine, je u sva četiri pregledana zgloba imao ukupan broj ćelija 200-890/ μ L, što odgovara fiziološkim vrednostima. Dva konja su imala povećan broj ćelija na jednom, odnosno dva zgloba (1 400-2 560/ μ L), dok su tri konja imala promene na sva četiri zgloba (1 100-2 200/ μ L). Ispitivani biohemijski parametri se nisu razlikovali u uzorcima ST iz zglobova sa ukupnim brojem ćelija u okviru fizioloških vrednosti i onih kod kojih je broj ćelija bio povećan. Pozitivne, umerene korelacije su postojale između koncentracije proteina i aktivnosti ALP, koncentracije proteina i albumina, aktivnosti AST i CK. Ispitivanjem ST radnih konja, dokazano je da inflamatorne promene u MCP/MTP zglobovima nisu prisutne. Nalaz povećanog broja ćelija u ST bez inflamatornih promena zahteva dodatna ispitivanja.

Ključne reči: *enzimska aktivnost, proteini akutne faze, sinovijalna tečnost*

¹Dr vet. Lazar Marković, asistent; dr sci. vet. med. Stefan Đoković, docent; dr Milena Radaković, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Jelena Francuski Andrić, docent; dr sci. vet. med. Ivan Milošević, docent; dr sci. vet. med. Milica Kovačević Filipović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

^{2,3}Dr sci. med. Anđelo Beletić, naučni saradnik, Univerzitetski klinički centar Srbije, Beograd, R. Srbija & Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Klinika za interne bolesti, Laboratorija za proteomiku, R. Hrvatska

*e-mail adresa autora za korespondenciju: lazamarkovic1992@gmail.com

UVOD

Sinovijalna tečnost (ST) je bistra providna do bledo žuta visoko viskozna tečnost koja predstavlja ultrafiltrat plazme izmenjen sekretornom aktivnošću sinoviocita. U odnosu na krvnu plazmu, ona ima nižu koncentraciju proteina i visoku koncentraciju hijaluronske kiseline i drugih glikoproteina koji joj daju viskoznost. Sinovijalna tečnost zglobova, tetivnih ovojnica i burzi ima ulogu da te površine učini skliskim i smanji trenje u kontaktu dve površine, da transportuje hranljive materije do hondrocita, kao i da uklanja štetne proizvode metabolizma hrskavice (Steel i sar., 2008; Ismail i Rukibat, 2006).

Analiza ST u kliničkoj praksi, uključuje određivanje njenih fizičkih karakteristika – količine, boje, prozirnosti i viskoznosti. Osim toga, određuje se koncentracija ukupnih proteina, ukupan broj i procentualna zastupljenost mononuklearnih i polimorfonuklearnih ćelija. Izmenjene fizičke karakteristike ST i povećanje broja ćelija i koncentracije proteina u ST ukazuju na inflamatorni proces (Steel i sar., 2008).

Ceruloplazmin (Cp) i haptoglobin (Hp) su proteini akutne faze koji se kod konja smatraju markerima akutne i hronične inflamacije. Njihova koncentracija može da poraste do 10 puta kada postoji oštećenje tkiva (Basile i sar., 2013) i često mogu biti osetljiviji markeri oštećenja u odnosu na promene u broju ćelija i ukupnoj koncentraciji proteina. Degenerativni i inflamatorni procesi na zglobovima konja se mogu postepeno razvijati, pri čemu klinički znaci patoloških procesa često nisu jasni. Zbog toga, analiza ST može imati važnu ulogu u dijagnostici inflamatornih stanja vezanih za zglobne strukture (Madison i sar., 1991). U literaturi ne postoje podaci o koncentraciji Cp i Hp u ST kod radnih konja. Takođe nije ispitan njihov značaj u dijagnostici oštećenja tkiva niskog intenziteta koje ne daje jasne kliničke znake bolesti.

Cilj ove studije je bio da se utvrdi da li je kod radnih konja različitih starosnih kategorija postojala lokalna inflamacija u metakarpo/metatarzofalangealnim zglobovima i to na osnovu fizičkog pregleda pregleda ST, ukupne koncentracije proteina i albumina, broja ćelija i koncentracije Cp i Hp. Osim toga, kao dodatne analize koje mogu da ukažu na promene muskulo-skeletnog sistema određivane su aktivnosti alkalne fosfataze (ALP), kreatin kinaze (CK) i aspartat aminotransferaze (AST).

MATERIJAL I METODE

Životinje

Studija je sprovedena na šest konja, muškog pola, starosti od 3 do 12 godina (medijana 8 godina) posle komercijalnog klanja. Sve životinje su pregledane pre klanja i nije utvrđeno da imaju probleme vezane za mišićno-skeletni sistem. ST je uzorkovana *post mortem* iz metakarpofalangealnih i metatarzofalangealnih zglobova.

Pregled sinovijalne tečnosti

Uzorkovanje ST je obavljeno pod aseptičnim uslovima. Nakon postavljanja ekstremiteta u bočni položaj i blage fleksije zgloba, igla od 20G je plasirana između metakarpalnog/metatarzalnog kondila i lateralne proksimalne sezamoidne kosti, a zatim je uzorkovano oko 3 ml ST u epruvete bez antikoagulansa. Rutinski pregled koji uključuje opisivanje boje, prozirnosti i viskoznosti ST je obavljen odmah nakon uzorkovanja. Mikroskopski razmazi ST su osušeni na vazduhu i obojeni Romanovskim tipom bojenja (Bio-Diff, Biognost, Hrvatska). Ukupan broj ćelija je određivan manuelno, sa razmaza, upotrebom optičkog mikroskopa (Olympus CX21, Munster, Germany). Kao referentna vrednost je smatran broj ćelija $\leq 1\ 000/\mu\text{L}$ (Stel i sar., 2008). Uzorci ST su čuvani na temperaturi od -20°C do daljih biohemijskih ispitivanja.

Biohemijske analize

Koncentracija ukupnih proteina i albumina i aktivnost ALP, AST i CK su određivane na biohemijskom analizatoru Technicon RA-XT (Bayer, Nemačka) prema uputstvima proizvođača testova (Elitech, Puteaux, Francuska). Koncentracija Cp i Hp u ispitivanim uzorcima određivana je metodom spektrofotometrije (Milanović i sar., 2020). Kao referentna vrednost za koncentraciju proteina je uzet podatak iz literature $\leq 20\text{g/l}$ (Stel i sar., 2008).

Statističke analize

U statističkoj obradi podataka primenjeni su: deskriptivna statistika, *Mann-Whitney U* test i *Spearman*-ov test koeficijenta korelacije ranga.

REZULTATI

Kod svih ispitivanih uzoraka ST je bila bistra, providna, viskozna i blede do blede žute boje sa koncentracijom proteina u okviru referentnih vrednosti. Samo jedan i to najmlađi konj, je u sva četiri pregledana zgloba imao broj ćelija koji je odgovarao referentnim vrednostima (tabela 1). Tri konja su imala povećan broj ćelija na jednom i dva zgloba, dok su tri konja imala promene na sva četiri zgloba. Svi konji sa promenama na jednom ili više zglobova su bili stari preko 7 godina (tabela 1).

Tabela 1. Starost konja i broj metakarpofalangealnih i metatarzofalangealnih zglobova sa ukupnim brojem ćelija iznad referentnih vrednosti i minimalne (min) i maksimalne (max) vrednosti apsolutnog broja ćelija u zglobovima.

Redni broj	Starost godine	Broj zglobova sa povećanim brojem ćelija	Apsolutan broj ćelija (min - max)
1	3	Bez promena	200 - 890
2	12	1	1 400
3	10	2	2 560*
4	12	4	1 100 - 1 900
5	7	4	1 300 - 2 200
6	9	4	1 200 - 1 600

*u oba zgloba je broj ćelija bio isti

U daljoj analizi su upoređene vrednosti biohemijskih parametara u dve grupe uzoraka ST. Jednu grupu su činili uzorci kod kojih je broj ćelija bio u okviru referentnih vrednosti (n=9), a drugu grupu u kojoj je broj ćelija iznad referentnih vrednosti (n=15). Između srednjih vrednosti ispitivanih parametara nije bilo statistički značajnih razlika (tabela 2).

Tabela 2. Biohemijski parametri ST iz zglobova sa ukupnim brojem ćelija koji se nalazi u okviru ($\leq 1000/\mu\text{L}$) i iznad ($\geq 1000/\mu\text{L}$) referentnih vrednosti.

Parametar	$\leq 1000/\mu\text{L}$ n=9	$\geq 1000/\mu\text{L}$ n=15
Proteini (g/L)	8,8 (7,8-14,1)	7,1 (5,4-11,2) ^{NS}
Albumin (g/L)	5,2 (3,4-12,4)	5,0 (3,4-8,1) ^{NS}
ALP (U/L)	46 (29-237)	27,5 (16-556) ^{NS}
AST (U/L)	111 (15-237)	59 (28-293) ^{NS}
CK (U/L)	8 (5-44)	8,0 (2-51) ^{NS}
Haptoglobin (g/L)	0,12 (0,11-0,20)	0,12 (0,03-0,24) ^{NS}
Ceruloplazmin (mg/dL)	4,1 (2-6)	4,4 (1-5) ^{NS}

NS – nije esignifikantno

Vrednosti biohemijskih parametara između ispitivanih grupa zglobova se nisu statistički značajno razlikovale (*Mann-Whitney U test*). U tabeli su prikazane medijane, minimalne i maksimalne vrednosti.

Jedine značajne, pozitivne, umerene korelacije utvrđene su između koncentracije proteina i aktivnosti ALP, koncentracije proteina i albumina i aktivnosti AST i CK. Nijedan od ispitivanih parametara nije bio u korelaciji sa ukupnim brojem ćelija (tabela 3).

Tabela 3. Korelacija biohemijskih parametara i ukupnog broja ćelija sinovijalne tečnosti

	Ukupan br. ćelija	Cp (g/dL)	Hp (g/L)	CK (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Albumin (g/L)
Proteini (g/L)	-0,34	-0,13	0,14	0,37	0,23	0,59**	0,66**
Albumin (g/L)	-0,10	-0,04	0,12	0,10	-0,07	0,11	
ALP (U/L)	-0,08	-0,06	0,31	0,33	0,38		
AST (U/L)	0,16	-0,32	0,09	0,64**			
CK (U/L)	0,19	-0,38	-0,37				
Hp (g/L)	-0,15	0,17					
Cp (mg/dL)	0,04						

**značajnost korelacije na nivou $p < 0,01$

ALP – alkalna fosfotaza; AST – aspartat aminotransferaza; CK – kreatin kinaza; Hp – haptoglobin; Cp – ceruloplazmin;

DISKUSIJA

U ovoj studiji su opisane karakteristike ST radnih konja. Kako u literature ne postoje posebne referentne vrednosti za radne konje, u analizi rezultata su korišćene referentne vrednosti koje se koriste za opštu populaciju konja (Stel i sar., 2008).

Fizičke karakteristike ST kod svih konja su odgovarale fiziološkim karakteristikama ST. Bleda prozirna viskozna ST ukazuje da nema jakog inflamatornog procesa koji bi bio povezan sa nakupljanjem leukocita i to pre svega neutrofilnih granulocita, niti da ima nekrotičnog tkiva koje bi izmenilo boju ST. Očuvan viskozitet tečnosti takođe ukazuje da nema povećane aktivnosti enzima koji bi razgradili hijaluronsku kiselinu i proteoglikane (Hardy i sar., 1998).

Ukupan broj ćelija je bio u okviru referentnih vrednosti u sva četiri zgloba samo kod relativno mladog konja starosti 3 godine. Sinovijalna tečnost konja u fiziološkim okolnostima sadrži mali broj ćelija ($< 1\ 000$ ćelija/ μL) (Stel i sar., 2008). Svi ostali konji u našoj studiji su imali preko 7 godina starosti, ali se zbog malog broja ispitanih životinja ne može se zaključiti da li ukupan broj ćelija u ST raste sa starošću životinje što bi mogao biti očekivani nalaz. Kako su tri konja koja su imala povećan broj ćelija na sva četiri ispitivana zgloba bili znatno stariji od konja koji nije imao promena ni na jednom zglobu, moglo bi se pretpostaviti da je i tip i intenzitet aktivnosti koje je životinja obavljala značajan faktor za nastanak oštećenja tkiva. Tako je dokazano do je kod radnih policijskih pasa, tip aktivnosti bio presudan za nastanak oštećenja na tibijalnoj hrskavici kolenog zgloba (Francuski i sar., 2014).

Ukupne koncentracije proteina i albumina nisu bile različite između uzoraka ST bez i sa povećanim brojem ćelija, iako su te dve vrednosti bile u pozi-

tivnoj korelaciji. Do povećanja ovih vrednosti iznad fizioloških okvira dolazi tokom oštećenja zglobova i razvoja inflamatornih procesa (Steel i sar., 2008). U eksperimentalnoj studiji u kojoj je artritis karpalnog zgloba konja bio izazvan upotrebom amfotericina-B, došlo je do povećanja ukupnog broja ćelija ($2\,138 \pm 1\,876$ ćelija/ μl) i koncentracije ukupnih proteina (72 ± 19 g/l) (Barrachina i sar., 2016). S obzirom da se u našoj studiji maksimalne vrednosti ukupnog broja ćelija u pojedinim uzorcima iznosile $2\,560$ ćelija/ μl , ali da drugi parametri nisu bili promenjeni, moglo bi se pretpostaviti da zapravo u tim zglobovima postoje degenerativne promene sa minimalnim stepenom inflamacije.

Sinovijalna tečnost sadrži niz enzima od kojih neki u nju dospevaju procesom ultrafiltracije iz krvne plazme, a neki se sintetišu i luče *in situ*. Tako njihova aktivnost u ST može zavistiti od aktivnosti u plazmi, ali i od lokalne aktivnosti ćelija u sinovijalnoj membrani (Balamurugan i sar., 2020). Na osnovu podatka da su vrednosti CK i AST u korelaciji može se pretpostaviti da obe vrednosti mogu da se povežu sa oštećenjem mišića koje je moglo da prethodi dolasku životinje na klanicu ili se moglo desiti tokom transporta životinja (Svete i sar., 2012).

Vrednosti za haptoglobin se nisu razlikovale između ispitivanih uzoraka ST, a u obe grupe su odgovarale prethodno određenim vrednostima za zglobove konja bez osteoartritisa (Barrachina i sar., 2016). U literaturi postoji malo informacija o međuzavisnosti koncentracije haptoglobina i stepena inflamatornih procesa na zglobnim strukturama kod konja, pasa i drugih vrsta životinja (Chiaradia i sar., 2012; Gobezie i sar., 2007). Međutim, Andreassen i sar., (2017) i Barrachina i sar., (2016) su u svojim studijama eksperimentalne indukcije artritisa ukazali na znatno povećanje vrednosti haptoglobina u zglobovima sa artritismom. Zbog svega navedenog se može zaključiti da radni konji u ovoj studiji nisu imali inflamatorne promene na zglobovima bez obzira na povećanje ukupnog broja ćelija u ST.

Vrednosti Cp dobijene u ovom radu su iznosile 1-7 mg/dl. U prethodnim studijama, koncentracija ceruloplazmina u ST konja se kretala u opsegu od 0-4 mg/dl (Basile i sar., 2013). Cp je protein plazme odgovoran za transport bakra. Nedostatak bakra je jedan od faktora rizika za nastanak osteohondralne fragmentacije kod konja (Hurtig i sar., 1996). Kako ostali biohemijski parametri nisu bili izmenjeni, pretpostavljamo da se koncentracija Cp u ST kod radnih konja može protumačiti kao odgovarajuća u smislu održavanja adekvatnog metabolizma bakra.

ZAKLJUČAK

Sinovijalna tečnost radnih konja ispitanih u ovoj studiji ne pokazuje da su konji imali inflamatorne promene u metakarpofalangealnim i metatarzofalangealnim zglobovima. Nalaz povećanog broja ćelija u ST upućuje da su neophodne histološke i druge specijalističke analize koje bi pokazale da li postoje promene hrskavice ili sinovijalne membrane koje bi se mogle povezati sa ovim nalazom.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Andreassen, S.M., Vinther, A.M., Nielsen, S.S., Andersen, P.H., Tniba A., Kristensen, A.T., Jacobsen, S. 2017. Changes in concentrations of haemostatic and inflammatory biomarkers in synovial fluid after intra-articular injection of lipopolysaccharide in horses. *BMC Veterinary Research*, 13:1-17. 2. Balamurugan, K., Shammi, M., Sivashankar, R., Subapriya, S. 2020. Physical and biochemical evaluation of synovial fluid in equine osteoarthritis. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 8:659-1661. 3. Bani Ismail, Z., Al-Rukibat, R. 2006. Synovial fluid cell counts and total protein concentration in clinically normal fetlock joints of young dromedarian camels. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 53:263-5. 4. Barrachina, L., Remacha, A.R., Soler, L., García, N., Romero, A., Vázquez, F.J., Rodellar C. 2016. Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 182:74-8. 5. Basile, R.C., Ferraz, G.C., Carvalho, M.P, Albernaz, R.M., Araújo, R.A., Fagliari, J.J. et al, 2013. Physiological concentrations of acute-phase proteins and immunoglobulins in equine synovial fluid. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33:201-4. 6. Chiaradia, E., Pepe, M., Tartaglia, M., Scoppetta, F., D'Ambrosio, C., Renzone G. et al, 2012. Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics. *Journal of Proteomics*, 75:4478-93. 7. Francuski, J.V., Radovanović, A., Andrić, N., Krstić, V., Bogdanović, D., Hadžić, V., Filipović M.K. 2014. Age-related changes in the articular cartilage of the stifle joint in non-working and working German Shepherd dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 151:363-74. 8. Gobezie, R., Kho, A., Krastins, B., Sarracino, D.A., Thornhill, T.S., Chase M., et al, 2007. High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis research and therapy*, 9:1-15. 9. Hardy, J., Bertone, A.L., Malesmud, C.J. 1998. Effect of synovial membrane infection in vitro on equine synoviocytes and chondrocytes. *American Journal of Veterinary Research*, 59:293-9. 10. Hurtig, M.B., 1996. Pool RR. Pathogenesis of equine osteochondrosis. In: McIlwraith CW, Trotter GW, editors. *Joint disease in the horse* Philadelphia, PA: WB Saunders Company. 11. Madison, J.B., Sommer M., Spencer P.A. 1991. Relations among synovial membrane histopathologic findings, synovial fluid cytologic findings, and bacterial culture results in horses with suspected infectious arthritis: 64 cases (1979-1987). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198:1655-61. 12. Milanović, Z., Beletić, A., Vekić, J., Zeljković, A., Andrić, N., Božović, A. I., Filipović, M.K. 2020. Evidence of acute phase reaction in asymptomatic dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 282: 109-40. 13. Steel, CM, 2008. Equine synovial fluid analysis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 24:437-54. 14. Svete, A.N., Čebulj-Kadunc, N., Frangež, R., Kruljc, P. 2012. Serum cortisol and haematological, biochemical and antioxidant enzyme variables in horse blood sampled in a slaughterhouse lairage, immediately before stunning and during exsanguination. *Animal*, 6:1300-6.

FAKTOR NEKROZE TUMORA ALFA (TNF- α) KOD KRAVA U TOPLOTNOM STRESU

Mira Majkić¹, Nada Plavša¹, Marko R. Cincović^{1}, Slavča Hristov²,
Branislava Belić³, Sandra Nikolić¹, Dražen Kovačević¹*

Kratak sadržaj

Faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) je proinflamatorni citokin, čija koncentracija može biti povećana u različitim inflamatornim stanjima. Osim toga i toplotni stres utiče na biološke osobine i povećava nivo cirkulišućih citokina. Kod krava koje su izložene toplotnom stresu dokazana je veća koncentracija cirkulišućih citokina i TNF- α . Toplotni stres može direktno narušiti permeabilitet creva i dovesti do povećane produkcije endotoksina, koji prodiru u cirkulaciju i stimulišu sintezu interleukina i TNF- α . Zbog svega navedenog, cilj našeg rada je bio da se utvrdi koncentracija TNF- α kod krava izloženih toplotnom stresu i dokaže njegova veza sa proizvodnjom mleka. Ispitivanja su izvršena 2017. godine. Ukupno trideset krava holštajn-frizijske rase, je bilo izloženo toplotnom stresu, a vrednosti THI (engl. temperature-humidity index), proizvodnja mleka i koncentracije metabolita su merene 0 dana (u termoneutralnom periodu), kao i 7 i 14 dana posle izlaganja. Prosečne dobijene dnevne vrednosti THI su bile 65 \pm 1.05 (dan 0), 75 \pm 1.1 (dan 7) i 77 \pm 1.4 (dan 14). Krave pod stresom imaju smanjenu proizvodnju mleka, koncentracije glukoze, neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) i odnosa glukoze u insulin (G:I), dok su vrednosti insulina, faktora nekroze tumora- α (TNF- α) i indeksa insulinske osetljivosti (RQUICKI) povišene. Indeks THI može objasniti 37 procenata varijacije u proizvodnji mleka. Objasnjen procenat varijacije je značajno veći nakon dodavanja metaboličkih parametara u modelu THI + glukoze (58 procenata) i THI + glukoze + TNF- α (65 procenata). Parcijalna korelaciona analiza je dokazala da je korelacija između proizvodnje mleka i THI značajno zavisna od glukoze. Faktor nekroze tumora, TNF- α je ispoljavao tendenciju regulacije pomenute korelaciju, a ostali metabolički parametri nisu imali signifikantan efekat na korelaciju između THI i proizvodnje mleka. Zaključeno je da varijacije u proizvodnji mleka tokom toplotnog stresa mogu biti bolje predviđene kada se THI koristi u kombinaciji sa glukozom i TNF- α kao metaboličkim

¹Dr sci. vet. med. Mira Majkić, docent; dr sci. vet. med. Nada Plavša, redovni profesor; dr sci. vet. med. Marko Cincović, vanredni profesor; dr vet. Sandra Nikolić, asistent; dr vet. Dražen Kovačević, doktorand, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Slavča Hristov, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun, R. Srbija

³Dr sci med. Branislava Belić, redovni član akademije, Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva

*e-mail autora za korespondenciju: mcincovic@gmail.com

prediktorima. *Inflamatorni odgovor i promene u metabolizmu ugljenih hidrata nalaze se u osnovi adaptacije proizvodnje mleka tokom toplotnog stresa kod krava.*

Ključne reči: *inflamacija, krave, proizvodnja mleka, toplotni stres*

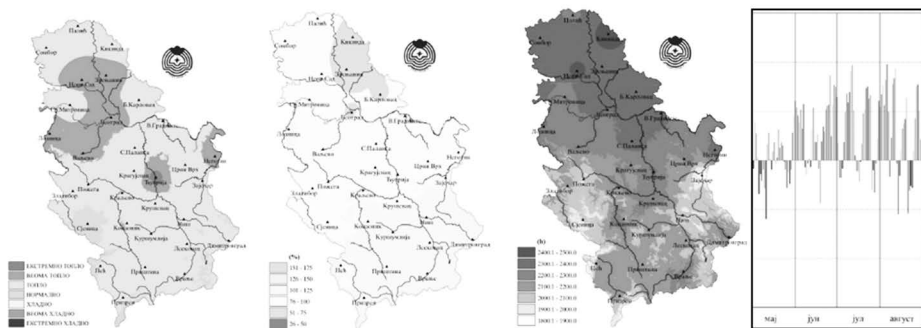
INFLAMATORNI ODGOVOR I FAKTOR NEKROZE TUMORA ALFA (TNF- α) KOD KRAVA U TOPLOTNOM STRESU

Desetogodišnji trend na teritoriji Srbije i posebno Vojvodine, ukazuje na to da raste broj dana u kojima se krave nalaze u toplotnom stresu barem u najtoplijem delu dana, a dokazan je i porast prosečne vrednosti indeksa temperature i vlažnosti vazduha, povećavajući ukupnu stresnu opterećenost krava (Cincović i sar., 2017; Majkić i sar., 2020). Kod preživara, toplotni stres može dovesti do ruminalne acidoze, a kao posledica se javljaju promene u morfologiji intestinuma (slepljivanje i skraćenje epitelijalnih vila) čime nastaju poremećaji u digestiji i resorpciji hranljivih materija. Tokom toplotnog stresa, dolazi do preusmeravanja protoka krvi. U koži dolazi do vazodilatacije, sa posledičnim povećanim protokom krvi, da bi se ubrzali procesi rashlađivanja (u procese rashlađivanja uključena su pluća i srce koji pojačano rade), uz istovremenu vazokonstrikciju i smanjeni pritisak u krvnim sudovima, koji vaskularizuju digestivni trakt, te tako i u creva stiže manja količina krvi, što se negativno odražava na crevni permeabilitet. Na toplotni stres su posebno osetljivi eritrociti kod kojih, kao posledica nedostatka kiseonika, dolazi do hipoksije i oksidativnog stresa. Kao posledica promena na crevnom epitelu dolazi do inflamacije, povećanja permeabiliteta, nakupljanja bakterija i njihovih toksina, a u portalnu i sistemsku cirkulaciju dolazi veća količina lipopolisaharida (LPS). Oni su potentni, imunogeni signali inflamatornog odgovora i mogu dovesti organizam u stanje endotoksemije (Fernández, 2014). Tokom endotoksemije, LPS interaguju sa *toll-like receptorima* 4 (TLR-4), koji se nalaze na površini imunskih ćelija, čime se aktivira tzv. NF κ B put, koji rezultira sintezom i sekrecijom citokina. Endotoksemija takođe, može dovesti i do steatohepatitisa, na koji su posebno osetljive krave u peripartalnom periodu (Sanz-Fernandez i sar., 2015). Tokom toplotnog stresa je povećana sinteza proteina akutne faze, serum amiloida A, haptoglobina, LBP (engl. *Lipopolysaccharide Binding Protein*), proteina akutne faze, koji igra ključnu ulogu u modulaciji inflamatornog odgovora uzrokovnog LPS gram-negativnih bakterija. LPS gram-negativnih bakterija umanjuje sposobnost glukoneogeneze, umanjuje sposobnost oslobađanja VLDL, smanjuje sposobnost sekrecije anaboličkih hormona, stimuliše produkciju TNF α i IL-1, koji posledično smanjuju apetit, dovodeći do povišene temperature letargije i pada produktivnosti. Koncentracija proinflamatornog citokina, TNF- α , može biti povećana kod različitih inflamatornih stanja. On se sintetisuje kao transmembranski protein tipa II i formira stabilni tzv. homo-trimerni molekul (mTNF- α) sposoban za biološku aktivnost. Može se formirati i proteolitičkim cepanjem preko TNF- α konvertujućeg enzima u monomerni protein, koji je biološki aktivan kao rastvorljivi homo-trimerni molekul. Takođe, TNF- α indukuje različite ćelijske odgovore kroz interakciju sa dva transmembranska receptora (trans-

membranski receptor tip I - TNFR1 i transmembranski receptor tip II - TNFR2). Ovaj prvi, TNFR1, se uglavnom eksprimira u različitim tipovima ćelija i tkiva, dok se TNFR2 pretežno eksprimira u imunskim i endotelnim ćelijama. Aktivacija TNFR1 može biti indukovana, bilo preko tzv sTNF- α (solubilni TNF- α) ili preko mTNF- α (transmembranski TNF- α). Aktivacija TNFR2 je uglavnom inicirana preko mTNF- α . Uloga TNF- α je da vrši pre-apoptotičku funkciju. Međutim, novija istraživanja dokazuju da TNF- α indukuje ćelijsku proliferaciju i preživljavanje u različitim fiziološki izmenjenim stanjima (Dong i sar., 2015). Toplotni stres utiče na biološke osobine i povećava nivo cirkulišućih citokina. Chen i sar. (2018) su utvrdili da je kod krava, koje su izložene toplotnom stresu veća koncentracija cirkulišućih citokina i TNF- α . Tokom ekspozicije visokim ambijentalnim temperaturama, dolazi i do oksidativnog stresa. Molekuli, koji se oslobađaju tokom oksidativnog stresa mogu narušiti permeabilitet creva i dovesti do povećane produkcije endotoksina, koji prodiru u cirkulaciju i stimulišu sintezu interleukina i TNF- α (Bouchama i Kochel, 2002).

FAKTOR NEKROZE TUMORA ALFA (TNF- α) I NJEGOVA ULOGA U PREDIKCIJI PROIZVODNJE MLEKA KOD KRAVA U TOPLOTNOM STRESU

Tokom ogleadne godine vršeno je merenje THI indeksa dobijenih od RHMZS i izmerenih na farmama. Rezultati srednje temperature i apsolutnih maksimuma kao i THI indeksa prikazani su u tabeli 1. U 2017. godini, u većem delu zemlje zabeleženo je od 17 do 25 tropskih dana više od prosečnog broja za referentni period 1981-2010. U većem delu Srbije je 2017. godina bila normalna i sušna. Veoma sušno je bila u Zrenjaninu, Kikindi i Banatskom Karlovcu. Tokom marta i juna zabeležena su četiri toplotna talasa. Tokom letnjih meseci maksimalne temperature su prelazile preko 35 °C, dok je apsolutno maksimalna izmerena temperatura u mernoj stanici Novi Sad iznosila 40 °C, uz dnevne amplitude temperatura od 12 do nešto iznad 20 °C. Na kartogramima RHMZS, dati su klimatološki



Slika 1. Raspodela srednje godišnje temperature, raspodela količine padavina i osunčanost u 2017. godini sa podacima o odstupanju temperature (RHMZS) i odstupanje temperature u periodu maj-avgust.

podaci za 2017. godinu. Pozitivna odstupanja temperature u periodu jun-avgust su registrovana u 65 od 90 dana (slika 1).

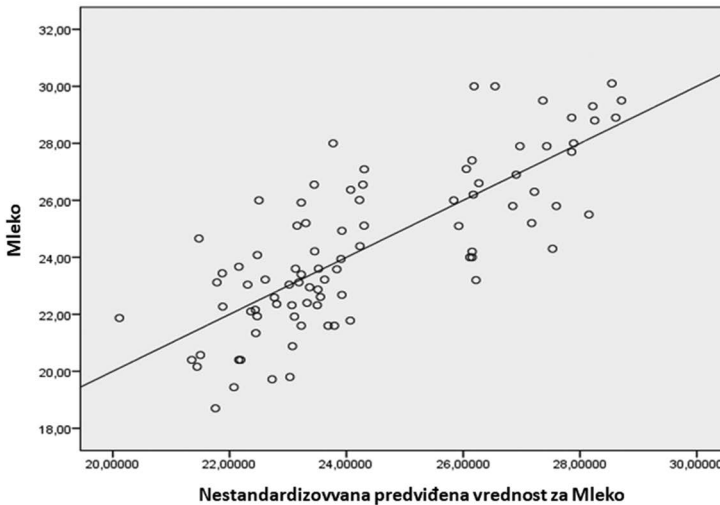
Ukupno trideset krava holštajn-frizijske rase je bilo izloženo toplotnom stresu, a vrednosti THI, proizvodnja mleka i koncentracije metabolita su merene 0 dana (u termoneutralnom periodu), kao 7 i 14 dana posle izlaganja. Prosečne dobijene dnevne vrednosti THI bile su $65 \pm 1,05$ (dan 0), $75 \pm 1,1$ (dan 7) i $77 \pm 1,4$ (dan 14). Dokazano je da krave pod stresom imaju smanjenu proizvodnju mleka, koncentraciju glukoze, neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA) i odnosa glukoze u insulin ($G : I$), dok su vrednosti insulina, faktora nekroze tumora- α (TNF- α) i indeksa insulinske osetljivosti (RQUICKI) povišene. Indeks THI može objasniti 37 procenata varijacija u proizvodnji mleka. Navedeni procenat varijacije je značajno veći nakon dodavanja metaboličkih parametara u modelu THI + glukoze (58 procenata) i THI + glukoze + TNF- α (65 procenata) i neznatno više nakon dodavanja drugih parametara metabolita. Parcijalna korelaciona analiza ukazala je da je korelacija između proizvodnje mleka i THI značajno zavisna od glukoze. Citokin TNF- α je ispoljavao tendenciju da reguliše pomenutu korelaciju, a ostali metabolički parametri nisu imali signifikantan efekat na korelaciju između THI i proizvodnje mleka. Zaključeno je da varijacije u proizvodnji mleka tokom toplotnog stresa mogu biti bolje predviđene kada se THI koristi u kombinaciji sa glukozom i TNF- α kao metaboličkim prediktorima. Rezultati su prikazani u tabeli 1 i na slici 2.

Glavni razlog za pad mlečnosti u toplotnom stresu je metabolička adaptacija organizma, a hrana se, kao uzrok, može dovesti u vezu onda kada je njen unos smanjen za trećinu (Hristov i sar., 2007). Prema našim rezultatima, glukoza predstavlja najvažniji faktor koji utiče na pad mlečnosti krava, koje su izložene toplotnom stresu (Belić i sar., 2011; Majkić i sar., 2017). Kao što je već ranije napomenuto, trend glikemije u toplotnom stresu je negativan. Ovakav nalaz ukazuje da se glukoza tokom toplotnog stresa koristi kao glavni put dobijanja energije, a takođe postoji i povećana osetljivost na insulin. Kao posledica povećane potrošnje glukoze u energetske svrhe, manja koncentracija stiže i do mlečne žlezde. Sa druge strane, proces proizvodnje mleka zahteva oslobađanje velike količine toplote, pa se organizam kompenzatorno brani tako što smanjuje mlečnost. Tokom trajanja toplotnog stresa u mleku je snižena koncentracija laktoze, jer je prekursor za njenu sintezu glukoza krvi. Ranije je navedeno da je koncentracija TNF- α i ostalih proinflamatornih citokina povećana tokom trajanja toplotnog stresa, a razlog za to može biti stimulacija od strane LPS. Citokin TNF- α ima inhibitorni efekat na aktivnost LPL (lipoprotein lipaza) ključnog enzima, koji učestvuje u preuzimanju sirovina za proizvodnju masti mlečne žlezde, koje se nalaze u cirkulaciji (glicerola i NEFA u formi lipoproteina). Lipopolisaharid indukuje medijatore, koji inhibiraju aktivnost enzima, koji učestvuju u *de novo* sintezi masnih kiselina (Zebeli i Metzler-Zebeli, 2012). Isti autori su dokazali linearno smanjenje proizvodnje mleka sa povećanjem koncentracije LPS u cirkulaciji. Citokin TNF- α reguliše i metabolizam ugljenih hidrata tako što suprimira proces glukoneogeneze u jetri. Usled aktivnosti TNF- α , povećava se periferna rezistencija ćelija na insulin, čime

se blokira ulazak glukoze u ćelije i njen dalji metabolizam. U takvom stanju, energija koja se nalazi u formi glukoze ostaje „zarobljena”. U krvi se može registrovati povećana koncentracija glukoze što predstavlja stimulus za ćelije pankreasa, koje pojačano luče insulin, ali zbog periferne neosetljivosti ćelija, glukoza se ne može iskoristiti, te tako organizam ulazi u *circulus viciosus*. U mlečnu žlezdu ne dolaze sirovine za sintezu mleka pa posledično reaguje smanjenom mlečnošću.

Tabela 1. Predviđanja proizvodnje mleka pomoću modela koji uključuje THI, glukozu i TNF- α

Nezavisne varijable	Neujednačeni Koeficijenti		Značajnost varijable- p vrednost	R ² % objašnjene varijanse	Značajnost modela- p vrednost
	B	Standardna varijacija			
THI	-0.09	0.08	0.27	0.65	<0.001
Glukoza	2.29	0.64	0.001*		
TNF- α	-0.66	0.29	0.03*		



Slika 2. Regresiona linija između posmatrane i predviđene proizvodnje mleka po modelu proizvodnje mleka = THI + glukoza + TNF- α

ZAKLJUČAK

Varijacije u proizvodnji mleka tokom toplotnog stresa mogu biti bolje predviđene kada se THI koristi u kombinaciji sa glukozom i TNF- α kao metaboličkim prediktorima. Inflamatorni odgovor krava i promena u metabolizmu ugljenih hidrata nalaze se u osnovi adaptacije proizvodnje mleka tokom toplotnog stresa kod krava.

LITERATURA

1. Belić B., Cincović M.R., Popović-Vranješ A., Pejanović R., Krajinović M. 2011. Metaboličke promjene i iskorištavanje metabolita u proizvodnji mlijeka kod krava u toplinskom stresu. *Mljekarstvo*, 61 (4):309-18.
2. Bouchama A., Knochel J.P. 2002. Heat stroke. *New England Journal of Medicine*, 346 (25): 1978-88.
3. Chen S., Wang J., Peng D., Li G., Chen J., Gu X. 2018. Exposure to heat-stress environment affects the physiology, circulation levels of cytokines, and microbiome in dairy cows. *Scientific reports*, 8 (1): 14606.
4. Cincović M.R., Majkić M., Belić B., Plavša N., Lakić I., Radinović, M. 2017. Thermal comfort of cows and temperature humidity index in period of 2005-2016 in Vojvodina region (Serbia). *Acta Agriculturae Serbica*, 22 (44): 133-45.
5. Dong Y., Dekens D., De Deyn P., Naudé P., Eisel U. 2015. Targeting of tumor necrosis factor alpha receptors as a therapeutic strategy for neurodegenerative disorders. *Antibodies*, 4 (4): 369-408.
6. Fernández M.V.S. 2014. The effects of heat stress on energetic metabolism and insulin homeostasis (Doctoral dissertation, Iowa State University).
7. Hristov S., Stanković B., Joksimović-Todorović M., Bojkovski J., Davidović V. 2007. Uticaj toplotnog stresa na proizvodnju mlečnih krava, *Zbornik naučnih radova*, 13, 3-4, 47 – 54.
8. Majkić M., Cincović M.R., Belić B., Plavša N., Lakić I., Radinović M. 2017. Relationship between milk production and metabolic adaptation in dairy cows during heat stress. *Acta Agriculturae Serbica*, 22 (44): 123-31.
9. Majkić M., Plavša N., Cincović M., Belić B., Lakić I. 2020. Temperature humidity index (THI) in seven measuring stations in Vojvodina region and evaluation of heat stress in cow. *Veterinarski pregled/Veterinary review* 1 (1): 83-9.
10. RHMZS-Meteorološki godišnjak za 2017. godinu – klimatološki podaci.
11. Sanz-Fernandez M.V., Stoakes S.K., Johnson J.S., Abuajamieh M., Seibert J.T., Pearce S.C., Baumgard L.H. 2015. Heat Stress: What's the Gut Got To Do With It? https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/39210/3Baumgard_manu.pdf?sequence=2
12. Zebeli Q., Metzler-Zebeli B.U. 2012. Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. *Research in Veterinary Science*, 93(3): 1099-108.

RAZLIKE U NIVOU MATRIKS METALOPROTEINAZA 2 I 9 U SERUMU PASA SA BLAGOM I UMERENOM FORMOM LAJŠMANIOZE

Kristina Spariosu¹, Milutin Antić², Milena Radaković¹, Anđelo Beletić^{3,4}, Milica Kovačević Filipović¹

Kratak sadržaj

Lajšmanioza je vektorski-prenosivo oboljenje prouzrokovano protozoama roda Leishmania, koje prenose peščane mušice roda Phlebotomus. Lajšmanioza pasa ima karakter zoonoze i psi su prirodni rezervoari infekcije za ljude. U endemičnom području Mediterana, oko 2,5 miliona pasa godišnje dođe u kontakt sa uzročnikom. Ovo oboljenje može proteći asimptomatski ili u zavisnosti od kliničkih znakova i njihovog intenziteta, kao blaga, umerena, teška ili veoma teška lajšmanioza. U blagoj formi, dolazi do popularnog dermatitisa i izolovane limfadenomegalije. Kod prijemčivih jedinki, lajšmanioza se najčešće manifestuje u umerenoj formi, kada se pojavljuju ekfolijativni dermatitis i ulceracije, generalizovana limfadenomegalija, praćeni groznicom i gubitkom apetita i telesne mase. Teška i veoma teška forma bolesti, pored navedenih, intenzivnije manifestovanih kliničkih znakova, uključuju i plućnu tromboemboliju i/ili nefrotski sindrom i terminalnu bubrežnu bolest (Solano-Gallego i sar., 2017). Ukoliko se pacijentu ne pruži adekvatna i pravovremena terapija, lajšmanioza može rezultirati smrtnim ishodom. Nakon kontakta sa zaraženim vektorom, neutrofilni granulociti i monociti domaćina fagocituju infektivne forme uzročnika – promastigote. Međutim, ovaj mikro-parazit je razvio mehanizme kojima zaobilazi i/ili inhibira aktivnost fagocita. Inficirane ćelije proliferišu i diseminiraju intracelularne forme uzročnika – amastigote, do limfnih čvorova, jetre, slezine, kostne srži, gastrointestinalnih organa i kože. Prema pojednim autorima, kod asimptomatičnih i pasa sa blagom formom bolesti, dokazana je hiperplazija/hipertrofija kore i srži limfnih čvorova. Kod pasa sa umerenom i teškom formom lajšmanioze, utvrđena je atrofija kortikalnih folikula limfnih čvorova (Moreira i sar., 2010). Lajšmanioza u osnovi ima progresivno oštećenje tkiva. Matriks metaloproteinaze (MMP) su tkivne endopeptidaze, koje se u ćelijama nalaze u formi zimogena (proMMP), a prelaskom u aktivnu formu, učestvuju u zapaljenskom i imunskom

¹Dr sci. vet. med. Kristina Spariosu, naučni saradnik; dr sci vet. med. Milena Radaković, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Milica Kovačević Filipović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr vet. Milutin Antić, DOO „Komunalne djelatnosti“, Bar, R. Crna Gora

³Dr sci. med. Anđelo Beletić, naučni saradnik, Univerzitetski klinički centar Srbije, Beograd, R. Srbija

⁴Dr sci. med. Anđelo Beletić, naučni saradnik, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Klinika za interne bolesti, Laboratorija za proteomiku, Zagreb, R. Hrvatska

*e-mail autora za korespondenciju: eevermcteen@gmail.com

odgovoru i remodelovanju tkiva. Matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2) i 9 (MMP-9) razgrađuju kolagen tipa IV i tokom inflamacije povećavaju permeabilnost krvnih sudova, odnosno transmigraciju leukocita. Tom prilikom, njihov nivo u krvnom serumu raste, pri čemu MMP-2 uglavnom ima anti-, a MMP-9 proinflamatorno dejstvo. Glavni izvor MMP-2 su endotelne ćelije, dok MMP-9 dominantno potiče iz leukocita. Dokazano je da kod pasa sa klinički-manifestnom formom lajšmanioze dolazi do porasta proMMP-2, proMMP-9 i MMP-9 u serumu (Melo i sar., 2011).

Cilj ove studije je bio da se utvrdi da li postoji razlika između aktivnosti (pro) MMP-2 i 9 u serumu pasa sa blagom i umerenom formom bolesti, bez terapije ili sa njom i da li postoji korelacija između nivoa MMP i broja neutrofilnih granulocita, monocita i limfocita u okviru analiziranih grupa. U studiju je bilo uključeno 36 pasa prirodno inficiranih protozooom *Leishmania* spp. u endemičnom području opštine Bar, Crna Gora. Pacijentima je infekcija bila potvrđena komercijalnim ELISA testom, koji detektuje nivo IgG protiv *Leishmania* spp. (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Germany). Trinaest pasa je imalo blagu formu bolesti, 14 umerenu i nije primenjena terapija, dok je devet pasa imalo umerenu formu i tokom mesec dana su lečeni miltefosinom (2 mg/kg), alopurinolom (10 mg/kg) i B vitaminom (jedna tableta komercijalnog suplementa, Anima Strath, Bio-Strath, Switzerland). Svim pacijentima su određene vrednosti hematoloških i biohemijskih parametara. Nivo zimogenih i aktivnih MMP-2 i 9 u serumu je evaluiran metodom zimografije na gelu poliakrilamida i izražen kao relativna vrednost u odnosu na jediničnu vrednost kontrolnog seruma (Fetal Calf Serum, Gibco, United States).

Razlike između nivoa MMP po grupama su ispitane Kruskal-Wallis testom, a povezanost testiranih parametara je utvrđena preko Spearman-ovog koeficijenta korelacija (ρ) (MedCalc® 16.2.1.).

Psi sa blagom formom lajšmanioze su imali veći nivo proMMP-2 u odnosu na grupu pasa sa umerenom formom bez terapije ($P=0,038$) i najveću aktivnost MMP-9 ($P=0,001$). U grupi sa blagom formom lajšmanioze je dokazana negativna korelacija između nivoa proMMP-9 i broja limfocita ($\rho=-0,664$; $P=0,013$). U grupi pasa sa umerenom formom bolesti bez terapije, dokazana je jaka negativna korelacija između aktivnosti MMP-9 i broja leukocita ($\rho=-0,732$; $P=0,003$), kao i broja neutrofilnih granulocita ($\rho=-0,697$; $P=0,006$). Kod pasa koji su dobijali terapiju nije bilo značajnih korelacija između analiziranih varijabli. Na osnovu dobijenih rezultata se može pretpostaviti da je uznapredovala infekcija protozoama roda *Leishmania* povezana sa nižom aktivnošću MMP, odnosno smanjenom funkcijom fagocitnih ćelija. Aktivnost MMP-9 je bila najintenzivnija u serumu pasa sa blagom formom bolesti, što potvrđuje da je inflamatorni i imunski odgovor bio kompromitovan kod pacijenata sa težom formom bolesti. Inverzna korelacija između nivoa proMMP-9 i broja limfocita u blagoj formi bolesti može ukazati na njeno intenzivnije „trošenje“, odnosno pretvaranje u MMP-9, usled aktivacije limfocita i/ili njihove proliferacije u limfnim čvorovima. Odsustvo značajnih razlika u grupi pasa koja je dobijala terapiju upućuje da jednomesečna terapija ne utiče na promenu aktivnosti ovih proteaza, odnosno da primenjeni terapeutici ne intenziviraju razgradnju ekstracelularnog matriksa i prelazak zimogene u aktivnu formu MMP.

Ključne reči: *Leishmania* spp., leukociti, matriks metaloproteinaze, pas

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Melo GD., Marangoni NR., Marcondes M., Lima VMF., Machado GF. 2011. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniosis: A preliminary report. *The Veterinary Journal*, 188 (2): 243-245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.017>. 2. Moreira PRR., Vieira LM., de Andrade MMC., de Barros Bandarra M., Machado GF, Munari DP, et al. 2010. Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, 107 (3): 605-613. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1902-2>. 3. Solano-Gallego L., Cardoso L., Pennisi MG., Petersen C., Bourdeau P, Oliva G., et al. 2017. Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infatum* vaccines. *Trends in Parasitology*, 33 (9): 706-717. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.06.004>

ANALIZA KRVNE SLIKE MAGARACA NA VELIKIM I MALIM FARMAMA – IMPLIKACIJE U VEZI SA EOZINOFILIJOM

Marija Kovandžić^{1}, Filip Janjić², Kristina Spariosu¹, Milena Radaković¹, Jelena Francuski Andrić¹, Anđelo Beletić^{3,4}, Milica Kovačević Filipović¹*

Kratak sadržaj

Balkanski magarac je autohtona rasa važna za očuvanje genetičkih resursa Republike Srbije. Drži se na farmama, u okviru porodičnih gazdinstava. Farme na kojima se uzgaja manje od 20 magaraca, mogu se okarakterisati kao male, a one sa preko 50 magaraca kao velike. Poslednjih godina je interesovanje za uzgoj magaraca u porastu, prevashodno zbog upotrebe magarećeg mleka u ishrani ljudi, kao i u kozmetičkoj industriji. Za kvalitetne i higijenski ispravne proizvode, u koje se može svrstati sirovo i prerađeno mleko magarica preduslov su zdrave životinje. Infestacija parazitima je čest problem koji nekada može imati značajan negativan uticaj na zdravstveno i reproduktivno stanje magaraca.

Anketom koju smo sproveli na gazdinstvima koja gaje magarce, u proleće 2022. godine, dobili smo informaciju da se tretman protiv crevnih parazita sprovodi jednom godišnje, najčešće u jesen. Intenzitet i vrsta parazitskih infekcija kod magaraca mogu zavistiti od više faktora, kao što su način uzgoja i menadžment farme. Za evaluaciju zdravstvenog stanja životinje neophodan je uvid u kompletnu krvnu sliku. Cilj ove studije je bio da se analizom kompletne krvne slike utvrdi da li postoje razlike koje bi ukazivale da uslovi držanja životinja na velikim farmama pogoduju nastanku eozinofilije, koja bi dalje ukazivala na značajniju infestaciju parazitima, u odnosu na životinje na malim farmama. Sa četiri farme, dve velike i dve male, u studiju je, slučajnim izborom, bilo uključeno po pet ženki i po jedan mužjak, ukupno 24 životinje. Svi magarci su bili zadovoljavajuće i ujednačene telesne kondicije. Jednu grupu je činilo 12 magaraca sa dve velike farme, a drugu 12 magaraca sa dve male farme. Krvna slika je određena na petopartitnom hematološkom analizatoru (Mindray BC-5000 Vet, China). Za svaki uzo-

¹Dr vet. Marija Kovandžić, istraživač-pripravnik; dr sci. vet. med. Kristina Spariosu, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Milena Radaković, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Jelena Francuski Andrić, docent; dr sci. vet. med. Milica Kovačević Filipović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Filip Janjić, naučni saradnik, Inovacioni Centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, Beograd, R. Srbija

³Dr sci. med. Anđelo Beletić, naučni saradnik, Univerzitetski klinički centar Srbije, Beograd, R. Srbija

⁴Dr sci. med. Anđelo Beletić, naučni saradnik, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Klinika za interne bolesti, Laboratorija za proteomiku, Zagreb, R. Hrvatska

*e-mail autora za korespondenciju: marija_kov@yahoo.com

rak je izrađen krvni razmaz, obojen Romanovski tipom bojenja i određena je diferencijalna leukocitarna formula.

Za obradu podataka su korišćeni Mann-Whitney U test i logistička regresija (MedCalc® 16.2.1.).

Magarci sa velikih farmi su imali značajno veći broj eozinofilnih granulocita ($P=0,011$) i 25 puta veću šansu za pojavu eozinofilije u odnosu na magarce na malim farmama. Veličina farme nije uticala na ukupan broj leukocita, neutrofilnih granulocita, trombocita i hematokritsku vrednost. Rezultati dobijeni u ovoj studiji dokazuju da uslovi držanja u kojima se veći broj životinja nalazi u zajedničkom prostoru ne utiče na one aspekte zdravstvenog stanja magaraca koji se mogu odraziti na krvnu sliku, iako verovatno utiče na veću infestaciju parazitima. Pretpostavljamo da su magarci najozbiljnije infestirani crevnim parazitima koji mogu dovesti do eozinofilije, ali se ne može isključiti ni prisustvo ektoparazita. Takođe, može se pretpostaviti da farme na kojima se drži veći broj magaraca pogoduju većoj infestaciji crevnim i drugim parazitima, s obzirom da veći broj jedinki na manjem prostoru olakšava akumulaciju infektivnih formi parazita. Osim toga, veći broj jedinki na farmi zahteva redovno održavanje higijene objekata, a samim tim iziskuje i više vremena i materijalnih troškova, što sve u slučaju lošeg menadžmenta farme nije izvodljivo. Zbog toga bi vlasnike farmi trebalo obučiti na koji način da primenjuju antiparazitike i na koji način da sprovode higijenu objekata i ispašu, da bi teren na kome borave i na kome se napasaju magarci, imao što manji broj infektivnih formi parazita.

Ključne reči: eozinofilni granulociti, faktori rizika, hematološki parametri, magarci

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2022-14/200287 i ugovor broj 451-03-68/2022-14/200143).

RETROSPEKTIVNA ANALIZA PREVALENCE ANEMIJA I FAKTORI RIZIKA KOD PASA I MAČAKA U TOKU 2021–2022. GODINE NA KLINICI ZA MALE ŽIVOTINJE FAKULTETA VETERINARSKJE MEDICINE UNIVERZITETA U BEOGRADU

Filip Janjić¹, Kristina Spariosu², Sara Kitanović², Milena Radaković², Jelena Francuski Andrić², Anđelo Beletić^{3,4}, Milica Kovačević Filipović²

Kratak sadržaj

Anemija je znak bolesti koje nastaju dejstvom različitih etioloških faktora. Definiše se na osnovu vrednosti za hematokrit (HCT) koji predstavlja odnos zapremine eritrocita i zapremine pune krvi. Prema World Small Animal Veterinary Association (Harold, 2005) anemičnim se smatraju psi kod kojih je HCT ispod 37 procenata i mačke kod kojih je ta granica 26. Jedan od faktora koji imaju uticaj na težinu kliničke slike, terapiju i prognozu je težina anemije, a ona se određuje na osnovu vrednosti za HCT. Za uspešnu dijagnostiku je bitan i broj retikulocita koji ukazuje da li je anemija regenerativna ili neregenerativna. Nekada anemija u akutnom toku bolesti može imati neregenerativni karakter, ali po aktivaciji kostne srži i ubrzanoj proliferaciji eritroidne loze, u perifernoj krvi se pojavljuju retikulociti i anemija postaje regenerativna (Grimes and Fry, 2015). Dosadašnja istraživanja su dokazala da se kod određenih vektorski prenosivih oboljenja pojedini hematološki parametri razlikuju u zavisnosti od sezone oboljenja, kao i da su na neke parametre uticali: pol, rasa i starost životinje (Janjić, 2021). Do sada nije bilo istraživanja koja bi ispitala međusobnu povezanost regenerativno/neregenerativnog karaktera anemije, njenu težinu, godišnji period oboljenja, rasu, starost i pol životinje. Cilj ovog rada je bio da se utvrdi da li se učestalost anemija kod pasa i mačaka, težina anemije i njen regenerativni/neregenerativni karakter menjaju u zavisnosti od godišnjeg doba i da se ispita da li su rasa, starost i pol faktori rizika za njen nastanak, karakter ili težinu.

Podaci za ovo istraživanje prikupljeni su u Laboratoriji za kliničku hematologiju i biohemiju, Klinike za male životinje, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, gde su na sedmopartitnom hematološkom analizatoru ProCyte Dx (IDEXX

¹Dr sci. vet. med. Filip Janjić, naučni saradnik, Inovacioni Centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Kristina Spariosu, naučni saradnik; dr vet. Sara Kitanović, stažista-pripravnik; dr vet. Milena Radaković, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Jelena Francuski Andrić, docent; dr sci. vet. med. Milica Kovačević Filipović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

³Dr sci. med. Anđelo Beletić, naučni saradnik, Univerzitetski klinički centar Srbije, Beograd, R. Srbija

⁴Dr sci. med. Anđelo Beletić, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Klinika za interne bolesti, Laboratorija za proteomiku, Zagreb, R. Hrvatska

*e-mail autora za korespondenciju: filip89janjic@gmail.com

Laboratories, Inc., USA) u periodu od februara 2021. do aprila 2022, analizirana 1102 uzorka krvi pasa i 211 uzoraka krvi mačaka.

Razlika u distribuciji kategorijskih varijabli ispitana je hi-kvadrat testom sa Boniferoni korekcijom, dok su kontinuirane varijable analizirane Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U testom. Za identifikovanje nezavisno povezanih parametara korišćena je logistička regresija. Za statističke analize korišćenjen je softver MedCalc® verzija 16.2.1.

Hematološki rezultati su ukazali da je prevalenca anemije kod obolelih pasa u ispitivanom periodu iznosila 18,3 procenata (202/1102), a statističkim analizom je dokazano da je kod pasa obolelih tokom leta bila značajno veća ($P = 0,001$) od one kod pasa obolelih tokom zime i jeseni, dok se učestalost anemije tokom proleća nije značajno razlikovala od one u drugim godišnjim dobima. Nasuprot tome, tokom proleća, anemični psi su imali 2,9 puta veću verovatnoću ($P = 0,008$) za pojavu težeg oblika anemije od anemičnih pasa u drugim periodima godine. Regenerativni/neregnerativni karakter anemije nije se mogao povezati sa godišnjim dobima. Takođe, rasa, starost i pol nisu predstavljali faktor rizika za pojavu anemije u različitim godišnjim dobima, niti su imali uticaj na njen karakter i težinu. Zanimljivo je da je u periodu od 1. januara 2022 do 30. aprila 2022 meseci pregledano 73 psa rase američki staford terijer i da je kod 14 analizirana krvna slika. Tri psa su imala neregnerativnu anemiju koja bi mogla biti povezana sa infekcijom sa *B. gibsoni*. Kod mačaka, prevalenca anemije je bila 19,9 procenata (42/211). Učestalost, težina i regenerativni/neregnerativni karakter anemije su bili podjednaki u različitim godišnjim dobima. Rasa, starost i pol nisu imali uticaj na karakter anemije, njenu težinu, niti su bili povezani sa pojavom anemije u različitim periodima godine. Rezultati dobijeni u ovoj studiji dokazuju da je veća prevalenca anemije kod pasa vezana za toplu godišnja doba koja pogoduju širenju različitih infektivnih agenasa od kojih pojedini mogu biti uzročnici anemije. Takođe je dokazano je da će anemija pasa biti teža tokom proleća, a s obzirom na to da su tada krpelji, koji mogu biti vektori mnogih oboljenja pasa, najaktivniji, opravdano je sprovesti dodatno istraživanje i ispitati njihovu povezanost.

Ključne reči: anemija, faktori rizika, godišnja doba, mačka, pas

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-68/2022-14/200287).

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

LITERATURA

1. Grimes, C.N., Fry, M.M., 2015. Nonregenerative anemia: mechanisms of decreased or ineffective erythropoiesis. *Veterinary pathology* 52, 298-311. 2. Harold T., 2005. Basic Approach to Anemia Diagnosis. World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, 2005. 3. Janjić F., 2021. Odgovor akutne faze kod pasa obolelih od babezioze tokom različitih godišnjih doba i veza pojave akutnog oboljenja sa meteorološkim parametrima. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. UDK: 619:576.89:599.735.1

INTER I INTRA-INDIVIDUALNE REFERENTNE VREDNOSTI KRVNIH PARAMETARA PASA I NJIHOVA DIJAGNOSTIČKA UPOTREBA

*Sandra Nikolić¹, Branislava Belić², Marko R. Cincović¹,
Nikolina Novakov¹, Mira Majkić¹*

Kratak sadržaj

Referentni intervali laboratorijskih parametara mogu se odrediti na osnovu populacije zdravih jedinki (inter-individualne vrednosti) ili za svaku jedinku posebno (intra-individualne referentne vrednosti). Inter-individualni referentni intervali uključuju srednjih 95 procenata podataka i isključuju 5 procenata rezultata klinički zdravih životinja (2,5 procenta na gornjem i 2,5 procenta na donjem kraju). Poređenjem dobijenih rezultata sa referentnim vrednostima, utvrđujemo da li je nalaz normalan ili patološki. Primena inter-individualnih referentnih vrednosti ima smisla ukoliko je varijacija unutar pojedinačne životinje veća od varijacije između životinja. Međutim, ukoliko je intra-individualno variranje manje od inter-individualnog, to znači da će kod jedinke doći do značajnog odstupanja vrednosti, ali ono neće biti toliko da "probije" inter-individualne referentne opsege sa kojima poredimo. To znači da će za nas ostati skrivene fine promene u kliničko-patološkim laboratorijskim nalazima koji ukazuju da problem u organizmu već postoji i to samo zato što variranje nije bilo dovoljno veliko da pređe referentnu vrednost zasnovanu na populaciji. Zbog toga je najbolji način da se odredi personalna referentna vrednost zasnovana na intra-individualnoj varijabilnosti parametara. Intra-individualna varijabilnost (CVi) se izračunava tako što se odredi koeficijent varijacije za svaku životinju i svaki parametar u određenom broju uzastopnih merenja. Potrebno je znati i analitičku varijabilnost (CVa) koja predstavlja varijabilnost prilikom uzastopnih merenja referentnih materijala u laboratoriji. Treća vrsta varijabilnosti je grupna, inter-individualna varijabilnost između jedinki, odnosno grupni (CVg). Na osnovu ovih varijabilnosti izračunava se indeks individualnosti da bi se utvrdilo da li je bolje za neki parametar koristiti intra ili inter-individualne referentne vrednosti. Može biti utvrđena i referentna vrednost za svaku jedinku – RCV (engl. Reference Change Value). Rezultati naših istraživanja ukazuju da veliki broj faktora utiče na intra-individualnu varijabilnost, a upotreba personalizovanih referentnih vrednosti kod pasa ima prednost za veći broj rutinskih laboratorijskih parametara.

¹Dr med. Sandra Nikolić, asistent dvm; dr sci. vet. med. Marko Cincović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Nikolina Novakov, vanredni profesor; dr vet. Mira Majkić, asistent, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

²Dr sci. med. Branislava Belić, redovni član akademije, Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva

*e-mail autora za korespondenciju: mcincovic@gmail.com

Intraindividualna varijabilnost (CVi) zavisi od bioloških osobina jedinki, što smo dokazali originalnim istraživanjem. Istraživanje je dokazalo da je uticaj starosti na hematološke i biohemijske parametre bio značajan za CVi vrednosti sledećih parametara: MCV 3,56 ($p<0,05$), MON 4,10 ($p<0,05$), PCT 3,41 ($p<0,05$), UREA 4,99 ($p<0,01$), GLU 5,52 ($p<0,01$), ALT 4,44 ($p<0,01$), ALP 5,31 ($p<0,01$), GGT 6,66 ($p<0,01$). Za sve parametre, osim za monocite CVi je imao najviše vrednosti u grupi pasa starijih od 84 meseca, dok su najviše vrednosti CVi za monocite utvrđene u grupi pasa starosti do 12 meseci. Kada je u pitanju uticaj pola, on je evidentan za parametre MPV 4,59 ($p<0,05$), ALB 5,92 ($p<0,05$), i ALT 6,89 ($p<0,01$), pri čemu su više vrednosti CVi za ove parametre utvrđene kod muških u odnosu na ženske jedinke. Rasa kao faktor, ispoljila je svoj uticaj na CVi za sledeće parametre: MON 21,62 ($p<0,01$), MON% 18,88 ($p<0,01$), AST 4,80 ($p<0,05$), LI-PAZA 4,17 ($p<0,05$), P 4,30 ($p<0,05$), pri čemu su se više vrednosti CVi za MON i MON% pojavile kod mešanaca, dok su se za ostale parametre više vrednosti za CVi pojavile u grupi rasnih pasa. Indeks telesne kondicije (BCS) uticao je na parametre MON 7,21 ($p<0,01$), i MON% 4,99 ($p<0,01$), a najviše vrednosti CVi za ove parametre su se pojavile u grupi slabije uhranjenih pasa, dok se u grupi pasa snažnije telesne kondicije pojavila najviša vrednost CVi za enzim lipazu 3,97 ($p<0,05$). Reproductivni status nije imao uticaja na CVi nijednog parametra u ovom istraživanju. Biološke osobine pasa utiču na intraindividualnu varijabilnost krvnih parametara, a buduća istraživanja treba usmeriti na uticaj zdravlja, vrste bolesti i terapije na intra-individualnu varijabilnost krvnih parametara pasa.

Ključne reči: krvni parametri, psi, referentne vrednosti zasnovane na jedinci

EKSTRACELULARNI PROTEIN TOPLOTNOG ŠOKA HSP70 KOD KRAVA U RANOJ LAKTACIJI I NJEGOV PROINFLAMATORNI EFEKAT

Miloš Ži. Petrović¹, Radojica Đoković¹, Marko R. Cincović^{2*},
Branislava Belić³, Jože Starič⁴, Miodrag Radinović², Jovan Stanojević²

Kratak sadržaj

Metabolički stres krava u ranoj laktaciji karakterišu: lipoliza, ketogeneza, insulinska rezistencija i zapaljenje kao rezultat negativnog energetskeg bilansa i povećane upotrebe lipida u energetske svrhe. Cilj ovog rada je bio utvrđivanje veze između lipidnih metabolita, insulinske rezistencije na bazi lipida i indeksa funkcionalnosti hepatocita i faktora nekroze tumora alfa (TNF- α) sa ekstracelularnim proteinom toplotnog šoka 70 (eHsp70). Ispitivanjima je bilo obuhvaćeno 50 krava i svi parametri su mereni u krvnom serumu. Kod krava u ranoj laktaciji, utvrđena je koncentracija ekstracelularnog Hsp70 na nivou $3,25 \pm 1,43$ ng/ml, u rasponu od 1,3 do 6,20 ng/mL. Korelaciona analiza između ispitivanih metaboličkih parametara ukazuje na aktivaciju homeoreze, prilagođavanje organizma na lipolizu i ketogenezu i intenzivnu celularnu adaptaciju zbog toga što Hsp70 korelira sa velikim brojem parametara. Ekstracelularni Hsp70 je u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim bilirubinom, GGT, BHB, NEFA, kortizolom, TNF- α i IL-1 β , a negativnoj sa glukozom, ureom, holesterolom, trigliceridima i insulinom. Kao i eHsp70, TNF- α korelira na identičan način sa metabolitima, tako da je vrednost koeficijenta korelacije slična, a pravac korelacije identičan. Korelacija između eHsp70 i triglicerida, NEFA, VLDL, NEFA prema holesterolu, NEFA prema insulinu i LFI je i dalje bila značajna nakon isključenja TNF- α kao kontrolnog faktora, što ukazuje na nezavisan efekat eHsp70 na ove parametre. On nije ispoljavao nezavisan efekat na holesterol, LDL, BHB i RQUICKI-BHB, zbog gubitka statistički značajne korelacije nakon isključenja TNF- α . Kod krava sa visokim vrednostima eHsp70 i TNF- α , utvrđena je veća koncentracija NEFA, BHB, NEFA prema insulinu i NEFA prema holesterolu i niža koncentraciju triglicerida i VLDL holesterola u poređenju sa kravama koje imaju samo visoke vrednosti TNF- α . Zbog pozitivne korelacije između eHsp70 i TNF- α , njihovih sličnih odnosa i dodatnog dejstva eHsp70 (TNF- α + eHsp70 visoke vrednosti) na lipidne metabolite mo-

¹Dr vet. Miloš Ži. Petrović, istraživač saradnik; dr sci. vet. med. Radojica Đoković, redovni profesor, Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet, Čačak, R. Srbija

²Dr sci. vet. Marko Cincović, redovni profesor; dr sci. vet. Miodrag Radinović, redovni profesor; dr. vet. Jovan Stanojević, asistent, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

³Dr sci med. Branislava Belić, redovni član akademije, Akademija medicinskih nauka Srpskog lekarskog društva

⁴Prof. dr Jože Starič, Univerzitet u Ljubljani, Veterinarski fakultet Ljubljana, R. Slovenija

*e-mail autora za korespondenciju: *mcincovic@gmail.com

že da se zaključi da eHsp70 ima proinflamatorne efekte koji podrazumevaju lipolizu, masnu jetru i insulinsku rezistenciju masnog tkiva.

Ključne reči: *čaperon, inflamacija, krave, metabolički stres, serum*

INTRA I EKSTRACELULARNI PROTEIN TOPLOTNOG ŠOKA HSP70

Proteini toplotnog šoka (eng. *Heat shock proteins, Hsp*) nazivaju se još i čaperoni / šaperoni i predstavljaju proteine koji su neizostavni za pravilno formiranje polipeptidnih lanca koji imaju ulogu u njihovoj translokaciji u okviru ćelije. U ćelijama, Hsp70 pomaže u ponovnom uspostavljanju native konformacije proteina koji su denaturisani pod dejstvom različitih stresogena, tako što sprečava njihovu agregaciju. Ovo ima za rezultat čuvanje ćelije od apoptoze i antiinflamatorni efekat. Pored navedenog, novija istraživanja ekstraćelijskog, cirkulišućeg Hsp70 govore u prilog činjenici da ovaj šaperon ima proinflamatornu ulogu, slično citokinima, ali i da poboljšava nadzor protiv tumorskih ćelija. Detektuje se u ćelijama, ali i u krvnom serumu, a u zavisnosti od lokalizacije ima sposobnost da ispolji potpuno različite fiziološke efekte (Rodrigues-Krause i sar., 2012). Intracelularni HSP (iHsp70) ima snažan antiinflamatorni efekat, dok ekstracelularni HSP (eHsp70) ima suprotnu ulogu, indukujući aktivaciju nekoliko proinflamatornih puteva. Ekstracelularni eHsp70, dolazi u krvotok iz živih ćelija koje su izložene stresu najverovatnije putem putem vezikularne sekrecije, egzozoma ili lizozoma i preko intaktne lipidne membrane koji su nezavisni od transporta proteina preko sistema endoplazmatski retikulum – Goldžijev aparat. Iz oštećenih i nekrotičnih ćelija dolazi pasivnim putem (Molvarec i sar., 2010). Više inflamatornih puteva može biti pokrenuto kao posledica izloženosti ekstracelularnom eHsp70, najverovatnije putem njegovog vezivanja za *toll* receptore na membranama ćelija (Borges i sar., 2012). Sa druge strane, intracelularni iHsp70 vrši blokadu aktivacije nuklearnog faktora κB (NF- κB), čime postiže svoj antiinflamatorni efekat (Jones I sar., 2011). Ovaj faktor je opšti transkripcioni faktor koji je neophodan za pokretanje inflamatornih odgovora na različite signale, a otkriven je u B-limfocitima (Barnes i sar., 1997). Kod inflamatornog odgovora jetre, kao značajnog organa za proizvodnju proteina akutne faze i citokina, od velikog značaja je povezivanje iHSP70 sa NF- κB /IKB kompleksom u citosolu hepatocita čime se sprečava transkripcija TNF α i inducibilnih gena azot-oksida sintaze, a time se postiže antiinflamatorni efekat šaperona. Preživljavanje ćelija je omogućeno posle inhibicije *c-Jun N-terminal kinase-* (JNK-) transdukcije signala koju vrši intracelularni Hsp70 posle njegovog povećanog stvaranja tokom stresnog odgovora (Beere i sar., 2000). Zaštita ćelija u osnovi ima inhibiciju apoptoze koja se postiže na nekoliko načina. Protein toplotnog šoka, iHSP70, sprečava aktiviranje kaspaza, povećava ekspresiju Bcl-2 i inhibira otpuštanje citohroma C, a kod infarkta mozga povećana ekspresija ovog proteina smanjuje veličinu infarkta i apoptozu (Zheng i sar., 2008). On smanjuje oksidativni stres, a cikloprostenonski prostaglandini (cp-PGs), koji pod određenim okolnostima mogu izazvati ekspresiju Hsp70, na taj način postaju moćni antiinflamatorni medijatori. Intracelularni Hsp70 pokazu-

je i interferenciju sa proinflamatornim citokinima, što se postiže na nivou gena gde region gena koji promovira TNF- α sadrži HSF1 vezujuće mesto koje potiskuje TNF α transkripciju. To znači da će aktivacijom HSF1 doći do smanjene ekspresije TNF α , što može biti razlog antiinflamatornog delovanja. Međutim, ovaj proces je dvosmeran, pa TNF α može zaustaviti aktivaciju HSF1. Zbog ovakvih relacija na genskom nivou, indukcija Hsp72 (HSPA1A), smanjuje ekspresiju gena za citokine kao što su TNF α , IL-1, IL-12, IL-10 i IL-18 (Asea i sar., 2000).

Za razliku od intracelularnih iHsp70, dokazano je da eHSP70 imaju velikog značaja u inflamatornim reakcijama, što ostvaruje putem transdukcije MyD88/IRAK/NF- κ B signala posle vezivanja sa *Tool-like* receptorom 2 (TLR2) i TLR4, putem CD14-zavisnih reakcija, čime se promovira urođena imunološka aktivacija (Asea i sar., 2002). U krvotoku, eHSP70 ima parakrinu ulogu. On indukuje signale koji daju tipičan proinflamatorni odgovor uz povećano stvaranje NO i proinflamatornih citokina TNF- α i interleukina 1 beta (IL-1 β) (Campisi i sar., 2003). Takođe je u pozitivnoj korelaciji sa klinički značajnim pokazateljima inflamacije kao što su CRP, fibrinogen i broj monocita. U organizmu, Hsp70 ima dvojnju ulogu u zavisnosti od toga da li je lociran intra- ili ekstracelularno, tako da iHsp70 ima zaštitnu ulogu, a eHsp70 ima proinflamatornu ulogu. Proinflamatorni efekat, eHsp70 ostvaruje tako što aktivira imunske ćelije, što dalje indukuje sekreciju inflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6), inducibilnu azot oksid sintazu (iNOS) ekspresiju i nuklearnu translokaciju nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B) (Asea, 2003).

HSP70 I NJEGOV PROINFLAMATORNI EFEKAT KOD KRAVA U RANOJ LAKTACIJI

Metabolički stres kod krava u ranoj laktaciji karakterišu lipoliza, ketogeneza, insulinska rezistencija i zapaljenje kao rezultat negativnog energetskeg bilansa i povećane upotrebe lipida u energetske svrhe. Cilj ovog rada je bio utvrđivanje veze između lipidnih metabolita, insulinske rezistencije na bazi lipida i indeksa funkcionalnosti hepatocita i faktora nekroze tumora alfa (TNF- α) sa ekstracelularnim proteinom toplotnog šoka 70 (eHsp70). Ispitivanjima je bilo obuhvaćeno 50 krava i svi parametri su mereni u krvnom serumu. Kod krava u ranoj laktaciji, utvrđena je koncentracija ekstracelularnog Hsp70 na nivou $3,25 \pm 1,43$ ng/ml, u rasponu od 1,3 do 6,20 ng/ml. Korelaciona analiza između ispitivanih metaboličkih parametara ukazuje na aktivaciju homeoreze, prilagođavanje organizma na lipolizu i ketogenezu i intenzivnu celularnu adaptaciju zbog toga što Hsp70 korelira sa velikim brojem parametara. Ekstracelularni Hsp70 je u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim bilirubinom, GGT, BHB, NEFA, kortizolom, TNF- α i IL-1 β , a negativnoj sa glukozom, ureom, holesterolom, trigliceridima i insulinom. TNF- α kao i eHsp70 koreliraju na identičan način sa metabolitima, tako da je vrednost koeficijentata korelacije slična, a pravac korelacije identičan. Korelacija između eHsp70 i triglicerida, NEFA, VLDL, NEFA prema holesterolu, NEFA prema insulinu i LFI je i dalje bila značajna nakon isključenja TNF- α kao kontrolnog faktora, što ukazuje na nezavisan efekat eHsp70 na ove parametre. eHsp70 nije ispoljio

nezavisan efekat na holesterol, LDL, BHB i RQUICKI-BHB, zbog gubitka statistički značajne korelacije nakon isključenja TNF- α . Kod krava sa visokim vrednostima eHsp70 i TNF- α , utvrđena je veća koncentracija NEFA, BHB, NEFA prema insulinu i NEFA prema holesterolu i niža koncentracija triglicerida i VLDL holesterola u poređenju sa kravama koje imaju samo visoke vrednosti TNF- α . Zbog pozitivne korelacije između eHsp70 i TNF- α , njihovih sličnih odnosa i dodatnog dejstva eHsp70 (TNF- α + eHsp70 visoke vrednosti) na metabolite lipida, može da se zaključiti da eHsp70 ima proinflamatorne efekte koji podrazumevaju lipolizu, nastanak masne jetre i insulinsku rezistenciju masnog tkiva (Petrović i sar., 2022).

Na osnovu specifičnosti metabolizma lipida kod krava, zaključuje se da sa porastom eHsp70 i TNF- α raste lipoliza i ketogeneza, a opada proizvodnja LDL i VLDL holesterola uz opadanje vrednosti triglicerida i holesterola i opadanje funkcionalnog statusa jetre kroz opadanje LFI i NEFA: holesterol odnosa. Sve navedene korelacije ukazuju na to da eHsp70 ima veze sa nastankom masne jetre kod krava u ranoj laktaciji. U jednoj *in vitro* eksperimentalnoj studiji dokazano je da Hsp70 ima pozitivan uticaj na lipogenezu u jetri kod jedinki sa NAFLD (engl. *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*) koje se hrane sa *high-fat dietary regime* (Zhang i sar., 2018). Indukcija Hsp70 u jetri poboljšava metabolizam masti, dok gubitak Hsp70 dovodi do sklonosti ka oksidativnom oštećenju jetre i nastanku lipidoze (Archer i sar., 2018). Obzirom da kod krava u ranoj laktaciji i kod ketoznih krava dolazi do povećane apoptoze hepatocita (Du i sar., 2017), moguće je da postoji gubitak Hsp70, koji prelazi u eHsp70, što umanjuje njegove protektivne efekte a povećava negativne pro-inflamatorne efekte.

Lipoliza je glavni pokretač svih metaboličkih promena u ranoj laktaciji, a dokazana je pozitivna korelacija vrednosti eHsp70 i TNF- α sa NEFA, kao indikatorom lipolize kod krava. Poznato je da prilikom delovanja termalnog stresa dolazi do translokacije Hsp70 u lipidne kapljice, a proteomska analiza lipidnih kapljica je dokazala da one uvek sadrže Hsp70 familiju čaperona (Jiang i sar., 2007). Takozvani *Heat shock cognate 70* (Hsc70) protein je uključen u proces autofagije indukovane čaperonima, a on reguliše lipolizu putem perlipina (Kaushik i sar., 2015, 2016). Ovakvi nalazi ukazuju na direktnu vezu između Hsp70 i lipolize, što podržava naše rezultate prema kojima eHsp70 nezavisno korelira sa vrednostima NEFA i ostalim izvedenim parametrima. Sa druge strane, poznato je da remodeliranje masnog tkiva kod krava u ranoj laktaciji podrazumeva aktivaciju makrofaga u adipoznom tkivu i pokretanje inflamatornog odgovora, kada nastaje povećano lučenje pro-inflamatornih citokina, a posebno TNF- α . Promene u ekspresiji perlipina dovode do inflamatornog odgovora masnog tkiva kada raste vrednost TNF- α , a te promene su izražene u ketozi krava (Zhang i sar., 2018a). To može biti razlog zbog koga TNF- α statistički značajno kontroliše korelaciju između eHsp70 i BHB i RQUICKI-BHB. Lipoliza je u direktnoj vezi sa insulinskom rezistencijom krava i može značajno uticati na ostale aspekte metabolizma u ranoj laktaciji. Kod ljudi i laboratorijskih miševa sa insulinskom rezistencijom i T2DM, postoji niža koncentracija iHsp70 i viša koncentracija eHsp70. Obe promene dovode do porasta vrednosti TNF- α , a što je odnos veći u korist eHsp70 to je izraženija

insulinska rezistencija (Krause i sar., 2015). Ovakvi rezultati potkrepljuju naš nalaz da oba medijatora imaju veliki značaj u razvoju insulinske rezistencije, s tim što eHsp70 pokazuje signifikantnu vezu sa RQUICKI-BHB indeksom samo ako je ona pod kontrolom TNF- α , dok nezavisno korelira sa NEFA: insulin odnosom. Masno tkivo, posebno u pozitivnom energetsom bilansu i kod gojaznih jedinki, je izvor koji aktivno oslobađa proinflamatorne citokine i adipokine, čime nastaje upala niskog stepena uz aktiviranje upalnih puteva zavisnih od NF- κ B koji dalje dovode do: blokade intracelularnog iHsp70 i insulinske rezistencije, hroničnog oslobađanja proinflamatornog ekstracelularnog eHsp70 iz imunskih ćelija i nastanka oksidativnog stresa, koji rezultira denaturacijom proteina. Kao neophodan signal opasnosti za borbu protiv oksidativnog oštećenja plazme, eHSP70 se povećava, ali kada je hronično povišen on indukuje dalju imunsku aktivaciju i proinflamatorni odgovor. On aktivira *toll-like* receptore (TLR) i inflamatorni put koji dovodi do smanjenja aktivacije HSF-1 i na kraju do smanjenog intracelularnog iHsp70. Niži iHsp70 uzrokuje smanjenu insulinsku osetljivost, intenziviranje aktivacije i upale NF- κ B i smanjeni antioksidativni, antiapoptotički i antiinflamatorni kapacitet. Dugoročna insulinska rezistencija određuje početak dijabetesa, upotpunjujući ovaj mehanizam pozitivne povratne informacije. Kada se odnos eHSP70/iHSP70 hronično menja u korist eHSP70, „dugme osetljivosti na insulin“ se isključuje i R vrednosti ([eHSP70]/[iHSP70]) rastu. Vežbanje izaziva ekspresiju iHSP70, dok oslobađanje eHSP70 reaguje na suprotan način. Vrednosti R, između 0 i 1, ukazuju na antiinflamatorni status, a između 1 i 5 na optimalan status imunoinflamatornog nadzora, dok vrednosti R iznad 5 ukazuju na nepoželjan hronični proinflamatorni status (Krause i sar., 2015).

LITERATURA

1. Archer A.E., Rogers R.S., Von Schulze A.T., Wheatley J.L., Morris E.M., McCain C.S. et al., 2018. Heat shock protein 72 regulates hepatic lipid accumulation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 315 (4): R696-R707.
2. Asea, A. 2003. Chaperokine-induced signal transduction pathways. *Exerc Immunol Rev*, 9: 25-33.
3. Asea, A., Kabingu, E., Stevenson, M.A., Calderwood S.K. 2000. HSP70 peptide-bearing and peptide-negative preparations act as chaperokines. *Cell Stress Chaperones*, 5: 425-31.
4. Asea A., Rehli M., Kabingu, E. et al. 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. Role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *Journal of Biological Chemistry* 277: 15028-34.
5. Barnes P.J., Karin M. 1997. Nuclear factor- κ B - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The new England Journal of Medicine*, 336: 15, 1066-71.
6. Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K. et al. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology*; 2: 469-75.
7. Borges, T.J., Wieten, L., van Herwijnen, M.J. et al. 2012. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Frontiers in Immunology*, 3: 95.
8. Campisi, J., Leem, T.H., Fleshner, M. 2003. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress & Chaperones*, 8: 272-86.
9. Du, X., Chen, L., Huang, D., Peng, Z., Zhao, C., Zhang, Y., et al. 2017. Elevated apoptosis in the liver of dairy cows with ketosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43: 568-78.
10. Jiang, H., He, J., Pu, S., Tang, C., Xu, G. 2007. Heat shock protein 70 is tran-

slocated to lipid droplets in rat adipocytes upon heat stimulation. *Biochim Biophys Acta*, 1771:66-74. doi: 10.1016/j.bbaliip.2006.10.004. Epub 2006 Nov 15. PMID: 17175194.

11. Jones, Q., Voegeli, T.S., Li, G., Chen, Y., Curri, R.W. 2011. Heat shock proteins protect against ischemia and inflammation through multiple mechanisms. *Inflammation and Allergy-Drug Targets*, 10: 247-59. **12.** Kaushik, S., Cuervo, A.M. 2016. AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA. *Autophagy*, 12: 432-438. doi: 10.1080/15548627.2015.1124226. PMID: 26902588; PMCID: PMC4835968. **13.** Kaushik, S., Cuervo, A.M. 2015. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat Cell Biol*, 17: 759-70. doi: 10.1038/ncb3166. Epub 2015 May 11. PMID: 25961502; PMCID: PMC4449813. **14.** Krause, M., Heck, T.G., Bittencourt, A., Scorzano, S.P., Newsholme P., Curi R., et al., 2015. The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. *Mediators of inflammation*; 249205. <https://doi.org/10.1155/2015/249205>. **15.** Molvarec, A., Tamási, L., Losonczy, G., Madách K, Prohászka Z, Rigó, J. Jr. 2010. Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies. *Cell Stress and Chaperones*, 15: 237-247. **16.** Petrović, M.Ž., Cincović, M., Starić, J., Djoković, R., Belić, B., Radinović, M. et al., 2022. The Correlation between Extracellular Heat Shock Protein 70 and Lipid Metabolism in a Ruminant Model. *Metabolites*, 12(1):19. <https://doi.org/10.3390/metabo12010019> **17.** Rodrigues-Krause, J., Krause, M., O'Hagan, C. et al. 2012. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: does fat matter? *Cell Stress and Chaperones*, 17: 293-302. **18.** Zhang, J., Fan, N., Peng, Y. 2018. Heat shock protein 70 promotes lipogenesis in HepG2 cells. *Lipids in health and disease*, 17 (1), 1-10. **19.** Zhang, S., Liu, G., Xu, C., Liu, L., Zhang, Q., Xu, Q. et al, 2018a. Perilipin 1 Mediates Lipid Metabolism Homeostasis and Inhibits Inflammatory Cytokine Synthesis in Bovine Adipocytes. *Frontiers in Immunology*, 9: 467. doi: 10.3389/fimmu.2018.00467. **20.** Zheng, Z., Kim, J.Y., Ma, H., Lee, J.E. Yenari, M.A. 2008. Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28: 53-63.

ZNAČAJ INDEKSA ANIZOCITOZE U DIJAGNOSTICI NAJČEŠĆIH INFEKTIVNIH ANEMIJA MAČAKA

**Milica Nikolić¹, Milena Radaković², Kristina Spariosu²,
Milica Kovačević Filipović², Jelena Francuski Andrić^{2*}**

Kratak sadržaj

Indeks anizocitoze (engl. Red Cell Distribution Width – RDW) je parametar koji ukazuje koliko veličina eritrocita odstupa od svoje prosečne zapremine (engl. Mean Corpuscular Volume – MCV). U humanoj medicini, RDW se koristi kao dodatni parametar za klasifikaciju tipa anemije, a njegove promene se dovode u vezu sa brojnim patološkim stanjima, ali i sa starenjem. U humanoj kardiologiji, RDW ima veliki značaj, zbog toga što njegov porast ukazuje na povećan rizik od nastanka kardiovaskularnih oboljenja. Po uzoru na istraživanja u humanoj medicini, kod pasa i mačaka je takođe dokazana njegova povezanost sa pojedinim oboljenjima srca. Međutim, sprovedene studije su malobrojne, tako da značaj određivanja RDW-a u veterinarskoj kardiologiji tek treba utvrditi, kao i njegov uopšteni klinički značaj. Prethodna ispitivanja kod mačaka su dokazala da postoje promene RDW-a kod anemija, ali uzroci anemija nisu ispitivani. Kako je kod mačaka anizocitoza učestala promena, definisanje anemija, ne samo prema hematološkim indeksima već i prema RDW parametru moglo bi imati dijagnostički značaj. Infekcije hemotropnim mikoplazmama i/ili virusom mačije imunodeficijencije (engl. Feline Immunodeficiency Virus – FIV) spadaju u veoma česte uzroke anemija mačaka. Cilj ovog retrospektivnog istraživanja je bio da se koristeći baze podataka iz prethodnih studija, analiziraju promene u RDW parametru i njegova povezanost sa anemijom kod mačaka, sa i bez ispoljenih kliničkih znakova bolesti, koje su bile prirodno inficirane navedenim patogenima.

Rezultati ove retrospektivne studije su dokazali da je među mačkama inficiranim hemotropnim mikoplazmama, manji broj ispoljavao kliničke znake ($n=13$), a veći je imao asimptomatsku infekciju ($n=28$). Veoma slično, među mačkama sa FIV infekcijom, 4 puta manji broj je ispoljavao kliničke znake ($n=11$) u odnosu na asimptomatske mačke ($n=43$). Nasuprot monoinfekcijama, skoro podjednak broj mačaka sa koinfekcijama je ispoljavao ($n=12$), odnosno nije ispoljavao kliničke znake ($n=9$). Kod FIV inficiranih mačaka, blaga anemija je zapažena kod 3 od 54 mačke. Svega 6, od 41 hemoplazma pozitivnih mačaka je imalo anemiju, dok je kod mačaka sa koinfekcijom anemija bila

¹Spec. dr vet. Milica Nikolić, predavač, Visoka zdravstveno – sanitarna škola strukovnih studija „Visan“, Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Milena Radaković, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Kristina Spariosu, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Milica Kovačević Filipović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Jelena Francuski Andrić, docent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: francuski_jelena@yahoo.com

prisutna kod 3 od 21 mačke. Promene u vrednosti MCV je imala samo jedna od 4 FIV pozitivne mačke, 1 od 3 hemoplazma pozitivne mačke i jedna i od 5 mačaka sa koinfekcijom. Bez obzira da li su mačke sa blagom anemijom imale ili nisu imale kliničke znake bolesti i bez obzira na infekciju bilo kojim od patogena ili njihovom kombinacijom, RDW nije značajno odstupao u odnosu na referentni interval. Jedino su FIV pozitivne mačke sa kliničkim znacima imale značajno niži MCV i viši RDW ($p < 0,001$) u odnosu na zdrave i asimptomatske, FIV pozitivne mačke, sa monoinfekcijom ili koinfekcijom.

Prevalenca mačaka inficiranih sa FIV-om i hemotropnim mikoplazmama je dosta visoka u Evropi (FIV 4-20 procenta, hemoplazma 12-43 procenta). U Srbiji, FIV infekcija ima veću prevalencu (23,6 procenta) u odnosu na FeLV infekciju (1,3 procenta). U poređenju sa prevalencom pojave FIV infekcije, hemoplazma ima niži stepen prevalencije u Srbiji koji iznosi 14,2 procenta, a najprevalentnija mikoplazma je *M. haemominutum* (12,6 procenata). Preostale dve vrste su skoro dvostruko manje zastupljene: *M. haemofelis* (5,4 procenata) i *M. turicensis* (6,2 procenata). Rezultati koji su predstavljeni u ovoj studiji su prvi koji dokazuju značaj indeksa anizocitoze kod ovih infekcija.

Virus mačije imunodeficijencije je otkriven 1987. godine i od tada su širom sveta sprovedena brojna istraživanja sa ciljem utvrđivanja njegove distribucije. Rezultati prevalencije se značajno razlikuju u zavisnosti od geografskog regiona i ispitivane populacije mačaka. Virus je vrlo sličan humanom HIV virusu, gde mačke kao i ljudi dugo ostaju asimptomatski nosioci virusa, a nakon toga dolazi do ispoljavanja simptoma bolesti. Generalno posmatrano, postoji velika heterogenost u vrednostima hematoloških parametara povezanim sa pojavom anemije i promenama u leukocitima kod FIV inficiranih mačaka. Studije ukazuju da je veća verovatnoća da će doći do pojave anemije kod FIV pozitivnih mačaka koje imaju ispoljene kliničke znake bolesti, nego kod FIV asimptomatskih mačaka. Bez obzira na pojavu simptoma, anemija koja prati FIV infekciju se javlja u relativno malom procentu slučajeva. To je takođe rezultat i ove studije. Asimptomatske, FIV pozitivne mačke, imaju slične hematološke promene sa HIV pozitivnim asimptomatskim pacijentima: leukopeniju sa limfopenijom, neutropenijom i trombocitopeniju, što je posledica delovanja virusa na kostnu srž. Kod mačaka uključenih u ovu studiju, nisu uočene promene u ukupnom broju leukocita što ukazuje da promene zavise od imunološkog statusa i faze bolesti.

Hemotropne mikoplazme koje imaju najvišu prevalencu u Srbiji su *M. haemominutum* i *M. turicensis*. One imaju nisku patogenost i samostalno ne mogu dovesti do hemolitičke anemije. Ukoliko postoje pridružene bolesti, a to je najčešće FIV infekcija, dolazi do razvoja anemije. Dosadašnja ispitivanja dokazuju da su hematološke promene najviše povezane sa *M. haemofelis* infekcijom koja dovodi do anemije, limfocitoze, trombocitopenije i pojave aktiviranih monocita.

Na osnovu dobijenih rezultata ove retrospektivne studije, može se zaključiti da se promena vrednosti parametra RDW može očekivati kod FIV pozitivnih mačaka koje imaju klinički vidljiv poremećaj zdravstvenog stanja. Značaj RDW vrednosti kod drugih uzroka anemija mačaka tek treba ispitati.

Ključne reči: anemija, FIV, hemoplazma, indeks anizocitoze, mačka

Zahvalnica:

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

TEMATSKO ZASEDANJE VII
PLENARY SESSION VII

UNAPREĐENJE ZDRAVSTVENE ZAŠTITE I
PROIZVODNIH OSOBINA OVACA I KOZA
IMPROVING HEALTH CARE AND PRODUCTION
CHARACTERISTICS OF SHEEP AND GOATS

ZNAČAJ KLINIČKOG PREGLEDA GENITALNIH ORGANA PRIPLODNIH OVNOVA KAO SELEKCIJSKI KRITERIJUM U UNAPREĐENJU AUTOHTONIH RASA OVACA

*Zsolt Becskei¹, Mila Savić¹, Elmin Tarić¹, Jovan Bojkovski¹,
András Gáspár², Bogdan Cekić³, Vladimir Dimitrijević¹*

Kratak sadržaj

Poljoprivredna proizvodnja u Republici Srbiji predstavlja značajnu granu privrede. Stočarstvo pre svega karakterišu usitnjena porodična gazdinstva, koja se tradicionalno bave ovom delatnošću. Ovčarstvo predstavlja važnu granu stočarstva u Republici Srbiji, gde se na preko 155 000 poljoprivrednih gazdinstava gaji ukupno preko 1,7 miliona ovaca. Najveći deo populacije ovaca čine autohtone rase, u prvom redu različiti sojevi pramenke, zatim, u značajno manjem broju i cigaja, koje se najčešće gaje u poluekstenzivnim sistemima. Mnogi sojevi autohtonih rasa imaju ugrožen status i neophodno je unaprediti mere očuvanja i zaštite ovih dragocenih autohtonih genetičkih resursa, koji imaju značajan potencijal u održivoj poljoprivrednoj proizvodnji. Posebna pažnja treba da se posveti odabiru priplodnih ovnova, zbog toga što je njihov uticaj na populaciju najveći, s obzirom na činjenicu da jedan kvalitetan ovan u sezoni parenja, upari preko 40 ovaca i ostavlja svoje brojne potomke. Iz tog razloga, prilikom izrade selekcijskih programa za određenu rasu, posebnu pažnju treba posvetiti priplodnim ovnovima i njihovim proizvodnim i reproduktivnim karakteristikama. Pored ostalih selekcijskih kriterijuma, kliničkim pregledom genitalnih organa i morfometrijskom analizom testisa pri odabiru priplodnih ovnova u značajnoj meri se može poboljšati, ne samo zdravlje zapata, već i kvalitetne rasne odlike i brojnost populacije. Poznato je da je pored zdravstvenog statusa genitalnih organa, kapacitet testisa za proizvodnju sperme u srazmeri sa obimom testisa (veličina testisa). Ustanovljeno je da ovnovi sa većim obimom testisa ostavljaju veći uticaj na populaciju i mogu da se pare sa većim brojem ovaca. Oni ostavljaju veći broj potomaka, te svoje kvalitativne i kvantitativne rasne odlike mogu brže širiti u populaciji u odnosu na priplodnjake koji imaju manje testise, koji stvaraju manje sperme. Na osnovu literaturnih podataka, koji su proistekli iz opsežnih ispitivanja zaključeno je da priplodni ovnovi starosti preko 1,5 godine, sa zdravim genitalnim organi-

¹Dr sci. vet. med. Zsolt Becskei, docent; dr sci. vet. med. Mila Savić, redovni profesor; dr vet Elmin Tarić, asistent; dr sci. vet. med. Jovan Bojkovski, redovni profesor; dr sci. vet. med. Vladimir Dimitrijević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr András Gáspár, vanredni profesor, Univerzitet Vetetinarske medicine Budimpešta, Budimpešta, Mađarska

³Mr Bogdan Cekić, Institut za stočarstvo, Beograd, R. Srbija
e-mail autora za korespondenciju: bzolt@vet.bg.ac.rs

ma moraju imati obim testisa najmanje 33 cm. Idealno bi bilo da svaki priplodnjak ima obim testisa ≥ 35 cm zbog toga što tada može uspešno da pari i preko 40 ovaca tokom sezone parenja. U zemljama sa razvijenim ovčarstvom, ova saznanja čine glavne selekcijske smernice i kriterijume, te je shodno tome, cilj da kvalitetni priplodnjaci imaju obim testisa ≥ 38 cm. Lipski soj pramenke predstavlja autohtonu rasu Republike Srbije, koji je prema klasifikaciji Pravilnika o genetičkim resursima do 2019. godine spadao u I kategoriju (kritično ugrožene rase), sa brojem priplodnih grla od oko 800 komada. Zahvaljujući subvencijama, brojnost populacije se povećala i u 2021. godini je postignuto 2 000 registrovanih priplodnih jedinki, tako da ona nije više kritično ugrožena, već spada u kategoriju "potencijalno ugroženih". Ispitivanja populacija lipskog soja pramenke su dokazala da je zdravlje genitalnih organa priplodnih ovnova dobro, prosečan obim testisa je 38,35 cm, ali je opseg varijacija velik. Ova vrednost podrazumeva odličan prosek na nivou cele populacije, ali zbog toga što je većina zapata mala (do 20 priplodnih jedinki) i često samo sa jednim priplodnim ovnom u zapatu, ovnovi sa testisima nedovoljnog obima mogu imati nepovoljan uticaj, ne samo na zapat u kome se gaji, već i na celu populaciju lipske ovce. Sa aspekta očuvanja i unapređenja ovih dragocenih autohtonih genetičkih resursa, poželjno je osavremeniti i selekcijski pristup koji uključuje kriterijume vezane za genitalni trakt, sa ciljem da svaki zapat ima kvalitetnog ovna.

Ključne reči: autohtone rase ovaca, klinički pregled, ovnovi, reproduktivni organi, zdravlje

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, u sklopu institucionalnog finansiranja Ev. Br.: 451-03-68/2020-14/200143, kroz Projekat Br.: TR31085

IMPORTANCE OF CLINICAL ASSESSEMENT OF THE GENITAL TRACT IN BREEDING RAMS IN THE PROCESS OF SELECTION AND IMPROVEMENT OF AUTOCHTHONOUS SHEEP BREEDS

**Zsolt Becskei, Mila Savić, Elmin Tarić, Jovan Bojkovski, András Gáspárdy,
Bogdan Cekić, Vladimir Dimitrijević**

Summary

The agriculture represents an important branch of economy in the Republic of Serbia. Animal production is mainly based on traditional small family households. Sheep production is an important branch of agriculture in the Republic of Serbia, where a total of 1.7 million sheep are reared in over 155.000 households, mainly under semiextensive management. The majority of sheep are autochthonous breeds and local types adapted to the local environment. Because of the endangered status of the autochthonous sheep breeds, conservation and improvement of these precious populations is needed, as they have a major potential in the sustainable agricultural production. The main focus sho-

uld be given to the selection of breeding rams, as they have the biggest impact on the population quality. One high quality breeding ram can mate over 40 ewes over the mating season and leave offspring. Taking this in mind, when the selection criterias are defined for a breed, a special attention should be given to the ram, to its productive and reproductive traits. Among other selection criteria, the clinical assessment of the genital tract with a special attention on scrotal circumference could result in better health and quality of the population. It is well known that rams with bigger scrotal circumference (bigger testicles) can have a better reproductive capacity and can serve more ewes in the mating season, what makes a stronger impact of rams on the population quality. In countries with specialized sheep production these characteristics are included into the selection measures and breeding rams older than 1.5 years with healthy genitals should have a scrotal circumference of minimum 33 cm, and the ideal score means that the ram should have $i \geq 35$ cm, and the elite ones ≥ 38 cm. The Lipe sheep is a local autochthonous breed of the Republic of Serbia, which has a breeding population size of 800 animals in 2019. According to the national legislation that time it had a status of a critically endangered breed. As a result of higher subsidies for the last few years, the population size rises and in 2021 reached 2000 breeding animals which means it got a status of potentially endangered breed. Assessment of the genital tract of breeding rams of the Lipe sheep showed good health of the genitalia, with an average scrotal circumference of 38.35 cm, but with evidence of big variations. The average scrotal circumference of 38.35 cm means an excellent result on a population level. Eventhough the overall scrotal circumference is excellent on the population level, because of the fact that most of the herds are small (up to 20 breeding animals) with only one breeding ram, the animals with insufficient values of scrotal circumference (≥ 33) could have negative results not only at the herd level, but also at the population level of the endangered Lipe sheep. With the aim to improve and save the endangered autochthonous rare breed and ensure a high quality elite breeding rams in each flock, it is necessary to update the selective measures with new criteria regarding the assessment of the male genital tract.

Keywords: autochthonous sheep breeds, clinical assessment, breeding rams, genital tract, health

**GOATS AND SHEEP AS A PILLAR OF SUSTAINABLE ANIMAL
PRODUCTION IN THE MOUNTAIN AREAS**

***KOZARSTVO I OVČARSTVO KAO STUB SAMOODRŽIVE
PROIZVODNJE U PLANINSKIM PREDELIMA***

***Minja Zorc¹, Božidarka Markovič², Tamara Ferme¹,
Marjana Cvirn³, Peter Dovč^{1*}***

Summary

Small ruminants are an important segment of livestock production in the mountain areas. Because of their ability to use mountain pastures that are not usable by large ruminants, they provide important environmental services for the maintenance of the cultural landscape in addition to their production potential for milk and meat. Because of the differences in grazing behaviour between goats and sheep, co-grazing of the two species under more complex environmental conditions is sometimes considered. The number of small ruminants in mountain areas declined in some countries sharply after World War II, but recovered generally in the 1960s and 1970s, often due to the financial support to the farmers. In many local populations, the breed-specific gene pool was threatened by crossbreeding with more productive cosmopolitan breeds, with the aim of improving the production traits and economic efficiency of local sheep and goat populations. However, the importance of adapting local breeds to specific environmental conditions has demonstrated the value of these local genetic resources in the terms of robustness, longevity, and lifetime performance under particular environmental conditions. Therefore, special attention should be given to the controlled introgression of genetic material from more productive breeds into the fragile gene pools of local breeds. In some cases, local sheep and goat populations are in sporadic reproductive contact with free living populations of wild goats and mouflons. The introduction of molecular tools, including microsatellite markers, mitochondrial DNA sequencing, SNP microarrays, and targeted genome sequencing, has enabled in-depth analysis of population structure, phylogenetic relationships among populations, and a genome-wide search for genes associated with health, adaptation and production traits in local populations of small ruminants. Finally, the recent development of cell models to study

¹Minja Zorc, Tamara Ferme, Peter Dovč, University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science, Ljubljana, Slovenia

²Božidarka Markovič, University of Montenegro, Biotechnical Faculty, Podgorica, Montenegro

³Marjana Cvirn, Sheep and goat breeders association of Slovenia, Domžale, Slovenia
e-mail address for correspondence: peter.dovc@bf.uni-lj.si

disease susceptibility and the molecular background of production traits opens up new strategies to identify functional genetic variability.

Key words: *ecological service, genetic introgression, genetic resources, goat, local populations, mountain regions, sheep*

Kratak sadržaj

Uzgoj malih preživara predstavlja značajnu granu stočarstva u planinskim predelima. S obzirom na to da oni mogu da koriste planinske pašnjake koji nisu pristupačni velikim preživarima, mali preživari osim što proizvode mleko i meso, pružaju i značajnu podršku kulturnoj i pejzažnoj baštini. Zbog različitog načina uzimanja svežeg rastinja prilikom paše, u nekim okolnostima treba razmotriti i mogućnost da se vrši zajednička ispaša ovaca i koza. Brojnost populacija malih preživara je značajno opala u planinskim regionima nakon drugog svetskog rata, a oporavak je zabeležen tek tokom 60-ih i 70-ih godina prošlog veka. Većina lokalnih populacija je bila izložena ukrštanju, te je izvorni genetički pul narušen, sve sa ciljem da se uz pomoć ukrštanja sa produktivnijim rasama, poboljšaju produktivna svojstva lokalnih populacija ovaca i koza uz ekonomičniju proizvodnju. Međutim, značaj lokalnih rasa i njihova dodatna vrednost se ogleda u adaptiranosti na uslove u kojima se gaje, njihove robusnosti, otpornosti, dugaćkog proizvodnog veka u specifičnim uslovima u kojima se već vekovima gaje. Iz spomenutih razloga, uvođenje novog genetičkog materijala visoko produktivnih rasa u lokalne zapate treba razmotriti sa posebnom pažnjom. Postoje primeri i kada su lokalne populacije ovaca i koza u pojedinim predelima u kontaktu sa slobodno živećim populacijama muflona i divljih koza. Zahvaljujući savremenim molekularnim tehnikama kao što su mikrosatelitski markeri, sekvencioniranje mitohondrijalne DNK, SNP i sekvencioniranje target gena moguća je detaljnija analiza strukture populacija, utvrđivanje filogenetičkog odnosa unutar i između populacija, kao i traganje za genima koji su u vezi sa zdravljem, proizvodnim svojstvima, sposobnošću za adaptaciju, čak i u malim lokalnim populacijama ovaca i koza. Na posletku, upotrebom ćelijskih modela za ispitivanje prijemčivosti za određene bolesti, kao i ispitivanje molekularne pozadine proizvodnih osobina, otvaraju se mogućnosti za nove strategije za identifikaciju funkcionalne genetičke varijabilnosti.

Ključne reči: *eko-servis, genetička introgresija, genetički resursi, koza, lokalne populacije, ovca, planinski predeli*

INTRODUCTION

Small ruminants traditionally enabled agricultural use of mountain areas, where other forms of agricultural production were not applicable. In addition to its production task to provide meat and milk for human nutrition and wool as a raw material for textile industry, small ruminants also provided important eco-service in the context of establishment and preservation of the typical agricultural landscape. Different forms of sheep and goat production were established in mountain regions, trying to adapt the herd management to different environmental situations. Seasonal grazing on pastures at higher altitude and

transhumance (Siasiou et al., 2018) were popular practices in the mountain regions in the Southwestern and Central Europe. Grazing of goats was often used to control forestation and to preserve the already existing grassland. In some regions, co-grazing of sheep and goat supported sustainable use of relatively fragile mountain regions. This were the early attempts to integrate eco-service and animal production function in an ecosystem adapted activity (Bojkovski et al., 2014). In this paper we discuss some important aspects of sheep and goat breeding in the mountain regions during the last century.

DYNAMICS OF SHEEP AND GOAT POPULATIONS IN TIME

For the majority of sheep and goat populations in the South- and Central Europe, a significant drop of population size was typical for the first half of the 20st century. Many populations were halved in the period from 1890 to 1940, however, the majority of them recovered in the period from 1960 to 1990. In Slovenia, in 1869, 300,000 sheep and 150,000 goats were kept. After that, the number decreased progressively until 1940, when a slight increase in the number of both species was recorded, followed by a drastic decrease in the fifties and sixties, when there were almost no goats and only 25,000 sheep left. This was due to the strict legal restrictions of goat breeding because of its perceived negative effect on preserving forest areas in mountain regions. Agricultural policy supported the revival of small ruminant breeding after 1980, and the number of sheep and goats increased until 2009, when a slight decline was recorded. In the last decade, the number of sheep and goats in Slovenia has remained relatively stable, with about 115,000 sheep and 25,000 goats. The spread of small ruminant breeding is mainly concentrated in the south-western and south-eastern part of Slovenia, representing a hilly landscape which presents some limitations for other livestock species (Žan Lotrič et al., 2013).

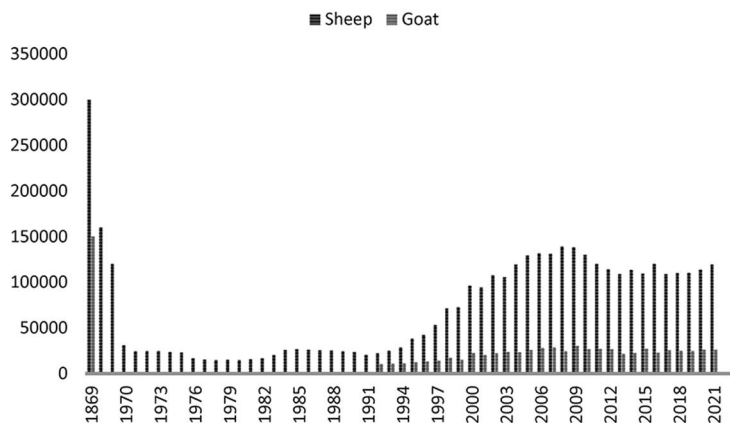


Figure 1. Number of sheep and goats in Slovenia from 1869 to 2021

(Source: <https://www.stat.si/StatWeb/Field/Index/11/120>)

The density of sheep populations in Central and Southern Europe was growing until 2000 and after a slight reduction of both species between 2000 and 2010, the number was quite stable during the last 10 years. There was a slight growth of the population in the Alpine region, mainly due to seasonal use of mountain pastures and slight decrease in the Southern Europe. However, in general the average density of sheep populations in Europe is rather low (Fig. 2), due to small size of individual farms and scarce natural resources in the regions where sheep is kept. The exemptions are Great Britain, some regions in Spain and France, Netherlands, Greece, Bulgaria and Turkey, where the density of sheep is about two times higher than the EU average.

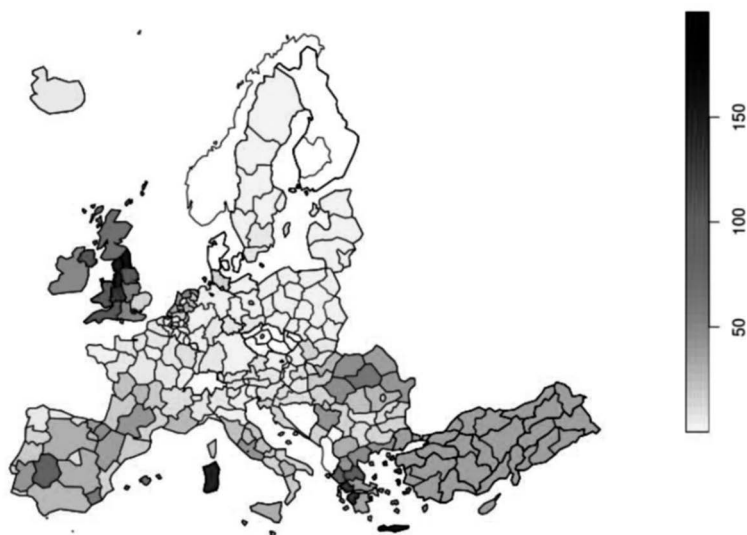


Figure 2. Average sheep density in the period from 2010 to 2020
(Source: https://ec.europa.eu/eurostat/data-browser/view/agr_r_animal/default/table?lang=en)

POPULATION STRUCTURE, DIFFERENTIATION OF BREED POPULATIONS AND PHYLOGENY

The presence of local breeds of sheep and goat is typical for the mountain regions, where on relatively small geographic area several phenotypically diverse populations/breeds can exist. An example for that are sheep populations in Montenegro, where in different mountain regions several local breeds are present. Based on morphological traits, the Montenegro sheep breeds can be differentiated in three phenotypic groups (Fig. 3), where Jezero-Pivska and Sjenica cluster together, however, Bardoka and Zeta Žuja form separate branches on the tree (Marković et al., 2019).

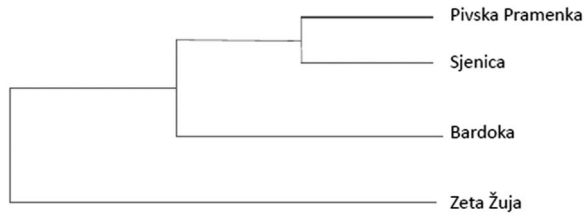


Figure 3. Dendrogram based on phenotypic traits of Montenegro sheep breeds

These relationships can be also confirmed using genetic data. Zeta Žuja, Bardoka and Pivska Pramenka build separate clusters in PCA, whereas Sjenica, Sora, Jezero pivska and part of the Ljaba population represent breeds with shared genetic background, which is probably the consequence of mutual reproductive contacts in the past (Fig. 4A). Phenotypic similarity among Pivska Pramen-

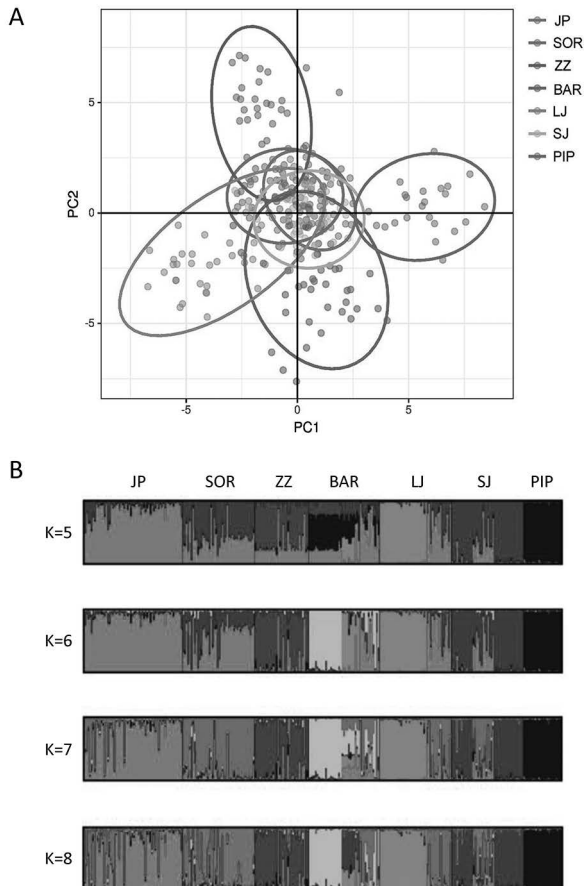


Figure 4. Genetic relationship among Montenegro sheep breeds, **A)** PCA, **B)** STRUCTURE analysis.

ka (PIP) and Sjenička (SJ) could not be supported by genotyping data, suggesting that phenotypic similarity can have different genetic backgrounds or can be caused by a relatively small number of genes with significant phenotypic effect. In the STRUCTURE analysis (Fig. 4B), PIP and partially Bardoka (BAR), Zeta Žuja (ZŽ) and Ljaba (LJ) represent genetically separated populations, whereas Sora (SOR) and Jezero Pivska (JP) represent breed populations with higher degree of genetic variability, which is supported also with the highest number of microsatellite alleles in these populations.

In addition to nuclear genetic markers, mitochondrial DNA (mtDNA) is a popular genetic marker for phylogenetic studies. The sequencing of the proximal part of the Pag sheep mtDNA D-loop region revealed presence of two main mtDNA haplogroups, M and P, suggesting that the M haplotype represents a trace of Merinisation of the Pag island sheep (Ivankovic et al., 2005). The combination of microsatellite markers and mtDNA sequencing was used for characterisation of seven Balkan Pramenka breeds (Činkulov et al., 2012). Molecular analysis suggested that the West Balkan Pramenka sheep originate from two distinct maternal lineages of domestic sheep and that different Pramenka phenotypes tend to form separate panmictic populations.

CROSS-BREEDING OF LOCAL BREEDS WITH COSMOPOLITAN BREEDS

Some local breeds were in the past subject of genetic improvement in order to introduce traits which would increase their competitiveness to cosmopolitan breeds, which were in some regions supported by the instruments of agricultural policy. An example is the introgression of the Romanov (R) genotype to the Jezersko-Solčavska (JS) breed in Slovenia with the aim to improve reproduction traits, mainly the litter size. Due to the crossing with the Romanov breed, the litter size in the improved Jezersko Solčavska breed (JSR) was increased from 1,4 to 1,9. However, the aseasonal polyestric reproduction cycle and adaptation to the local environmental conditions remained preserved from the original JS breed (Kompan and Zagožen, 1990). Further on, the improved JS breed was used for crossings with cosmopolitan meat sheep breeds (Texel) in order to increase the growth capacity of lambs and meat quality.

CONTACT WITH FREE LIVING POPULATIONS

Some local populations of sheep and goats were traditionally in sporadic reproductive contacts with free living mouflons and chamois, respectively. Several examples of this type of introgression were reported by Barbato et al. (2016) in some European sheep populations. Using SNP array analysis they identified bidirectional introgression signals in most mouflon and sheep populations. The adaptive introgression from mouflon to domestic sheep was detected in the regions of the genome related to innate immunity and bitter taste perception. These

results indicate potential for adaptive introgression among sheep and mouflon populations. Our research in Slovenian local goat breed, Drežnica goat, revealed its distinct genetic identity and close relatedness to the neighboring Austrian and Italian alpine breeds (Pogorevc et al., 2021). In the Drežnica goat population we identified a single F1 animal, with maternal contribution from the domestic goat and paternal contribution from the free living chamois.

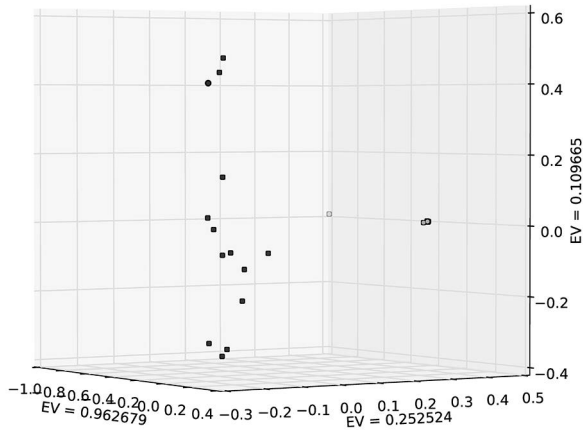


Figure 5. PCA analysis of genomic sequence diversity among Drežnica goat and chamois. The Drežnica goats build the blue cluster, chamois are orange and the F1 cross animal is shown in green. As a reference genome the genome of the Saanen goat was used.

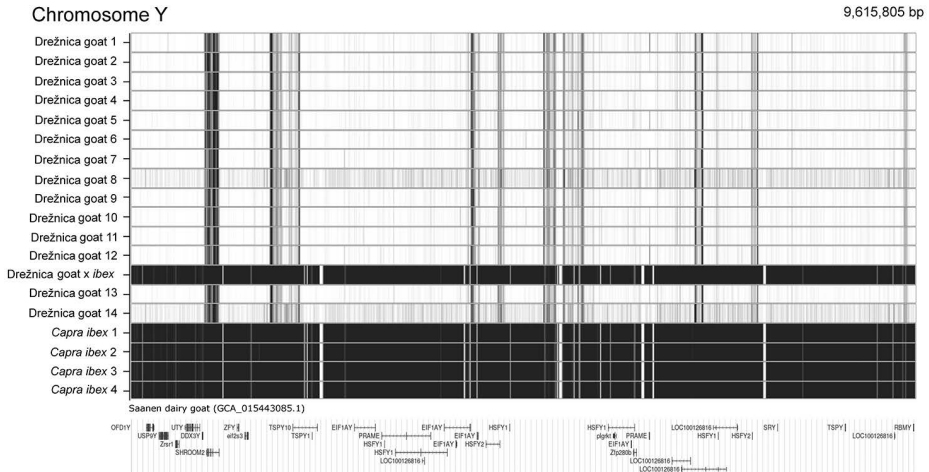


Figure 6. SNP density identified on Y chromosome identified from whole genome sequencing data aligned to the Saanen dairy goat reference sequence. Higher SNP density causes darker stripes (chamois and F1 cross animal), whereas lower SNP density results in brighter stripes (Drežnica goat). The slight differences in pattern of the Drežnica goat samples suggest the presence of different Y chromosome haplotypes in this breed.

Based on SRY, ZFY and DDX3Y genes, four major Y-chromosomal haplotypes, Y1A, Y1B, Y2A and Y2B were determined. The haplotype Y1A can be further split into Y1AA and Y1AB. In the Drežnica goat breed Y-chromosomal haplotypes Y1B, Y1AA and Y1AB were found (Nijman et al., 2022). The Y chromosome sequence analysis revealed significant sequence differences between Drežnica goat and local chamois population. The F1 individual had chamois Y chromosome and could be clearly differentiated from males carrying goat Y chromosome (Fig. 6). The variability of the Y chromosome in the Drežnica breed, also visible on the graph, is supporting the finding by Nijman et al., that in this breed three Y chromosomal haplotypes are present.

CELL MODELS, FUNCTIONAL GENOMICS

Introduction of molecular genetics and cell biology tools to the study of economically important traits in sheep and goat, allows molecular dissection of complex traits in genetic and physiological components. This enables application of molecular markers for targeted selection strategies (Marker Assisted Selection, MAS). Genetic polymorphisms in the coding regions of lactoprotein genes which are associated with milk composition and cheese making properties are often used for MAS to improve milk quality. Beta lactoglobulin variants (Rustempašić et al., 2018) were used for characterisation of Pramenka breed in Bosnia and Herzegovina and for improvement of milk quality.

An example of molecular approach to study complex traits is establishment of primary cell cultures which allow cell type specific *in vitro* experiments with genetic material from local breeds. In our laboratory, we established primary cell cultures from goat mammary gland (Fig. 7) (Prpar et al., 2012). These cell lines were used for *in vitro* challenge experiments with the mammary gland specific pathogen, *Mycoplasma agalactiae*, which is causing contagious agalactia in sheep and goat in the Mediterranean region.

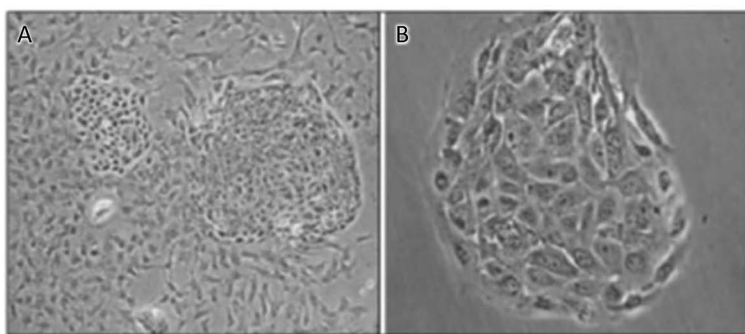


Figure 7. Morphology and proliferative potential is preserved in the primary mammary gland cell cultures. Epithelial cells build islands surrounded by myoepithelial cells (A). Morphology of epithelial cell colony resembles alveolar structures in the mammary gland (B).

The transcriptomic analysis in different time points after infection, revealed the most significant differentially expressed genes after infection and their expression profile in time (Ogorevc et al., 2017). The use of primary cell cultures derived from local breeds for *in vitro* studies allows us to perform experiments which would be not *possible in vivo* due to animal welfare issues, scarce animal resources and disturbing environmental effects.

Acknowledgement:

The research was funded by the research project grant no. P4-0220 and research project J4-1768 by the Slovenian Research Agency.

REFERENCES

1. Barbato M., Hailer F., Orozco-terWengel P., Kijas J., Mereu P., Cabras P. et al. 2017. Genomic signatures of adaptive introgression from European mouflon into domestic sheep. *Scientific reports*, 7: 7623. doi:10.1038/s41598-017-07382-7.
2. Bojkovski D., Štuhec I., Kompan D., Zupan M. 2014. The behavior of sheep and goats co-grazing on pasture with different types of vegetation in the karst region. *Journal of Animal Science*. 92:2752–8. doi:10.2527/jas2013-7199.
3. Ćinkulov M., Popovski Z., Porcu K., Tanaskovska B., Hodžić A., Bytyqi H. et al. 2008. Genetic diversity and structure of the West Balkan Pramenka sheep types as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 125: 417–26.
4. Ivankovic A., Dovc P., Kavari T., Caput P., Mioc B., Pavic V. et al. 2005. Genetic characterisation of the Pag island sheep breed based on microsatellite and mtDNA data. *Small ruminant research*. 57, 2-3:167-74.
5. Kompan D., Zagožen F. 1990. Selekcija oplemenjene jezersko-solčavske ovce. *Sodobno kmetijstvo*, 22, 11, 478-81.
6. Markovic B., Dovc P., Markovic M., Radonjic D., Adakalic M., Simcic M. 2019. Differentiation of some Pramenka sheep breeds based on morphometric characteristics. *Archives Animal Breeding*, 62, 393–402.
7. Nijman I., Rosen B.D, Bardou P., Faraut T., Cumer T, et al. 2022. Geographical contrasts of Y-chromosomal haplogroups from wild and domestic goats reveal ancient migrations and recent introgressions. *Molecular Ecology*, 17 p., doi:ff10.1111/mec.16579ff.
8. Pogorevc N., Simčič M., Khayatzadeh N., Sölkner J., Berger B., Bojkovski D. et al. 2021. Post-genotyping optimization of dataset formation could affect genetic diversity parameters: an example of analyses with alpine goat breeds. *BMC Genomics*. 22:546.
9. Prpar S., Martignani E., Dovc P., Baratta M. 2012. Identification of Goat Mammary Stem/Progenitor Cells. *Biology of reproduction*. 86; 4, 117.
10. Rustempašić A., Dokso A., Zečević E., Hodžić A., Hrković-Porobija A., Sarić Z. et al. 2018. Polymorphism of B-lactoglobulin in Pramenka breed sheep in Bosnia and Herzegovina. *The Journal of Animal and Plant Sciences*. 28(1).
11. Siasiou A., Galanopoulos K., Mitsopoulos I., Ragkos A., Laga V. 2018. Transhumant Sheep and Goat Farming Sector in Greece. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 8(4), 615-22.
12. Žan Lotrič M., Gorjanc G., Kompan D. 2013. Geographical distribution of sheep and goat breeds in Slovenia. *Slovenian Veterinary Research*. 50(4): 183-91.

**SHEEP AND GOAT BREEDING IN THE REPUBLIC OF CROATIA –
BREEDING AND HERD HEALTH CHARACTERISTICS**

**OVČARSTVO I KOZARSTVO U REPUBLICI HRVATSKOJ –
UZGOJ I ZDRAVSTVENI STATUS STADA**

***Antun Kostelić¹, Sofija Džakula², Miroslav Benić³, Velimir Sušić⁴,
Marko Samaradžija⁴***

Summary

In the Republic of Croatia over 645000 heads of sheep and 86000 goats are being bred. Breeding is based on native breeds while imported breeds are much less present. The primary breeding goal is lamb and kid meat production whereas milk production is represented by less than 10% of the population. The native breeds are kept exclusively extensively unlike imported breeds which are kept intensively in equal measure for both meat and milk production. It is precisely milk production which has great potential based on the fact that the redemption price of sheep milk in Croatia is among the highest in the World. Diseases which impact herd health are conditioned by breeding technology and area. In extensive keeping they are parasitic diseases and in intensive keeping those connected to mistakes made in nutrition or housing. As for infectious diseases the following appear in equal measure: enterotoxemia, contagious ecthyma, listeriosis, Q fever, caseous lymphadenitis, actinobacillosis and bluetongue disease. In goat herds Caprine Arthritis Encephalitis (CAE) poses the greatest problem. The virus was confirmed in all goat herds. More attention to timely diagnosis of diseases which threaten herd health and preventive measures should be provided in the long-term.

Key words: Croatia, diseases, goat, herd health, sheep

Kratak sadržaj

U Republici Hrvatskoj se uzgaja preko 645 000 ovaca i 86 000 koza. Uzgoj se zasniva na autohtonim rasama, dok su inostrane rase znatno manje prisutne. Osnovni cilj uzgoja je proizvodnja mesa od jagnjadi i jaradi, dok je proizvodnja mleka zastupljena u manje od 1 procenata populacije. Autohtone rase se isključivo gaje ekstenzivno, za razliku od stranih, koje se uglavnom intenzivno drže i u proizvodnji mesa i mleka. Proizvodnja mleka ima veliki potencijal, čemu u prilog govori i činjenica da je otkupna ce-

¹University of Zagreb, Agriculture Faculty, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, R. Croatia

²University of Leipzig, Veterinary Faculty, An den Tierkliniken 11, 04103, Leipzig, Germany

³Croatian Veterinary Institute, Savska cesta 143, 10000 Zagreb, R. Croatia

⁴University of Zagreb, Veterinary Faculty, Heinzelova ul. 55, 10000 Zagreb, R. Croatia

*Corresponding author: akostelic@agr.hr

na ovčjeg mleka u Republici Hrvatskoj među najvišima u svetu. Bolesti koje ugrožavaju zdravlje stada su uslovljene područjem, tehnologijom uzgoja i smeštajem. U ekstenzivnom načinu držanja to su parazitske bolesti, a u intenzivnom one, koje se odnose na greške u ishrani i smeštaju. Među zaraznim bolestima u stadima se podjednako pojavljuju enterotoksemija, infektivni ektim, listerioza, Q groznica, kazenozni limfadenitis, aktinobaciloza i bolest plavog jezika. U uzgoju koza, najveći problem je artritis - encefalitis koza. Utvrđeno je prisustvo virusa u svim stadima koza. Dugoročno, više pažnje treba posvetiti pravovremenom otkrivanju bolesti koje ugrožavaju zdravlje stada, kao i merama koje možemo preduzeti da ih sprečimo.

Ključne reči: bolesti, Hrvatska, koze, ovce, zdravlje stada

INTRODUCTION

Sheep and goat breeding in Croatia has a long-standing tradition. The population counts more than 654 000 sheep and around 86 000 goats. Breeding is based on native breeds whereas imported breeds are present in much fewer numbers. In some areas, like coastland and the islands, sheep breeding is the primary livestock production. The largest goat population is also located on the coastal area, that is in Dalmatia. The main breeding goal is meat production, i.e. lambs and kids for slaughter. Milk production is much less represented although in the last couple of years it has become very lucrative, especially in sheep farming. It is presumed that less than 10% of the sheep and goat population is included in milk production even though the potential is great. As mentioned, the majority are native breeds which demonstrate modest production traits in context of fertility and milk production. Those breeds are kept extensively and they are in pasture for most part of the year. Imported breeds are kept in intensive conditions on the mainland and for milk production. During the last twenty years considerable amount of research with the main objective being determination of diseases threatening herd health had been conducted in Croatia. It was determined that herd health is conditioned by the area and breeding technology. Considering it is predominantly extensive keeping sheep and goat herd health is frequently threatened by internal and external parasite invasions. In intensive production herd health is conditioned by nutrition quality and housing, followed by conducting preventive veterinary measures such as vaccination or administration of vitamin- mineral preparations.

MATERIALS AND METHODS

Characteristics of sheep and goat breeding in Croatia will be shown in this paper based on data obtained from the Croatian Agency for Agriculture and Food (HAPIH, 2022) as well as scientific and research projects connected to herd health in Croatia conducted over the last 20 years. Apart from anamnesis, clinical examination, autopsy, coprology and seratology examination, PCR, bacteriology, and other accredited methods have been used for diagnosis.

SHEEP AND GOAT BREEDING IN CROATIA

Breeding is mostly based on native breeds: Dalmatia pramenka, Lika pramenka, cigaja, Dubrovnik ruda, Istria sheep, than on the islands Cres, Krk, Rap and Pag sheep. In the continental part Dalmatia pramenka is the most common breed, and while Pag sheep prevails on the islands (HAPIH, 2022). Imported breeds are represented by Lacaune, Romanov sheep, East-friesian, Ille de france, Merinolandschaf, Suffolk, Travnik pramenka and Texel. As for goat farming, the Croatian coloured goat is the most common, whereas the Croatian white and Istrian goat are on the brink of extinction. Goat milk production is based mostly on Alpine goats and much less on the Saanen goat breed. Native breeds are kept exclusively in extensive conditions whereby the herds are in pastures from spring to fall, while during winter they are in barns being fed hay and in smaller amounts grain, most commonly corn. What is interesting is that sheep on the islands are kept in open pastures throughout the year thus being exposed to different weather conditions. As stated, over 90% of sheep and goats are intended for meat production, i.e. lamb and kids for slaughter. Considering they are native breeds fertility is modest and spans from 1,1 to 1,2. A part of the sheep and goat population is included in productivity control (foundation stock) conducted by HAPIH. The control incorporates not only standard values like fertility, birth weight, milkability and milk composition but also genotyping as a way of increasing genetic advancement. Over 2 million kilograms of sheep milk and a bit less of goat milk is produced annually in Croatia. Milk production in the continental region is based on imported breeds such as the Lacun, East-friesian and Travnik sheep. The interest for the Lacun breed has been on the rise in the last couple of years as the breed has shown excellent capacity for acclimatization to different climate areas, a relatively high milkability and fertility. Croatia is one of the leading countries in sheep milk redemption prices as it now stands at 1,3 Euro, while on the Pag Island the price is even higher at 1,8 Euro. The Pag Island is a positive example of sheep breeding as there are 30 000 sheep in a very scarce environment, 2/3 of which are being milked.



Figure 1. *Kras pasture on Pag*

Considering the high redemption price of milk and cheese the lambs are slaughtered at a very young age and with a low body weight of 4 to 8 kilograms. All the milk is used in cheese production. The majority is produced in three cheese factories, and a significantly smaller amount is produced on farms. 200 to 300 tonnes of Pag Island cheese are produced yearly. As stated, sheep breeding on Pag Island is based on extensive keeping in areas dominated by karst pastures and weather extremes like strong winds („bura“) and hot summer months. Lactation starts in December and January and lasts until end of June. Considering the scarce vegetation the breeders add feed like hay, grain, and premix feed throughout the year, especially before and during lactation.

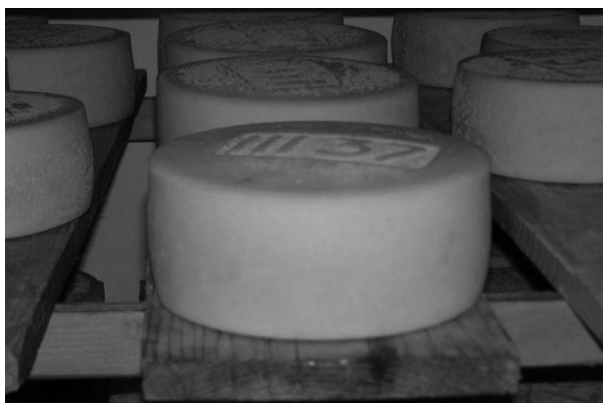


Figure 2. Pag cheese

It is worth mentioning that sheep and goat breeders are organised in breeding societies in most Counties and together form the Breeding Alliance of Croatia. The Alliance represents their common interests, organises educations and prints specialised literature, such as Sheep-goat magazine. To better improve sheep and goat breeding there is an annual two-day education event where experts in breeding technology, nutrition, selection, milk production, milk processing and herd health give lectures to breeders.

SHEEP AND GOAT HERD HEALTH IN CROATIA

As noted, during the last 10 years many studies about sheep and goat health threatening diseases have been conducted in Croatia. By becoming part of the EU Croatia has also taken on the responsibility of tracking and eradicating certain disease (One Health program). An example of that is sheep and goat brucellosis which is currently not present in Croatia due to systematic diagnosis on sheep and goat herds in whole, whereby all positive herds were culled. In context of herd health, it is important to consider housing and the area they are kept in. Considering the sheep and goats are kept extensively, diseases which threaten

herd health are connected to that way of keeping. They are primarily parasitic diseases. Certain internal and external parasite invasions are connected to the area where the animals are kept. For example, *Fasciola hepatica* invasions can be found on limited areas since the development cycle is connected to the freshwater snail. Unlike the *F. hepatica* invasion, the *Dicrocoelium dendriticum* can be found in all parts of Croatia, especially on the islands. Apart from liver flukes herd health is threatened by a whole array of intestinal and lung parasites. Since the breeds in question are mostly native breeds which have developed a certain amount of resilience the loss is usually apparent in lower milk production and body weight. Rare are cases of mass death as result of severe parasite invasions. Parasite control is conducted in a templated manner and not based on results gained through coprology test. Interestingly, the Ministry of Agriculture provides financial support to most sheep and goat breeders in an animal welfare context conditioning them to perform a bi-yearly coprology analysis in their herds. Regardless of the measure mentioned, parasite control is still conducted non-professionally. Mange is occasionally present as one of external parasitic diseases the source of which are usually newly bought breeding rams and bucks. Considering the extremely extensive way of keeping on the Pag Island part of the sheep are not managed by the breeders and the mange issue is constantly present (Kostelić et al, 2016). Apart from mange, herd health is threatened by tick invasions, especially on the coast and the islands.



Figure 3. Tick infestation (Sheep ear)

Apart from potentially being carriers of different infectious and parasitic diseases they are also a threat for lamb and goat kid health (tick paralysis). Much like control of internal parasites, control of external parasites is also difficult. The reasons are many, from lack of medicine to specific areas which enable constant presence of certain parasites such as ticks. Herds kept in pastures with shrubbery are permanently exposed to severe tick invasions. Coccidiosis is a disease worth mentioning in intensive breeding environments (Kostelić et al, 2019), whereby it is most common in goat kids, although cases have been reported in extensive

breeding as well. Coccidiosis occurs as consequence of bad housing hygiene and nutrition as well as abrupt changes in feed stuff. Apart from lack of drugs the problem in internal and external parasite control lies in the fact that most drugs cannot be used on animals whose milk or meat is meant for human consumption.

Sheep and goat herd health in Croatia is threatened by a whole array of other diseases. Certain diseases are constantly present and others appear periodically depending on series of factors. Foot rot is a permanently present disease in some areas while it does not appear on the islands, except for a small part on Krk Island. Diseases which appear in herds from time to time are enterotoxemia, contagious ecthyma, listeriosis, Q fever, caseous lymphadenitis, actinobacillosis and bluetongue disease. The diseases listed occur in both sheep and goats. In the last 10 years many studies were conducted whereby the main problem of herd health and milk production was determined to be Caprine Arthritis Encephalitis (Kostelić et al, 2013). The virus was found in every goat herd in different areas of Croatia (n=50), the prevalence was around 100%. Clinical form of the disease was present in over 30% of the population (Figure 4). Some breeders implemented separating kids from goats and feeding milk supplement using buckets or automatic milk feeder as a method of CAE control. Benefits of this method are multiple as not only less animals are infected with CAE but also fewer goats got clinical mastitis and fewer kids got coccidiosis. Furthermore, feeding goat kids milk supplement proved to be less expensive than feeding goat milk. As parturition is usually in winter months using heaters proved to be beneficial for kid growth and health.



Figure 4. *Caprine arthritis encephalitis*

Although the virus and the damage it does in milk production was proven there is no program for control or eradication to date in Croatia (Kostelić et al, 2018). Supporting this is the fact that infected animals are free to move which greatly lead to the disease spreading. In intensive milk production only highly productive breeds are used (Lacaune, Alpine and Saanen breed) so disruptions caused by mistakes regarding nutrition occur frequently. Ketosis occurs occasionally in goats and pregnancy toxemia in sheep. In both cases the disease is caused by surplus of energy in meals which is manifested by obesity in the last

trimester of gravidity. Due to large amounts of premix feeds being used in the last couple of years there have been instances of copper poisonings in flocks of highly productive sheep. As consequence of abrupt inclusion of concentrated feed in a meal occasionally rumen acidosis occurs which apart from diarrhoea sometimes can cause death. Listeriosis occurs more frequent in goats than in sheep and the source of the disease comes from contaminated haylage. Even though haylage is an excellent feed stuff for sheep and goats, due to mistakes made in preparation, primarily contamination with dirt and by not using inoculants, the risk of disease is considerably higher.

CONCLUSION

Sheep and goat breeding has a high potential for growth and development in Croatia, especially milk production. By becoming part of EU grants for such production development became available. Herd health is most threatened by mistakes made in breeding technology and failure to conduct preventive veterinary measures. Breeding technology and veterinary preventive measure programs should be adapted to breed, area of keeping and diseases characteristic for such production. Furthermore, attention should be given to early disease diagnostics which threaten both herd and human health, such as listeriosis. Limiting factor in control and treatment is lack of drugs such as anthelmintics and antibiotics which are not prohibited for use in animals whose milk is meant for human consumption, thus attention should be focused on preventive measures. In goat milk production a high percentage of animals is infected with CAE virus which significantly limits development of milk production. Due to climate change the risk of sheep and goat diseases which are not characteristic for certain areas will be on the increase, such as blue tongue disease. In the long-term greater attention should be focused on timely disease detection to prevent spreading to larger areas, as well as drug development (vaccines) to prevent them with.

REFERENCES

1. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (2022): Ovčarstvo, kozarstvo i male životinje. Godišnje izvješće 2021. 2. Kostelić A., Roić B., Cvetnić Ž., Tariba B., Kiš T., Štoković I. i sur., 2013. Artritis encefalitis koza u Hrvatskoj. Znanstveno-stručni skup Veterinarski dani. Zbornik radova. Opatija 9.-12. listopada. 127-32. 3. Kostelić A., Marinculić, A., Beck R., Kiš T., Bagović P. 2016. Bolesti kože izvornih pasmina ovaca na jadranskim otocima. 6. Hrvatski Veterinarski Kongres sa međunarodnim sudjelovanjem. Opatija, 26.-29.10.2016. Zbornik radova. 273-81. 4. Kostelić A., Roić B., Šoštarić B., Mulc D., Cvetnić Ž., Habrun B., Bagović B. (2018): Utjecaj iskorjenjivanja artritis encefalitisa koza na zdravlje stada i tehnologiju uzgoja. 53. hrvatski i 13. međunarodni simpozij agronoma. Sažetak. eZbornik sažetaka. 5. Kostelić A., Salajpal K., Mioč B., Martinić O., Jarnjak M., Džakula S., Mikecin M., 2019. Utjecaj smještaja i hranidbe na zdravlje janjadi od poroda do odbića. 54th Croatian & 14th International Symposium on Agriculture. February 17 -22, 2019, Vodice, Croatia. 198-9.

MOGUĆNOST UNAPREĐENJA OVČARSKE PROIZVODNJE NA SJENIČKO-PERŠTERSKOJ VISORAVNI

*Elmin Tarić, Zsolt Besckei, Ružica Trailović, Mila Savić,
Vladimir Dimitrijević*

Kratak sadržaj

U celom svetu ovčarska proizvodnja ima trend rasta. U okviru EU strategije, u ovčarskoj proizvodnji se fokus sa intenzivnih, usmerava ka samoodrživim sistemima, koji omogućavaju jačanje „ekosistem servisa“, doprinoseći konzervaciji prirodnih resursa i proizvodnji brendova sa zaštitom geografskog porekla, što direktno utiče na promociju i razvoj regiona. Sjenica i teritorija Pešterske visoravani je region visoke prirodne vrednosti (HNV), velikog potencijala za razvoj stočarstva. Od posebnog značaja je interakcija autohtone sjeničke ovce u tradicionalnim staništima, uz specifični biodiverzitet travnjaka, koji proizvodi daje specifične odlike. Pešterska visoravan ima veoma dugu tradiciju uzgoja ovaca, a proizvodi su na osnovu kvaliteta postali poznati i prepoznatljivi u regionu i u svetu. U svetlu zahteva potrošača, usmerenim za dobijanje animalnih proizvoda dodate vrednosti, region ima veliki potencijal za razvoj ovčarske proizvodnje. Sjenica spada u IV grupu devastiranih područja i migracija radno sposobnog stanovništva je u ovom kraju negativno izražena. Na teritoriji opštine Sjenica, u 101 naselju, sa prosečnom gustinom naseljenosti od svega 24 stanovnika na km² ova opština je, u poređenju sa ostalim opštinama na jugozapadu Republike Srbije, najređe naseljena. Privreda je nedovoljno razvijena, veoma oskudna i loše razvijena. Preko 54 procenata stonovništva se bavi nekim vidom poljoprivredne proizvodnje što jasno ukazuje na činjenicu i potencijal koliko je poljoprivreda važna u ruralnom razvoju. Opština Sjenica raspolaže sa 105 159,5 ha poljoprivrednog zemljišta. U strukturi zemljišta dominiraju prirodne livade i pašnjaci (oko 45 000 ha) uz malo prisustvo obradivog poljoprivrednog zemljišta (16 208 ha), na kojima dominira proizvodnja žitarica i krmnog bilja za potrebe stočarstva. Većina poljoprivrednih gazdinstava ima zastarelu mehanizaciju. U radu se analiziraju prednosti, slabosti, mogućnosti i pretnje (SWOT analiza) u organizaciji organske proizvodnje u ovčarstvu, kako bi se na terenu primenile neophodne mere za organizaciju novog proizvodnog sistema kao i ostvarenja plana razvoja opštine koji je donet za period od 2020 do 2028 godine.

Ključne reči: organska proizvodnja, ovčarstvo, Sjenica, sjeničko– pešterska visoravan

¹Dr vet. Elmin Tarić, asistent; dr sci. vet. med. Zsolt Besckei, docent; dr sci. vet. med. Ružica Trailović, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Mila Savić, redovni profesor; dr sci. vet. med. Vladimir Dimitrijević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

*e-mail autora za korespondenciju:: elmin.taric@vet.bg.ac.rs

UVOD

Peštarska visoravan se nalazi na jugozapadnom delu Srbije čiji najveći prostor zauzima teritorija opštine Sjenica. Nazivi peštarske visoravni i Sjenice su proistekli iz prirodnih karakteristika, Pešter po prirodnim vrtačama, podzemnim, vodotocima i pećinama, a Sjenica po obilnim količinama sena. Sjeničko-peštarska visoravan predstavlja slabo obrađeno i nenastanjeno područje. Nju karakterišu oštra klima i velika nadmorska visina koja ne pogoduje razvoju zemljoradnje. Međutim, ovakve prirodne odlike omogućavaju formiranje ogromnih i bogatih pašnjaka sa kvalitetnom travom koja pogoduje stočarskoj proizvodnji. Intenzifikacija poljoprivredne proizvodnje (ratarske i stočarske) donose korist ljudskom društvu, međutim uočeni su i negativni efekti ove proizvodnje. Osnovni negativni efekti koji prate konvencionalnu intenzivnu poljoprivrednu proizvodnju se ogledaju u eroziji zemljišta i biodiverziteta i prisustvu rezidua antibiotika i hemijskih proizvoda za zaštitu bilja. Nasuprot intenzivnoj proizvodnji, organska proizvodnja se oslanja na poluintenzivne sisteme, rotacije kultura, prirodne biljne resurse, ispašu, skloništa za slučaj nepogoda i kombinovano držanje više vrsta domaćih životinja. Ovakva proizvodnja je u osnovi agroekološka i doprinosi humanizaciji prostora u savremenom svetu. Osnovna ideja organske proizvodnje je bazirana na tezi da eksploataciju treba prilagoditi prirodnim uslovima i omogućiti normalan oporavak staništa. Biodinamička poljoprivreda i stočarstvo se nazivaju i samoodrživim sistemima. Ovakva proizvodnja zahteva povećanu radnu snagu za 10-15 procenata, što povećava i troškove, ali u isto vreme, obezbeđuje i veću zaposlenost i umanjuje efekte depopulacije (Jovanovic i sar., 2010). Poljoprivreda u brdsko-planinskim područjima ima uslove da se razvije i da zadovolji sve veće zahteve potrošača uz povezivanje proizvođača i potrošača hrane. Osnova razvoja ovog područja mora da bude u funkciji ukupnog razvoja poljoprivrede, sela, zaštite životne sredine, očuvanja prirodnih bogastava, povećanja prihoda gazdinstvima i zadržavanja stanovništva na ovom području. Agronomski i agroekološki sistem poljoprivrede doprinosi očuvanju lokalne tradicionalne poljoprivrede. Termini „ekološka poljoprivreda“, „ekološka hrana“, „ekološki principi“ i „održiva poljoprivreda“, ukazuju da je došlo vreme da se prestane sa daljim urušavanjem, degradiranjem i zagađivanjem zemlje, vode i hrane (Lazarevic, 2006).

Cilj ovog rada je bio da pomoću SWOT analize ukažemo na potencijal i resurse sjeničko-peštarske visoravni kao i probleme koji utiču na unapređenje ovčarske organske proizvodnje.

MATERIJAL I METODE

Shodno cilju rada, radi sagledavanja snaga i slabosti ruralnog područja sjeničko-peštarske visoravni u Republici Srbije, kao i šanse i opasnosti iz okruženja, korišćena je SWOT analiza. Kroz primarna i sekundarna istraživanja utvrđena je društveno-ekonomska situacija i ukazano je na strateške korake koje treba preduzeti u cilju obnove, promocije i mogućnosti održanja ovčarske proizvodnje. Ta-

kođe je korišćena stručna relevantna literatura i zvanične statističke publikacije i metod deskripcije u cilju detaljnog opisivanja važnih činjenica koje se odnose na istraživačko područje.

REZULTATI I DISKUSIJA

Prirodni i ljudski resursi na prostoru sjeničko-peštarske visoravni

Sjeničko-peštarska visoravan obiluje dobrim prirodnim resursima. Hidrološka mreža je razvijena sa dobro očivanim vodotokovima i predstavlja svestran potencijal, koji je od velikog značaja za razvoj organske stočarske proizvodnje. Na teritoriji opštine Sjenice se nalaze dva rezervata i dva parka prirode, koja su zaštićena od strane države i predstavljaju značajan resurs i potencijal za razvoj turizma. Šume pokrivaju 27 procenata teritorije opštine Sjenica. Na teritoriji opštine postoji 5 910 gazdinstava. Osnovna grana poljoprivrede je stočarstvo kojim se bavi čak 4 246 od 5 910 gazdinstava na području Sjenice što ovu delatnost stavlja na važno mesto po gajenju goveda i ovaca. Od ratarskih kultura su najzastupljenije žitarice i krmno bilje, što se podudara sa potrebama stočarske proizvodnje. U okviru raspodele poslova po polovima, žene značajno učestvuju u radu na gazdinstvima ali ne i u upravljanju. Na osnovu popisa, veliki broj gazdinstava se bavi drugom profitabilnom aktivnošću pored primarene poljoprivredne proizvodnje – 1963, ali samo 273 gazdinstva ostvaruju 50 procenata ili više ukupne zarade, od nepoljoprivrednih delatnosti. Najveći broj se bavi preradom mleka i mesa (RZZS, 2020; Plan i razvoj Sjenice 2020-2028). Ekonomska nerazvijenost ovog kraja je rezultirala očuvanjem zdrave životne sredine i nenarušavanjem prirodnih lepota ovog kraja. Interakacija životne sredine i genotipova autohtonih ovaca pramenke došla je je do izražaja u evolutivnoj adaptaciji sojva ovaca, što predstavlja jedan od stubova u izboru odgovarajućih rasa za organsku proizvodnju (Savic i sar., 2013; Savic i sar., 2011). Sjenička pramenka je najzastupljenija autohona ovca na području visoravni kao i melezi dobijeni ukrštanjem merino rase, viremberga i il de fransa kako bi se poboljšale karakteristike mesnatosti i kvaliteta vunskog vlakna. Dobro organizovan rad veterinarskih službi na terenu je od velikog značaja za uspešno organizovanje i sprovođenje organske proizvodnje u skladu sa zakonom o organskoj proizvodnji. Zdravstvena zaštita stoke na prostoru Sjenice se vrši od strane četiri veterinarske stanice. Ukupan stočni fond na osnovu popisa iz 2012. godine iznosi oko 102 000 grla, od čega ovce učestvuju sa oko 30 000 grla. U odnosu na 2008. godinu, zabeleženo je znatno povećanje broja ovaca koje je iznosilo 18 946 grla. Primera radi, 1991. godine se gajilo 42 104 grla ovaca. U odnosu na desetogodišnji prosek (2011–2020), ukupan broj ovaca je za 1,8 procenata veći (RZZS, 2022). Na osnovu uredbe o raspodeli podsticaja u poljoprivredi i ruralnom razvoju u 2022. godini, podsticaj za tov junadi, jagnjadi, jaradi i svinja je iznosio 3 146 479 000 dinara, a za kvalitetna matična grla država je izdvojila 6 920 000 000 dinara. Na području Sjenice je osnovan Regionalni centar za razvoj poljoprivrede i sela sa ciljem da pomogne poljoprivrednicima i poljopri-

vrednim preduzećima kroz pružanje usluga koje unapređuju efikasnost tržišta i postepeni ekonomski oporavak poljoprivrednog sektora.

Slabosti u organskoj ovčarskoj proizvodnji

U organizovanju organske poljoprivrede postoji veliki broj problema, uprkos značajnim prirodnim resursima. Klima je promenljiva, a leta se odlikuju povremenim sušama i neujednačenim padavinama. Zime su duge i hladne, a u poslednjih par godina nemaju konstantan snežni pokrivač. Sjenica spada u IV grupu devastiranih područja i migracija radno sposobnog stanovništva je, u ovom kraju, negativno izražena. Na teritoriji opštine Sjenica, u 101 naselju, sa prosečnom gustinom naseljenosti od svega 24 stanovnika na km² ova opština, u poređenju sa ostalim opštinama na jugozapadu Republike Srbije, je najređe naseljena. Privreda je nedovoljno razvijena, oskudna i loše razvijena. Preko 54 procenata stanovništva se bavi nekim vidom poljoprivredne proizvodnje što jasno ukazuje na to koliko je ona važna u ruralnom razvoju. Opština Sjenica raspolaže sa 105 159,5 ha poljoprivrednog zemljišta. U strukturi zemljišta dominiraju prirodne livade i pašnjaci (oko 45 000 ha) uz malo obradivog poljoprivrednog zemljišta (16 208 ha), na kome dominira proizvodnja žitarica i krmnog bilja za potrebe stočarstva. Većina poljoprivrednih gazdinstava ima zastarelu mehanizaciju, a saobraćajna infrastruktura zaostaje u razvoju. Gustina putne mreže je relativno mala u opštini Sjenica i iznosi 0,45 km puta na km². Regionalna mreža puteva učestvuje sa oko 28 procenata u ukupnoj dužini puteva. Svega oko 30 procenata regionalnih puteva je pokriveno asfaltom. Preko teritorije opštine Sjenica prolazi deo železničke pruge Beograd-Bar, međutim opština nema dobru putnu povezanost sa železničkom prugom, a ni železničku stanicu, tako da mogućnost korišćenja železničkog saobraćaja ne postoji. Sela su povezana lokalnom putnom mrežom sa opštinom, koja je u lošem stanju (Plan i razvoj opštine Sjenica 2020-2028; Turković, 2010). Prerađivački kapaciteti nisu u funkciji od raspada zadrugarstva u Srbiji devedesetih godina, tako da kombinat PIK „Pešter“ nije u funkciji više od dve decenije. Prerađivački kapaciteti su oslonjeni na imanja zemljoposjednika i nekoliko klanica i mlekara koje se nalaze u privatnom vlasništvu. Mali posedi, neadekvatna mehanizacija za pripremu stočne hrane i mužu, dodatno otežavaju proizvodnju. Kupovna moć, nizak standard i loše kupovne navike zauzimaju važno mesto u razvoju organske proizvodnje.

Mogućnosti i razvoj ovčarske organske proizvodnje

Sjeničko-peštarska visoravan je na tržištu prepoznatljiva po svojim poljoprivrednim proizvodima i turističkim mestima. Duga tradicija stočarske proizvodnje i kvalitet proizvoda su postali poznati. Kvalitetni, zdravi i bezbedni proizvodi animalnog porekla predstavljaju osnov u favorizovanju organske proizvodnje u cilju zaštite speifičnosti i ukusa tradicionalnih proizvoda animalnog porekla. Sjenica ima značajne konkurentske prednosti u oblasti prerade hrane u odnosu na druge

lokalne samouprave, kao što su: značajna i kvalitetna sirovinska baza zasnovana na razvijenom stočarstvu, zaštićeno geografsko poreklo brojnih proizvoda kao što su sjenički ovčiji i kravlji sir i sjenička jagnjetina. Postoji i Regionalni centar za razvoj poljoprivrede koji uspostavlja infrastrukturu za kontrolu kvaliteta.

Uvođenje standardizovanih mera u ovčarstvu, pripremi i preradi animalnih proizvoda, unapređenje veterinarsko-sanitarne zaštite u cilju smanjenja rizika po higijenu proizvoda i očuvanja sirovina, može doprineti prometu standardizovanih i kontrolisanih proizvoda animalnog porekla. Poseban akcenat treba staviti na stvaranje prepoznatljivih regionalnih proizvoda i njihovo organizovano učešće i promociju na tržištu. Povećanje konkurentnosti se može postići poboljšanjem kvaliteta poljoprivrednih proizvoda sa dodatom vrednošću, kao što su organski proizvodi. Razvoj organske stočarske proizvodnje, kroz kontinuiranu edukaciju poljoprivrednika, modernizaciju stočarske proizvodnje i uključivanje u proizvodnju visokokvalitetnih priplodnih životinja, povećao bi zapošljavanje mladih u stočarstvu i podstakao održivi ruralni razvoj opštine Sjenice. Pravovremene prijave i konkurisanje za finansiranje, stipendiranje i obuku kadrova su planski pristup organizaciji i upravljanju, dugoročno dobrom, stočarskom proizvodnjom. Udruživanje proizvođača bi omogućilo lakši pristup razvojnim fondovima, sprovođenje programa ruralnog razvoja uz jačanje regionalne povezanosti.

Opasnosti za organsku ovčarsku proizvodnju

U opštini Sjenica postoji velika potreba za modernizacijom tehnologije, efektivnom proizvodnjom i većom tržišnom orijentacijom. Aktuelni proces depopulacije ruralnih područja dovodi do nedovoljne eksploatacije prirodnih resursa, smanjenja populacije stočnog fonda i ostavljanja pašnjaka i livada neiskorišćenim. Najveći problem u kvalitetu pašnjaka i njihovoj degradaciji je prisustvo žbunja. To na kraju može dovesti do smanjenja površina za ispašu ako se njihov rast i širenje ne kontrolišu. Sadašnji proizvodni sistemi stočarske proizvodnje u opštini Sjenica, uglavnom ne obezbeđuju isplativu proizvodnju, pa je neophodno pristupiti njihovoj brznoj promeni. Rešavanje imovinskih pitanja i usitnjavanje poseda, predstavljaju takođe značajnu pretnju za organizaciju organske proizvodnje.

ZAKLJUČAK

Organska proizvodnja pruža priliku da se podstakne odgovarajuća zaštita zdravlja i dobrobiti životinja i da se promoviše maksimalna zaštita životne sredine. Edukacija proizvođača, udruživanje proizvođača i kreditiranje proizvodnje su pokretači razvoja stočarske proizvodnje u regionu. Povećanje poseda, postepenom izgradnjom objekata za preradu stočne hrane, dovelo bi do implementacije održive stočarske proizvodnje. Edukacija farmera i podsticanje porodičnih farmi koje se bave uzgojem ovaca da započnu proces prelaska na sistem organske proizvodnje je jedan od načina za revitalizaciju regiona. Proizvodnja organskih

proizvoda može dovesti do značajnog doprinosa ruralnom razvoju i promociji čitavog regiona.

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbija (Ugovor broj 451-03-68/2020-14/200143).

LITERATURA

1. Jovanovic S., Savic M., Trailovic R. 2010. Tradicija i budućnost stočarstva u brdsko planinskom području sa posebnim osvrtom na sjeničko peštarsku visoravan, Zbornik radova. 22-4. 2. Lazarević R. 2006. Kako brže do profitabilnog stočarstva. Vizartis, Beograd, pp. 245. 3. Plan i razvoj Sjenice 2020-2028, <http://sjenica.rs/dokumenti/Plan%20razvoja%20opstine%20Sjenica%202020-2028.pdf> 4. Republički zavod za statistiku, 2012, Popis poljoprivrede 2012. godine u Republici Srbiji – konačni rezultati. Preuzeto sa <http://webzrs.stat.gov.rs/WebSite/public/PublicationView.aspx?pKey=41&level=1&pubType=2&pubKey=2106>, 2014 Oct 30. 5. Republički zavod za statistiku, 2022, <https://www.stat.gov.rs/sr-Latn/oblasti/poljoprivreda-sumarstvo-i-ribarstvo/stoccarstvo> 6. Savic M., Aleksic S., Živkovic D. 2013. Breeds of choice in organic production systems. Proceedings of the 10 th International Symposium Modern Trends in Livestock Production 298-306, Invited paper, 2-4. October, Belgrade. ISBN 978-86-82431-69-5. 7. Savic M., Jovanovic S., Trailovic R., Dimitrijevic V., Dimitrijevic B. 2011. Autochtonous breeds as livestock potential in sustainable farming in Serbia. In: Proceedings of the 19th International Congress of Mediterranean Federation of health and production of ruminants, 25-28 May, Belgrade, 16-22. 8. Turkovic M. 2010. Tradicija i budućnost stočarstva u brdsko planinskom području sa posebnim osvrtom na sjeničko peštarsku visoravan, 22-4. Zbornik radova.

UTICAJ RAZGRADIVOSTI PROTEINA HRANE NA TOVNE I KLANIČNE REZULTATE TOVLJENE JAGNJADI ILE DE FRANCE RASE

Cvijan Mekić

Kratak sadržaj

Savremeni koncepti normiranja obroka za preživare zasnivaju se na tačnom utvrđivanju količine razgradivih i nerazgradivih proteina. Optimalni odnos razgradivih i nerazgradivih proteina u obroku preživara neophodan je u cilju podmirenja potreba mikroflore buraga za azotnim materijama, ali i podmirenja potreba samog organizma preživara u proteinima. U radu su prikazani rezultati uticaja različitog udela nerazgradivog proteina (41:50:60 %) u ukupnom nivou proteina u obroku, u intenzivnom tovu jagnjadi, do devedeset dana uzrasta. Ogled je izveden sa tri grupe po 20 grla jagnjadi (10 muških i 10 ženskih). Tov je trajao 70 dana. Ishrana jagnjadi koncentratnim smešama i lucerkim senom je bila po volji. Statistička obrada dobijenih podataka urađena je primenom programskih paketa najmanjih kvadrata (Least Squares).

Jagnjad na tipovima ishrane I:II:III su ostvarila prosečne dnevne priraste od: 231:235:251 g. Konverzija hrane, suve materije, energije (NEM) i proteina (g) po kilogramu ostvarenog prirasta imala je tendenciju opadanja sa porastom udela nerazgradivih proteina u korišćenim smešama koncentrata. Utvrđene prosečne vrednosti za tretmane (I:II:III) su za suhu materiju iznosile: 2784:2725:2590 g/kg; energije (NEM) 17,44:17,02:16,40 MJ i za protein 359:345:338 g. Randman toplog trupa sa glavom i iznutricama prosečno je iznosio 54,16:56,54:57,36 %. Prinos mesa prve kategorije bio je 41,62:42,63:42,01 %, druge kategorije 35,82:34,84:36,20 %, dok je udeo treće kategorije mesa bio 22,56:25,53:21,79 %. Povećanje udela nerazgradivog proteina u ukupnom nivou proteina u korišćenim smešama koncentrata dovelo je do većeg udela I i II kategorije mesa, a manjeg udela mesa III kategorije, u odnosu na masu rasecane polutke.

Pri sastavljanju obroka, važno je poznavati odnos razgradivog i nerazgradivog proteina, kako bi se obezbedila željena proizvodnja, odnosno sadržaj esencijalnih aminokiselina koje se ne mogu sintetisati u organizmu. Povećanje količine nerazgradivih proteina u obroku do utvrđene granice je jedan od najvažnijih uslova za veće dnevne priraste.

Ključne reči: dnevni prirast, jagnjad, kategorije mesa, konverzija hrane i hranljivih materija, randman mesa, razgradivost proteina

¹Dr Cvijan Mekić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, R. Srbije

*e-mail autora za korespondenciju: cvijan.mekic@gmail.com

INFLUENCE OF FEED PROTEIN DEGRADABILITY ON FATTENING AND SLAUGHTERING RESULTS OF ILE DE FRANCE BREED LAMBS

Cvijan Mekić

Summary

Modern concepts of rationing meals for ruminants are based on the exact determination of the amount of degradable and non-degradable proteins. The optimal ratio of degradable and non-degradable proteins in the ruminant meal is necessary in order to meet the needs of the rumen microflora for nitrogenous substances, but also to meet the protein needs of the ruminant organism itself. The paper presents the results of the influence of different proportions of non-degradable protein (41:50:60%) in the total level of protein in the meal in intensive fattening of lambs up to ninety days of age. lambs. The fattening lasted 70 days. The lambs were fed with concentrate mixtures and alfalfa hay as desired. Statistical processing of the obtained data was done using least squares software packages.

Lambs on diet types I:II:III achieved an average daily gain: 231:235:251 g. The conversion of food, dry matter, energy (NEM) and protein (g) per kilogram of gain had a tendency to decrease with an increase in the proportion of non-degradable proteins in the used concentrate mixtures. The determined average values for treatments (I:II:III) for dry matter were: 2784:2725:2590 g/kg; energy (NEM) 17.44:17.02:16.40 MJ; for protein 359:345:338 g. Randman of warm carcass with head and entrails averaged 54.16:56.54:57.36%. Yield of first category meat was 41.62:42.63:42.01% ; the second category 35.82:34.84:36.20%, while the share of the third category of meat was 22.56:25.53:21.79%. The increased share of non-degradable protein in the total protein level in the used concentrate mixtures led to a higher proportion of I and II category meat, and a smaller proportion of III category meat in relation to the mass of the cut half.

When preparing a meal, it is important to know the ratio of degradable and non-degradable protein, in order to ensure the desired production, that is, essential amino acids that cannot be synthesized in the body. Increasing the amount of non-degradable protein in the meal to the established limit is one of the most important conditions for greater daily gains.

Key words: *daily gain, feed and nutrient conversion, lambs, meat categories, meat yield, protein degradability*

KONCENTRACIJE TEŠKIH METALA U PRIRODNIM I SEJANIM TRAVNJACIMA

*Aleksandar Simić¹, Željko Dželetović², Gordana Andrejić²,
Ivan Gujaničić³*

Kratak sadržaj

Livade i pašnjaci su širom jugoistočne Evrope prepoznati kao jeftin i održiv izvor krme za goveda i još više, za ovce. Uglavnom su prirodnog porekla, a ređe su nastali sevtvom poželjnog sastava vrsta. Produktivnost travnjaka je izuzetno niska u odnosu na potencijal, a neke travne površine se razvijaju na podlogama sa visokim sadržajem teških metala.

Novija istraživanja izvedena na reprezentativnim prirodnim travnjacima u planinskom području centralnog Balkana su pratila hranljivi status površinskog i podpovršinskog sloja zemljišta, kao i moguće prisustvo teških metala (Ni, Cd, Pb i Cr). Istovremeno su analizirane i količine teških metala u biljnom materijalu. Uočeno je da u većini slučajeva nije bilo visokog sadržaja teških metala u zemljištu, izuzev na pojedinim lokacijama u zapadnoj Srbiji i to Ni i Cr. Čak i na takvim zemljištima je akumulacija teških metala u nadzemnom biljnom materijalu bila niska.

Sejani travnjaci su, kao biopokrivač tehnogenih zemljišta usled neobezbeđenosti ili nemara stočara, često izloženi ispaši ovaca ili goveda i potencijalnom unosu polutanata. Istraživanja, sprovedena na travama gajenim na podlozi sa visokim sadržajem As i Ni ukazuju da krma trava ne akumulira metale iznad toksičnog nivoa za ishranu ovaca. Ogledi u sudovima ukazuju da se visok sadržaj teških metala (Cu, Cd, Ni, Pb, Zn) u podlozi akumulira za 50-80 procenata više u korenu trava u odnosu na nadzemni deo. To ukazuje da trave imaju nisku translokaciju teških metala iz korena u nadzemne delovima biljke.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da je krma dobijena sa prirodnih livada na zemljištima sa povišenim koncentracijama teških metala zdravstveno bezbedna za korišćenje. Eventualna promena namene, prouzrokovala bi remećenje stabilnog statusa ovih zemljišta i veću pristupačnost teških metala.

Ključne reči: *kvalitet krme, livade, pašnjaci, teški metali*

¹Dr Aleksandar Simić, profesor, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Zemun, R. Srbija

²Dr Željko Dželetović, viši naučni saradnik; dr Gordana Andrejić, naučni saradnik, Institut za primenu nuklearne energije (INEP) Univerziteta u Beogradu, Zemun, R. Srbija

³Ivan Gujaničić, specijalista inženjer poljoprivrede, opština Čajetina, Čajetina, Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: alsimic@agrif.bg.ac.rs

UVOD

Livade i pašnjaci predstavljaju izvor jeftine stočne hrane koji se dobija košenjem ili ispašom. Oni mogu biti prirodnog porekla, ili ređe, sejani. Osnovu ovih travnjaka čine vrste iz familije trava (*Poaceae*), kao dominantne i edifikatorske vrste, te predstavljaju značajan izvor energije za životinje koje ih konzumiraju. Drugi važan činilac travnjaka su predstavnici familije leguminoza (*Fabaceae*), sa manjom zastupljenošću, ali važne za obogaćivanje zemljišta azotom i bitan izvor belančevina u ishrani životinja. Ostale vrste zeljastih biljaka na travnjacima su heterogena grupa biljaka, male proizvodne vrednosti i retko kvalitetne da bi zadovoljile potrebe domaćih životinja u ishrani.

Zemljište je glavni izvor hranljivih materija za rast biljaka. Šest makroelemenata (N, K, Ca, Mg, P i S) se normalno nalaze u biljkama u koncentracijama većim od nivoa 1 000 mg kg⁻¹. Preostali mikroelementi (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo i Zn) se obično javljaju u biljkama u koncentracijama nižim od 50 mg kg⁻¹ (Mayland i Shewmaker, 2001). U velikim koncentracijama, mnogi elementi u tragovima/metali mogu biti toksični za biljke i/ili životinje, ili mogu uticati na kvalitet hrane za ljudsku ishranu. Ovi potencijalno toksični elementi uključuju As, B, Cd, Cu, F, Pb, Hg, Mo, Ni, Se i Zn (Kabata-Pendias, 2011). Za adekvatan rast i razvoj trava i leguminoza, neophodni su osnovni makroelementi (N, P, K), kao i brojni mikroelementi, posebno B, Mo, Mg, Cu, Zn i Co.

Teški metali su među najvažnijim zagađivačima životne sredine usled antropogenih aktivnosti kao što su rudarstvo, topljenje i galvanizacija metala, industrijski otpad i mulj iz kanalizacije, emisije izduvnih gasova vozila i vojne operacije, kao i poljoprivredne aktivnosti kao što su upotreba fosfatnih đubriva, pesticida, herbicida, fungicida, insekticida i životinjskog đubriva (Shah i sar., 2010). Teški metali koji prodiru u poljoprivredno zemljište i zagađuju vodu, zemljište, vazduh i poljoprivredne useve, na kraju ulaze u lanac ishrane stoke i ljudi. Pri ispaši ili ishrani senom, kao konzumaciji prilagođenoj preživarima, postavlja se pitanje zdravstvene bezbednosti krme, s obzirom da se travnjaci razvijaju na podlogama različitog sastava i porekla. Odnos između elemenata u tragovima u biljkama i količine koje životinja usvoji i koristi je složen. Akumulacija teških metala u biljkama ne zavisi samo od ukupnog sadržaja u zemljištu, nego i afiniteta vrste, kao i individualnog ili interaktivnog dejstva raznih zemljišnih svojstava (Jakšić i sar., 2013). Translokacija elemenata u nadzemne delove biljaka i mogućnost unosa od strane životinja zavisi od faktora kao što su selektivnost u ispaši, stepen zavisnosti životinje o travi, svarljivost krme, kao i oblik i pristupačnost unetih elemenata u tragovima (Rezaeian i sar., 2020).

Planinska zemljišta od davnina omogućavaju osiguranje krme i time ishranu za 900 miliona ljudi u planinskim regijama širom sveta i koristi, za milijarde ljudi koji žive u nizijama (FAO, 2015). Poslednjih decenija se tradicionalna stočarska područja na većim nadmorskim visinama prazne i stanovništvo migrira u ravničarsko-dolinske krajeve, bliže urbanim središtima. Stočarstvo i ishrana su, u ovakvim slučajevima izloženi rizicima od novih polutanata krme. Sve veći značaj,

sejani travnjaci imaju u bioremedijaciji tehnogenih zemljišta nastalih ljudskim radom i odlaganjem materijala iz rudarstva, industrije, komunalnog otpada i dr. Travni pokrivač omogućava jeftino, brzo i održivo pokrivanje velikih površina nepovoljnog fizičkog i mehaničkog sastava supstrata, ali je takav travnjak izložen riziku nenadgledane konzumacije od strane domaćih životinja.

Neki teški metali (Cu, Zn, Mn i Mo) su u nižim koncentracijama neophodni za rast i razviće biljaka i smatraju se mikroelementima, dok su u visokim koncentracijama toksični za biljke (He i sar., 2005). U njihovom nedostatku, biljke ne mogu da završe svoj životni ciklus, a toksični efekti su mnogostruki. Oni deluju na biljke na različitim organizacionim i funkcionalnim nivoima u isto vreme i reflektuju se vidljivim strukturnim oštećenjima (hloroza). Štetni su Cd, As, Cr i Pb koji inhibiraju rast biljke što dovodi do njenog trovanja. Jedan od glavnih efekata izloženosti biljaka toksičnim koncentracijama teških metala je proizvodnja slobodnih radikala. Slobodni radikali oštećuju proteine i DNK, smanjuju udeo nekih enzima i podstiču peroksidaciju lipida, čime se narušava ćelijska struktura i na kraju dovode do smrti ćelije (Nagajyoti i sar., 2010). Mnoge studije su dokazale da teški metali povećavaju sintezu ugljenih hidrata i nekih aminokiselina i smanjuju rast biljaka i proizvodnju useva (Azmat i Khan, 2011, Alaoui-Sossé i sar., 2004). Različite vrste biljaka imaju različite sposobnosti apsorpcije. Neke vrste mogu da apsorbuju visoke nivoe kadmijuma, olova, hroma, dok druge apsorbuju samo jedan ili nekoliko metala. Biodostupnost elemenata u tragovima, za biljke se na kraju kontroliše njihovom ukupnom koncentracijom u zemljištu, kao i njihovim hemijskim oblicima. Kombinacija niskog pH i visoke koncentracije metala u zemljištu rezultira visokim unosom teških metala u biljku (Salt i sar., 1995).

Broj istraživanja o akumulaciji teških metala u travama i leguminozama za krmu u industrijskim i neindustrijskim oblastima je ograničen. Uticaj ovih metala na hranljive materije još uvek nije jasno identifikovan (Abid i sar., 2016; Darwish i Pöllmann, 2015; Al-Rashdi and Sulaiman, 2013).

Cilj ove studije je bio procena akumulacije teških metala na poljoprivrednim zemljištima i na industrijskom zemljištu pod višegodišnjim biljnim vrstama za krmu. Ispitivanje akumulacije teških metala u biomasi bi ukazalo na potencijal kontaminacije hrane za koze, ovce i druge domaće životinje, a u krajnjem, na opasnost za ishranu ljudi.

BILJNI MATERIJAL I LOKACIJE

Jedna od ekonomski najznačajnijih fitocenoza na Balkanu je *Agrostietum capillaris*, sa dominacijom vrste trave crvena rosulja (*Agrostis capillaris*). Najveći deo asocijacija *Agrostietum capillaris* je usko povezan sa ljudskim aktivnostima i one su nastale krčenjem šuma. Travnjaci se eksploatišu u uslovima ekstenzivnog stočarstva. U sklopu toga je sprovedeno istraživanje sadržaja teških metala i biljkama pristupačnih mikrohraniva na zemljištima pod travnom zajednicom *Agrostietum capillaris* na šest lokacija u zapadnoj Srbiji (područje Zlatibora), pet

lokacija u Crnoj Gori na potezu Nikšić – Durmitor i dve lokacije u istočnoj Bosni i Hercegovini na potezu Sokolac – Han Pijesak tokom 2016-2017. godine.

Najčešće korišćena vrsta trave za setvu na zemljištima ograničene plodnosti u Srbiji, kao i u rekultivaciji tehnođenih zemljišta je crveni vijuk (*Festuca rubra*) (Maksimović i sar., 2008; Djurdjević i sar., 2006), ekonomski značajna i zbog pogodnosti za ishranu domaćih životinja. Značaj vijuka se ogleda u meliorisanju prirodnih travnjaka, u zasnivanju sejanih livada i pašnjaka i proizvodnji semena (Simić, 2019). Crveni vijuk je tolerantan na visoke koncentracije metala i može biti pionirska vrsta za revitalizaciju–remedijaciju–biološko obnavljanje (Mitrović i sar., 2008).

Značajna trava za rekultivaciju pepelišta je italijanski ljulj (*Lolium multiflorum* Lam.), kratkotrajna trava poželjnih agronomskih kvaliteta koja se brzo zasniva, ima dugu vegetacionu sezonu, daje visok prinos pod povoljnim ekološkim uslovima i može se koristiti ispašom ili za seno (Simić, 2019). U svetu se koristi u uslovima kada je potrebno brzo snabdevanje stočnom hranom ili sigurno pokrivanje terena u borbi protiv erozije.

Visoki vijuk (*Festuca arundinacea* Schreb.) je travna vrsta sa širokom ekološkom amplitudom, te je pogodan za gajenje u toplim i sušnim regionima. Francuski ljulj (*Arrhenatherum elatius* Presl.) u Srbiji raste od dolinskih do planinskih travnjaka, do 800 m nadmorske visine, a u smešama može uspevati do 2 000 m nadmorske visine. Dobra je krmna vrsta i daje visok prinos sena. Nedostatak je brz gubitak kvaliteta po metličenju. Ježevica (*Dactylis glomerata* L.) je jedna od najčešćih trava u Srbiji, dobra za krmu pojedinačno ili u smeši sa drugim vrstama. Trstika ili tokavica (*Phalaris arundinacea* L.) je raširena širom sveta u hladnijim područjima umerene klime, na prevlaženom zemljištu priobalja reka, jezera, potoka, kao i u ritovima, gradeći asocijaciju *Phalaridetum arundinaceae* (Simić, 2019). Vrlo je prinorna, ali u uslovima Srbije nije cenjena krma zbog toga što brzo otvrdne i gubi hranljivost.

Lucerka (*Medicago sativa* L.) je svrstana među najbolje krmne biljke zbog visokog sadržaja proteina, minerala (kalcijum, magnezijum, sumpor, kalijum i cink) i vitamina uz niski procenat celuloze. Kontaminacija lucerke teškim metalima je od presudnog značaja zato što se ona široko koristi u ishrani stoke. Kokotac (*Melilotus officinalis* (L.) Pall.) se pojavljuje na peskovitom zemljištu, pored puteva, reka, kanala i napuštenih mesta. Zahvaljujući dugom i razgranatom korenu, dobro podnosi sušu. Nabrojane vrste su korišćene za gajenje i ispitivanje sadržaja teških metala na sejanim travnjaku za rekultivaciju pepelišta termoelektrane i jalovine rudnika. Za pokrivanje industrijskih površina ili odlagališta pepela zagađenih teškim metalima, koriste se smeše krmnih vrsta, kako bi se našao adekvatan odgovor bar neke od vrsta na nepovoljne uslove uspevanja.

REZULTATI I DISKUSIJA**PRIRODNI TRAVNJACI**

Prilikom istraživanja sadržaja teških metala u biomasi travnjaka za ispašu, pošlo se od količine pristupačnih i ukupnih teških metala u zemljištu (tabela 1).

Tabela 1. Sadržaj ukupih i pristupačnih oblika teških metala u zemljištu (0 - 10 cm) i nadzemnoj biomasi travnjaka (mg kg⁻¹ suve mase)

Lokacija	Ukupni u zemljištu				Pristupačni u zemljištu				Biljni materijal			
	Ni	Pb	Cr	Cd	Ni	Pb	Cr	Cd	Ni	Pb	Cr	Cd
Podromanija	31,8	26,1	25,4	2,18	2,9	10,9	<0,1	1,3	9,57	6,66	<0,1	0,31
Han Kram	17,5	15,2	23,0	0,17	1,4	6,9	<0,1	0,1	7,22	11,1	<0,1	0,46
Motički Gaj	22,3	30,8	1,62	1,41	0,6	7,5	<0,1	0,4	5,97	12,1	0,31	0,16
Mokro	112	28,2	92,3	<0,05	3,1	3,5	<0,1	0,1	9,53	6,17	<0,1	<0,05
Krnovo	50,7	11,9	27,4	0,45	1,3	5,4	<0,1	0,2	3,79	1,26	<0,1	0,50
Ostrovica	58,9	14,7	37,7	0,73	7,9	9,9	<0,1	0,6	7,08	4,62	<0,1	0,28
Štitovo	33,0	24,0	29,5	1,02	2,0	19,2	<0,1	0,7	4,74	3,14	<0,1	0,69
Rožanstvo	543	36,6	140	1,48	5,06	5,8	0,43	1,14	2,85	5,70	2,21	0,42
Jablanica 1	415	21,9	113	0,20	28,7	4,6	1,69	0,06	7,70	1,62	0,73	0,13
Jablanica 2	1105	17,0	382	0,26	116	2,8	4,14	0,09	6,56	2,45	2,02	0,12
Dobroselica 1	260	17,0	128	1,21	10,9	2,19	1,07	0,28	4,37	7,49	2,19	0,21
Dobroselica 2	2687	16,0	544	0,0	119	2,26	3,56	0,12	7,63	9,25	3,60	0,12
Semegnjevo	2694	31,4	508	0,28	319	7,19	5,3	0,17	12,4	2,79	1,59	0,41
MDK ¹	35	85	100	0,8	NK ²				0,1-5	1-5	<0,1-1	
					TK ³				30	20	2	10
					MDKK ⁴				50	40	-	1

¹MDK - granične maksimalne vrednosti teških metala prema Uredbi o graničnim vrednostima zagađujućih, štetnih i opasnih materija u zemljištu RS (Službeni glasnik RS 30/18)

²NK - Normalne koncentracije u biljkama prema Chaney (1983)

³TK - Toksične koncentracije u biljkama prema Kabata-Pendias (2010)

⁴MDKK - Maksimalno dozvoljene količine za krmu u biljkama prema NRC (2005); Službeni glasnik RS (2009)

Planina Zlatibor se nalazi u području podloga od serpentinita Srbije poznatim po povećanom sadržaju teških metala. Iz analize četiri teška metala uočava se povećan sadržaj nikla i hroma (tabela 1). Prema Uredbi o graničnim vrednostima zagađujućih, štetnih i opasnih materija u zemljištu RS (Službeni glasnik RS, 2018), u devet ispitanih uzoraka zemljišta sadržaj Ni i u šest uzoraka zemljišta Cr je premašio maksimalno dozvoljene koncentracije. Gotovo sve izmerene koncentracije Ni u biljkama sa livada su bile ispod kritične koncentracije za normalan rast biljaka osim na tri lokacije u Srbiji, gde su lokacije Jablanica 2, Dobroselica

2, a posebno Semegnjevo, sve na planini Zlatibor, premašile maksimalni nivo tolerantnosti za stočnu hranu u biljkama (NRC, 2005). Razlog su visoke ukupne količine Ni registrovane u zemljištu (1 105, 2 687, 2 694 mg kg⁻¹ suve mase, tim redom). Sa druge strane, sadržaj Ni u Crnoj Gori na tri lokacije, bio je veći od maksimalno dozvoljene količine u zemljištu, ali su dostupne koncentracije Ni bile između 0,6-7,9 mg kg⁻¹. Koncentracije Ni u biljkama sakupljenim sa svih lokacija bile su ispod 10 mg kg⁻¹. Koncentracija Cr je bila <0,1 mg kg⁻¹ u zemljištu Bosne i Crne Gore, pa je stoga koncentracija Cr u uzorcima biljnog tkiva bila niska. Sve lokacije u Srbiji su imale znatno veću koncentraciju Cr u zemljištu od granične koncentracije (>100 mg kg⁻¹). Takođe je koncentracija u uzorcima biljnog tkiva bila blizu toksičnih koncentracija u biljkama prema Kabata-Pendias (2011), što bi moglo biti potencijalno štetno za rast biljaka. Hrom je esencijalni element za organizme i važan je za normalan metabolizam glukoze. Najveće količine Ni i Cr pronađene su na lokacijama Jablanica 2, Dobroselica 2 i Semegnjevo, ali izgleda da su štetne količine ovih metala efikasno imobilisane i nisu akumulirane u stablu ili fotosintetskom tkivu lista. Naši rezultati sugerišu da se sadržaj Ni, Cr, Pb i Cd u stočnoj hrani, proizvedenoj na permanentnim travnjacima u tri balkanske zemlje, može smatrati bezbednim za ishranu domaćih životinja (Simić i sar., 2019). Međutim, mineralni sastav i uslovi zemljišta koji utiču na dostupnost metala u velikoj meri variraju u serpentinitima, tako da njihova akumulacija u nadzemnu biomasu i dalje može da dostigne potencijalno opasne nivoe. Zbog toga je neophodno proceniti stvarni sadržaj teških metala, posebno u populacijama koje rastu na zemljištima povišenih sadržaja teških metala (Simić i sar., 2017).

TEHNOGENA ZEMLJIŠTA

Velike količine semena krmnog bilja se koriste za pokrivanje tehnogenih zemljišta (pepelišta, jalovišta, gradskih deponija) koja su često nedovoljno obezbeđena, te domaće životinje provaljuju ogradu ili nepažnjom čuvara prelaze na neobebeđeni teren. Svake godine se ove travne površine obnavljaju zbog toga što se nasipaju ili propadaju usled ekstremnih uslova sredine.

Ispitivanja u blizini Obrenovca ukazuju da se na deponiji pepela javlja povišen sadržaj arsena i nikla (tabela 2), te može predstavljati rizik za biljke korišćene za rekultivaciju.

Tabela 2. Vrednosti pH i koncentracije pojedinih potencijalno toksičnih elemenata na tehnogenom zemljištu (mg kg⁻¹) na dubini 0-20 cm

	Depozit pepela	MDK*
pH u KCl	7,03	-
As	34,7	25
Pb	56,7	100
Cd	0,8	3
Zn	75,9	300
Ni	123	50
Cu	62,7	100

*Maksimalno dozvoljene količine prema Pravilniku o maksimalno dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu (Službeni glasnik RS" br. 23/94)

Analiziran je sadržaj pojedinačnih vrsta trava i leguminoza, determinisanih i izdvojenih iz smeša, radi utvrđivanja pojedinačnog uticaja podloge na hemijski sastav (tabela 3).

Tabela 3. Koncentracija teških metala i mikroelemenata u krmnim biljkama na tehnogenom zemljištu (mg kg^{-1})

	As	Pb	Cd	Zn	Ni	Cu
francuski ljulj	0,95	0,68	0,02	11,8	1,69	2,68
ježevica	0,90	0,89	0,04	22,4	5,07	2,36
italijanski ljulj	2,48	0,52	0,02	14,3	4,53	1,69
visoki vijuk	2,75	1,16	0,07	14,3	2,57	2,21
crveni vijuk	1,07	0,76	0,02	20,4	6,46	1,63
trstika	1,24	0,65	0,05	24,3	3,01	2,64
lucerka	1,80	0,24	0,03	15,3	8,97	2,61
kokotac	0,84	0,78	0,10	23,5	5,61	4,70
Normalni nivo	0,01-1	2-5	0,1-1	15-150	0,1-5	3-20
Kritične koncentracije	1-20	-	10-20	100-500	10-30	10-30
Tolerantni nivo	50-100	15-30	0,5	500-900	50	40-100

Setva višegodišnjih trava i leguminoza na odlagalištu pepela se izvodi najčešće smešom višegodišnjih vrsta ili pojedinačnih vrsta otpornih na nepovoljne uslove uspevanja na pepelištu (Simić i sar., 2015). Upotreba krme sa takvog staništa, u kome se mogu nalaziti potencijalno toksični elementi, predstavlja rizik od pojedinačnih elemenata, ali i zbog moguće interakcije pojedinih teških metala i minerala, što može povećati ili sniziti granice toksičnosti. Tako, kada se u travi nalazi količina bakra oko 10 mg kg^{-1} , koncentracija Mo se mora povećati na oko 20 mg kg^{-1} da bi došlo do ispoljavanja toksičnosti, ali kada u travi ima $3-5 \text{ mg kg}^{-1}$ Cu, štetan uticaj ispoljiće se već pri $3-7 \text{ mg kg}^{-1}$ Mo (Obračević, 1988). Razlike u ispoljavanju simptoma toksičnosti se mogu pojaviti kod različitih vrsta domaćih životinja, različitih kategorija i faza proizvodnog ciklusa grla. Najdrastičnija razlika u tolerantnosti između vrsta se može primetiti u odnosu na bakar. Kod goveda štetne doze iznose oko 100 mg kg^{-1} , a kod ovaca 20 mg kg^{-1} . Takođe, dugotrajna ishrana krmom sa akumuliranim teškim metalima, čak i ispod dozvoljene koncentracije, može izazvati nakupljanje ovih elemenata u jetri i kasnije dovesti do trovanja. Telad su najosetljivije domaće životinje na trovanje olovom (Spivey Fox, 1987). Na nivo toksičnosti teških metala utiče i forma (organski ili neorganski oblik) i jedinjenje u kom se nalaze. Tako je arsen, u neorganskoj formi, toksičniji od organski vezanog arsena (NRC, 2005). Vrlo često, povećanje koncentracije teških metala u hrani ne mora dovesti do trovanja već se ispoljava u padu proizvodnih i reproduktivnih sposobnosti, što otežava postavljanje dijagnoze.

Mala mobilnost Zn na pepelištu se potvrđuje poređenjem koncentracije Zn u lucerki sa pepelišta ($15,3 \text{ mg kg}^{-1}$) sa lucerkom gajenom na obradivom zemljištu Nemačke (24 mg kg^{-1}). Sve ispitivane biljke su imale koncentraciju Zn daleko ispod kritične, koja bi mogla da utiče na zaustavljanje rasta i smanjenje biomase.

Sa druge strane, količina arsena, iznad maksimalno dozvoljene u supstratu i u biljnom tkivu ispitivanih biljaka, je oko 1 mg kg^{-1} biljne mase. Najveća koncentracija je zabeležena u lucerki i trstici, ali te vrednosti ne predstavljaju značajnu akumulaciju arsena, već su bliske graničnoj vrednosti koja može donekle uticati na smanjenje prinosa. U prirodi se veoma retko može uočiti fitotoksično dejstvo visokih koncentracija arsena ili njegovo nepovoljno dejstvo na prinos biljaka (Kabata-Pendias, 2011). Kako je koncentracija arsena u biljkama niska, njegovo ulaženje u lanac ishrane preko biljaka je neznatno.

Olovo je slabo mobilan element i u zemljištu i u biljkama. Nivo Pb u krmnim biljkama je prosečno $2,1$ za trave i $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$ za deteline i smatra se da je Pb metal sa najmanjom mogućom biološkom pristupačnošću i sa najvećom akumulacijom u korenu (Kabata-Pendias, 2011). To potvrđuju i rezultati naših ispitivanja i koncentracija olova je u svim ispitivanim biljkama bila ispod 1 mg kg^{-1} . Biljke slabo usvajaju olovo u neorganskom obliku i premeštaju ga u nadzemne organe, izuzev na kiselim zemljištima. Organska jedinjenja olova se veoma brzo usvajaju i transportuju u nadzemne delove biljaka. Taloženje olova kod većine biljaka je intenzivnije u korenu u odnosu na nadzemne delove.

Prirodno zagađenje sa Ni veoma utiče na njegov sadržaj u biljkama. U ekosistemima gde se Ni raznosi vazduhom on se najviše taloži na nadzemne delove biljaka, ali prilično lako može da se spere sa površine lista. Kabata-Pendias (2011) navodi da je pH vrednost zemljišta glavni faktor koji određuje ponašanje i pristupačnost nikla. Koncentracija nikla u analiziranom uzorku pepela je bila $2,5$ puta veća od dozvoljene. Najveća akumulacija je zabeležena u lucerki (9 mg kg^{-1}). Uzevši u obzir pH pepelišta, smanjena pristupačnost Ni je uticala da sve vrednosti budu ispod kritičnih za normalan razvoj biljaka.

Pokretljivost bakra u biljkama je osrednja. Ako ga nema dovoljno u supstratu, premeštanje iz korena u nadzemne organe je neznatno, kao i iz starijih listova u mlade. Do toksičnog dejstva ovog elementa dolazi ako je njegov ukupan sadržaj u zemljištu od 25 do 40 mg kg^{-1} i ako je pri tome pH vrednost zemljišta ispod $5,5$. Koncentracija bakra u biljkama se uobičajeno kreće od 5 do 30 mg kg^{-1} u svojoj materiji (Kabata-Pendias, 2011). Koncentracija bakra u ispitivanim biljkama je bila u normalnim granicama.

Količine ispitivanih teških metala su ispod kritičnih toksičnih koncentracija za preživare prema stranim normama i prema domaćem Pravilniku o kvalitetu hrane za životinje. Iako se u deponiji pepela neki elementi nalaze iznad maksimalno dozvoljene koncentracije za zemljište i vode (As, Ni), nijedna od ispitivanih travnih vrsta, pa ni crveni vijuk kao najtolerantnija na prisustvo teških metala, nije bila značajan bioakumulator. Objašnjenje se nalazi i u pH vrednosti supstrata, koja je u sveže deponovanom pepelu vrlo visoka ($\text{pH} \sim 12$), ali se vremenom

smanjuje zbog ispiranja. Visoka pH vrednost smanjuje pokretljivost toksičnih elemenata u vodenom rastvoru i usvajanje od strane biljaka (Kabata-Pendias, 2011), što je potvrđeno i kod krmnih leguminoza. Teški metali se čvrsto vezuju za minerale gline i period njihove akumulacije na teškim, glinovitim zemljištima je dugotrajniji, dok je pepelište potpuno drugačije strukture.

Pri ispitivanju sadržaja teških metala iz dve vrste trava pogodnih za rekultivaciju jalovine, pri đubrenju i bez ikakvih hraniva, dobijeni su različiti rezultati u podzemnim i nadzemnim delovima (tabela 4). Andrejić i sar. (2022) su zaključili da crveni vijuk akumulira sve elemente u znatno većoj koncentraciji u korenu u odnosu na izdanak. Na sadržaj teških metala u korenu biljaka, direktno utiče njihova koncentracija u jalovini i ona se nalazi u granicama toksičnih vrednosti za većinu biljnih vrsta (Kabata-Pendias, 2011). Koncentracije Cu, Ni, Mn i Pb su bile niže u biljkama uzetim sa đubrenih parcela, dok je sadržaj Cd i Pb u korenu crvenog vijuka bio blago povećan u odnosu na kontrolu bez đubrenja.

Tabela 4. Sadržaj teških metala (mg kg^{-1}) u crvenom i visokom vijuku na jalovini rudnika metala

	Crveni vijuk				Visoki vijuk			
	Kontrolne biljke		Đubrene biljke		Kontrolne biljke		Đubrene biljke	
	koren	izdanak	koren	izdanak	koren	izdanak	koren	izdanak
Cu	176	49,3	79,6	21,2	53,0	22,3	77,3	37,4
Cd	3,82	1,61	4,61	0,21	4,68	3,29	5,08	3,89
Ni	164	40,0	126	30,3	114	35,6	191	49,2
Mn	2725	628	2183	912	1369	930	1265	828
Pb	367	75,5	218	37,3	227	57,9	231	88,1
Zn	368	285	569	245	626	550	596	385

Za svaki ispitivani element u oba tretmana izračunat je koeficijent translokacije (TF). Koeficijent translokacije predstavlja odnos koncentracija ispitivanog elementa izdanka i korena biljke (Karami i sar., 2011). Za sve elemente u kontrolnim i đubrenim biljkama, uspostavljen je $\text{TF} < 1$. Ove vrednosti koeficijenta translokacije ukazuju na smanjen transport elemenata iz podzemnog u nadzemni deo biljaka. Zbog toga se crveni vijuk može klasifikovati kao ekskluder teških metala. Ekskluderi su biljne vrste koje u svojim izdancima akumuliraju niske koncentracije teških metala i drugih štetnih materija, iako su u supstratu prisutne u znatno većoj koncentraciji (Alagić i sar., 2014). Đubrenje mineralnim i organskim đubrivima potencijalno može imati pozitivne efekte na smanjenje akumulacije teških metala u korenu i izdancima biljaka (Andrejić i sar., 2022). Slične rezultate je dobila i Brajević i sar. (2022) pri ispitivanju visokog vijuka na jalovini Rudnika, koji se takođe se može klasifikovati kao ekskluder teških metala.

ZAKLJUČAK

Na osnovu višegodišnjih istraživanja sadržaja odabranih metala na trajnim ili sejanim travnjacima koji se razvijaju na podlogama povećanog sadržaja potencijalno opasnih ili toksičnih elemenata, dobijeni su određeni zaključci. Generalno, može se zaključiti da iz rezultata ovog istraživanja koncentracije mineralnih elemenata analiziranih uzoraka biljaka sa svih lokaliteta ne prelaze maksimalne nivoe tolerancije za stočnu hranu. Visok pH supstrata, antagonistički odnosi između elemenata i njihove interakcije, kao i fiziološka svojstva biljaka, uticali su na nisku akumulaciju metala i mikroelemenata. Predlažu se mere predostrožnosti praćenja sadržaja metala kako bi korisna svojstva ovih travnjaka ostala bezbedna i neupitna.

Zahvalnica

Istraživanja su finansirana od strane Ministarstva obrazovanja, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, brojevi ugovora: 451-03-68/2022-14/200116 i 451-03-68/2022-14/ 200019

LITERATURA

1. Abid M, Mansour E., Yahia L.B., Bachar K, Ben Khaled A., Ferchichi A. 2016. Alfalfa nutritive quality as influenced by drought in South-Eastern Oasis of Tunisia. *Italian Journal of Animal Science*, 15(2):334–342. 2. Alagić S., Nujkić M., Dimitrijević M. 2014. Plants strategies against metal phytotoxicity as a key prerequisite for an effective phytoremediation: excluders and hyperaccumulators, part II; *Protect of materials* 55:405-420. 3. Alaoui-Sossé B., Genet P., Vinit-Dunand F., Toussaint M-L., Epron D., Badot P-M. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166(5):1213–1218. 4. Al-Rashdi T.T., Sulaiman H. 2013. Bioconcentration of heavy metals in Alfalfa (*Medicago sativa*) from farm soils around Sohar industrial area in Oman. *APCBEE Procedia*, 5:271–278. 5. Andrejić G., Brajević S., Simić A., Dželetović Ž., Aleksić U., Sokolović D. 2022. Accumulation of heavy metals in root and shoot of red fescue grown at the flotation tailings dump. *Book of proceedings XI International Symposium on Agricultural Sciences AgroReS 2022, Trebinje 26-28 May, 2022*, 64-72. 6. Azmat R., Khan N. 2011. Nitrogen metabolism as a bioindicator of Cu stress in *Vigna radiata*. *Pakistan Journal of Botany*, 43:515–520. 7. Brajević S., Simić A., Andrejić G., Dželetović Ž., Aleksić U. 2022. Accumulation of heavy metals in organs of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Book of abstracts The international student scientific conference „The environment, research, charge, administration“*, Craiova, 16. june 2022, 20-21. 8. Chaney R.L. 1983. Potential effects of waste constituents on the food chain. In: Parr, J.F., Marsh, P.B., Kla, J.M. (eds), *Land Treatment of Hazardous Wastes*, Noyes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey (1983) 152-239. 9. Darwish M.A.G., Pöllmann H. 2015. Trace elements assessment in agricultural and desert soils of Aswan area, south Egypt: geochemical characteristics and environmental impacts. *Journal of African Earth Sciences*, 112:358–373. 10. Djurdjević L., Mitrović M., Pavlović P., Gajić G., Kostić O. 2006. Phenolic acids as bioindicators of fly ash deposit revegetation. *Phenolic acids as bioindicators of fly ash deposit revegetation. Archives of environmental*

contamination and toxicology, 50(4):488–495. **11.** FAO 2015. Understanding Mountain Soils: A contribution from mountain areas to the International Year of Soils 2015, by Romeo R., Vita A., Manuelli S., Zanini E., Freppaz M. & Stanchi S. Rome, Italy. **12.** He Z.L., Yang X.E., Stoffella P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*, 19:125–140. **13.** Jakšić S.P., Vučković S.M., Vasiljević S., Grahovac N., Popović V., Šunjka D.B., Dozet G.K. 2013. Accumulation of heavy metals in *Medicago sativa* L. and *Trifolium pratense* L. at the contaminated fluvisol, *Hemijska industrija*, 67:95–101. **14.** Kabata-Pendias A. 2011. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Fourth Edition, p. 548. **15.** Karami N., Clemente R., Moreno-Jimenez E., Lepp N.W., Beeley L. 2011. Efficiency of Green waste compost and Biochar soil amendments for reducing lead and copper mobility and uptake to Ryegrass. *Journal of Hazardous materials* 191(1-3):41-48. **16.** Khan K., Lu Y., Khan H., Ishtiaq M., Khan S., Waqas M., Wei L., Wang T. 2013. Heavy metals in agricultural soils and crops and their health risks in Swat District, northern Pakistan. *Food and chemical toxicology*, 58:449–458. **17.** Maksimović S., Blagojević S., Pivić R., Stanojković A. 2008. Quality characteristics of some grass species cultivated on fly-ash deposits of a thermal power station. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17(5):584–588. **18.** Mayland H.F., Shewmaker G.E. 2001. Animal health problems caused by silicon and other mineral imbalances. *Journal of Range Management*, 54(4):441-446. **19.** Mitrović M., Pavlović P., Lakušić D., Djurdjević L., Stevanović B., Kostić O., Gajić, G. 2008. The potential of *Festuca rubra* and *Calamagrostis epigejos* for the revegetation of fly ash deposits. *Science of the total environment*, 407(1):338–347. **20.** Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T. 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental chemistry letters*, 8(3):199-216. **21.** National Research Council (NRC) 2005 *Mineral Tolerance of Animals*, 2nd rev. ed., The National Academies Press, Washington DC. **22.** Obračević Č. 1988. *Osnove ishrane domaćih životinja*, Naučna knjiga, Beograd. **23.** Rezaeian M., Tohidi Moghadam M., Kiaei M. M., Mahmud Zadeh H. 2020. The effect of heavy metals on the nutritional value of alfalfa: comparison of nutrients and heavy metals of alfalfa (*Medicago sativa*) in industrial and non-industrial areas. *Toxicological research*, 36(2):183-193. **24.** Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/technology*, 13(5):468. **25.** Simić A. 2019. *Krmno bilje. Udžbenik*, Poljoprivredni fakultet, Zemun-Beograd. **26.** Simić A., Dželetović Ž., Andrejić G., Radulaški M., Bijelić Z., Mandić V. 2017. Micronutrients and heavy metals of *Agrostietum capillaris* in Balkan countries. *Proceedings of 11th International symposium modern trends in livestock production*, Hotel Park, Belgrade, Serbia 11th - 13th October 2017, 278-289. **27.** Simić, A. Dželetović Ž., Vučković S., Bezdob M., Čosić M., Andrejić G., Geren H. 2019: Heavy metal uptake by grasslands developed in a degraded soil in Central Balkans. *Agriculture & Forestry*, 65(1):7-17. **28.** Simić A., Dželetović Ž., Vučković S., Sokolović D., Delić D., Mandić V., Anđelković B. 2015. Upotrebna vrednost i akumulacija teških metala u krmnim travama odgajenim na pepelištu termoelektrane. *Hemijska industrija*, 69(5):459-467. **29.** Shah F.U.R., Ahmad N., Masood K.R., Peralta-Videa J.R. 2010. Heavy metal toxicity in plants, plant adaptation and phytoremediation. Springer, Berlin, 71–97. **30.** Službeni glasnik RS 2009. *Zakon o bezbednosti hrane, Pravilnik o kvalitetu stočne hrane*, 41/09. **31.** Službeni glasnik Republike Srbije, 30/18 **32.** Spivey Fox M.R. 1987. Assessment of cadmium, lead and vanadium status of large animals as related to the human food chain. *Journal of Animal Science*, 65:1744–1752.

HEAVY METAL CONCENTRATIONS IN PERMANENT AND SOWN GRASSLAND

Aleksandar Simić, Željko Dželetović, Gordana Andrejić, Ivan Gujaničić

Summary

Meadows and pastures are recognized throughout Southeast Europe as a cheap and sustainable source of fodder for cattle and, even more so, for sheep. They are mostly of natural origin, less often they were created by sowing a desirable composition of species. Biomass productivity is extremely low compared to potential, and some grasslands develop on substrates with a high content of heavy metals.

More recent studies conducted on representative natural grasslands in the mountainous area of the central Balkans monitored the nutrient status of the surface and subsurface soil layers, as well as the possible presence of heavy metals (Ni, Cd, Pb and Cr). At the same time, the amounts of heavy metals in the plant material were analyzed. It was observed that in most cases there was no high content of heavy metals in the soil, except in certain locations in western Serbia, namely Ni and Cr. Even on such soils, the accumulation of heavy metals in the above-ground plant material was low.

Sown grasslands as a biocover of man-made soils are often exposed to sheep or cattle grazing and potential intake of pollutants due to lack of provision or negligence of livestock farmers. Research conducted on grasses grown on substrates with high As and Ni content indicates that forage grasses do not accumulate metals above the toxic level for sheep feeding. Greenhouse experiments show that the high content of heavy metals (Cu, Cd, Ni, Pb, Zn) in the substrate accumulates 50-80% more in the roots of the grass compared to the above-ground part. This indicates that grasses have a low translocation of heavy metals from the roots in the aerial parts of the plant.

Previous research indicates that forage obtained from natural meadows on soils with elevated concentrations of heavy metals is safe for use. A possible change of use would cause disruption of the stable status of these soils and greater availability of heavy metals.

Key words: *forage quality, heavy metals, meadows, pastures*

SPECIFIČNOSTI PRIMENE LEKOVA KOD KOZA

Vitomir Ćupić¹, Saša Ivanović¹, Sunčica Borozan¹, Gordana Žugić²,
Indira Mujezinović³, Dejana Ćupić Miladinović¹, Jelena Aleksić¹

Kratak sadržaj

Poznato je da većina proizvođača lekova, u svojim uputstvima preporučuje iste doze lekova za ovce i koze. Međutim, treba istaći da postoje određene specifičnosti (drugačiji i brži metabolizam) kod koza, koje uslovljavaju drugačije doze i doziranje lekova kod ovih životinja. Iz tog razloga, doze lekova preporučene za ovce, ili goveda se ne mogu primeniti kod koza. Za ovakvu konstataciju postoji više razloga: pre svega, poluvreme eliminacije nekih lekova, uključujući mnoge antihelmintike, koji se eliminišu uglavnom preko jetre (putem žuči), kod koza je duplo kraće u odnosu na ovce. Iz tog razloga, doze navedenih lekova su za 1,5 do 2 puta veće od onih, koje su preporučene za ovce. Takođe, poluvreme eliminacije meloksikama kod koza je mnogo kraće (6,73 sata) u odnosu na goveda (24 sata) i ovce (10,85 sati). Kako poluvreme eliminacije bilo kog leka direktno utiče na interval doziranja, to znači da se u ovom i sličnim slučajevima, preporučuje kraći interval doziranja lekova kod koza.

Ključne reči: koze, lekovi, poluvreme eliminacije lekova, primena lekova

UVOD

Većina proizvođača lekova, u svojim uputstvima preporučuje iste doze lekova za ovce i koze. Međutim, treba imati u vidu da postoje određene specifičnosti (drugačiji i brži metabolizam) kod koza, koje zahtevaju drugačije doze i doziranje lekova kod ovih životinja. Iz tog razloga se doze lekova preporučene za ovce ili goveda ne mogu *a priori* primeniti kod koza (Matthews, 2016).

Za ovakvu konstataciju postoji više razloga: pre svega, poluvreme eliminacije nekih lekova, uključujući mnoge antihelmintike, koji se eliminišu uglavnom preko jetre (putem žuči), kod koza je duplo kraće u odnosu na ovce. Zbog toga doze navedenih lekova, da bi se ostvarila maksimalna efikasnost, moraju biti za 1,5

¹Dr sci. vet. med. Vitomir Ćupić, redovni profesor; dr sci. vet. med. Saša Ivanović, vanredni profesor; dr sci. Sunčica Borozan, redovni profesor; dr sci. vet. med. Dejana Ćupić Miladinović, asistent; dr sci. vet. med. Jelena Aleksić, docent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Gordana Žugić, direktor, Agencija za lekove i medicinska sredstva, R. Srbija

³Dr sci. vet. med. Indira Mujezinović, redovni profesor, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Republika Bosna i Hercegovina

*e-mail autora za korespondenciju: cpcv57@gmail.com

do 2 puta veće od onih, koje su preporučene kod ovaca (Matthews, 2016; Gokbulut i sar., 2014; Aksit i sar., 2015; Delatour i sar., 1991; Bogan i sar., 1987). Poluvreme eliminacije meloksikama je kod koza kratko i iznosi 6,73 sata, što je znatno kraće od onog kod goveda (24 sata), ali i ovaca, gde iznosi 10,85 sati (Shukla i sar., 2007). Isto tako je i poluvreme eliminacije antitripanozomnih lekova izometamidijuma i diminazena značajno kraće kod koza u odnosu na ovce (Wesongah i sar., 2004; El Banna i sar., 1999). Ispitivanja su dokazala da i antimikrobni lek metronidazol ima kraće poluvreme eliminacije (8,64 sati), nego kod kamila (16,7 sati) i ovaca (10,8 sati) (Ali i sar., 2003).

Kako poluvreme eliminacije bilo kojeg leka direktno utiče na interval doziranja, u ovim i sličnim slučajevima, u cilju postizanja bolje efikasnosti preporučuje se kraći interval doziranja kod koza (Matthews, 2016; Gokbulut i sar., 2014; Aksit i sar., 2015; Delatour i sar., 1991; Wesongah i sar., 2004).

Utvrđene su razlike i u brzini metabolisanja lekova, čak i između pojedinih rasa koza. Tako se kod jedinki rase „Pygmy“, mnogo brže metabolišu lekovi pomoću mikrozomalnih enzima jetre (sulfonamidi i hloramfenikol), nego kod drugih rasa koza (Matthews, 2016).

Treba istaći da postoje i oni lekovi gde su komparativna ispitivanja dokazala da nema značajnije razlike u farmakokinetičkim parametrima, a time i u efikasnosti nakon primene u istoj dozi. Ovo je dokazano u ispitivanjima farmakokinetike kombinacije ampicilina i sulbaktama, nakon intramuskularne aplikacije ovcama i kozama u laktaciji (Escudero i sar., 1996) ili nakon ponovljene i.m. aplikacije cefkinoma kod ove dve vrste životinja (El-Hewaity i sar., 2014).

PRIMENA „EXTRA – LABEL“ LEKOVA I KRITERIJUMI ZA NJIHUVU PRIMENU

Američka uprava za hranu i lekove (FDA) je odobrila samo nekoliko lekova za primenu kod koza. To su: antikokcidijalni lek dekokvinat, antihelminctici fenbendazol, tiabendazol i morantel-tartarat, jonoforni antibiotik monensin i antimikrobni lekovi neomicin i ceftiofur. Odmah pada u oči da su navedeni lekovi nedovoljni za lečenje svih bolesti i poremećaja kod koza. Drugim rečima, moraju se primenjivati i drugi lekovi, koji su namenjeni za iste ili slične bolesti i poremećaje kod drugih vrsta životinja, a pre svega ovaca. Ovakva primena ili davanje bilo kojeg drugog leka ili leka koji nije posebno označen da može da se koristi kod koza, bilo na recept ili bez recepta, ili leka koji se ne koristi prema uputstvu, smatra se kao „extra-label“ ili „off-label“ upotreba leka. Samo doktori veterinarske medicine imaju pravo, tj. mogu da propisuju ili koriste, odnosno aplikuju ovakve lekove, pod uslovom da imaju odgovarajući odnos i dobru saradnju sa vlasnicima životinja, koje moraju prethodno upoznati sa ovim činjenicama. Iako danas postoji (kao što je navedeno) svega nekoliko lekova, koji su odobreni (licencirani) za primenu kod koza, na terenu se u kliničkoj praksi širom sveta koriste brojni

„*extra-label*“ lekovi, a njihov broj se manje ili više razlikuje u zavisnosti od zemlje u kojima se koriste (Dawson, 2005).

Većina odgajivača koza još uvek nije svesna, da oni nemaju tu „privilegiju“ da samostalno koriste navedene „*extra-label*“ lekove. Kao što je već rečeno, to mogu samo doktori veterinarske medicine koji su uspostavili dobru saradnju sa vlasnicima životinja, a to znači da su im vlasnici prethodno dali svoje odobrenje za primenu takvih (nelicenciranih) lekova. Ovo je naročito značajno u slučajevima ozbiljno bolesnih životinja (Dawson, 2005).

Američka uprava za hranu i lekove (FDA) ustanovila je pet kriterijuma, koji moraju biti ispunjeni pre nego što se bilo koji lek može koristiti kod životinja čiji se proizvodi koriste za ishranu ljudi, na način, koji se razlikuje od onog koji je naveden u uputstvu.

- Prvi kriterijum je da doktor veterinarske medicine najpre pregleda životinju i preuzme svu odgovornost za donošenje naknadnih odluka u vezi sa lečenjem. Često se dešava da vlasnik životinje radije pozove doktora veterinarske medicine telefonom, ispriča mu koje simptome je kod životinje primetio i traži savet za adekvatan tretman. Ovo je pre svega slučaj u onim zemljama, gde je inače odobrena primena lekova od strane vlasnika životinja.
- Drugi kriterijum, koji mora biti ispunjen, je da doktor veterinarske medicine utvrdi da na tržištu nema licenciranog leka za odgovarajuću bolest kod odgovarajuće životinjske vrste ili da je preporučena doza u uputstvu nekog leka nedovoljna, tj. da se sa njom neće postići odgovarajuća efikasnost. Imajući u vidu da postoji samo nekoliko licenciranih (odobrenih) lekova za upotrebu kod koza, nije teško utvrditi da li postoji legalno licencirani lek ili ne.
- Treći kriterijum zahteva da se pojedinačne životinje koje se leče, jasno identifikuju i da se vodi tačna evidencija u vezi sa njihovim tretmanom. Mnoge registrovane koze su tetovirane, označene ušnim markicama ili označene na bilo koji drugi način, da bi se lakše identifikovale. Ako ne postoji trajna identifikacija, vlasnik mora naknadno da uloži napor i označi tretirane životinje sa jasno vidljivim privremenim znakom, korišćenjem privremenih oznaka ili boja. Ako je moguće, ove životinje treba izolovati. Evidencija o životinjama i tretmanu se mora čuvati u određenom vremenskom periodu, kako bi se sprečile ili izbegle rezidue lekova u mesu ili mleku.
- Četvrti kriterijum zahteva da se, pre stavljanja u promet mesa ili mleka ovako tretiranih životinja, značajno produži vremenski period za karencu u odnosu na onu koja je data u uputstvu. Vlasnik mora da vodi tačnu evidenciju o tretmanu, odnosno o osobi koja leči životinju, datumu i načinu primene leka, nazivu leka i odgovarajućem periodu karence. Odgovarajući period karence određuje doktor veterinarske medicine.

Danas, većina vlasnika koza, kako u zemljama gde je to odobreno, tako i u onim gde to nije odobreno, samostalno leče svoje životinje i ne nažalost vodi odgovarajuću evidenciju o lečenim životinjama, korišćenim lekovima i odgovarajućem periodu karence za taj lek. Ako nema dostupnih informacija za karencu, onda se tretirane životinje ili proizvodi životinjskog porekla, kao što su mleko i meso, trajno isključuju iz lanca ishrane. Za lekove koji nisu posebno licencirani za koze, preporučuje se da karenca za mleko iznosi najmanje 7 dana, a 28 dana i više za meso.

- Poslednji kriterijum, detaljno navodi informacije koje se odnose na primenjeni nelicencirani lek. Pored već poznatih podataka, koji se nalaze u uputstvu ili na etiketi nelicenciranog leka treba da stoji i ime doktora veterinarske medicine, kao i specifična uputstva za upotrebu (ukoliko su izmenjena). Ovo uključuje: doziranje, način primene, interval aplikacije, trajanje terapije, upozorenja i vreme karence za svaku namirnicu koja se može dobiti ili koja se koristi od tretirane životinje (Dawson, 2005; Fajt, 2011; Anonymous, 2013; McDougall i Millar, 2011).

ZABRANJENI „EXTRA LABEL“ LEKOVI KOD KOZA

Iako većinu lekova, koji se koriste kod koza čine upravo „*extra label*“ lekovi, Evropska unija je neke od njih zabranila da se koriste kod koza. To su: hlotramfenikol, sulfadimetoksin, enrofloksacin, dipiron, klenbuterol, nitrofurani, nitroimidazoli, dietilstilbesterol i glikopeptidi (Dawson, 2005).

NAČINI PRIMENE LEKOVA KOD KOZA

Koze nisu specifične samo po brzini metabolizma i poluvremenu eliminacije lekova. Kod njih se mora voditi računa i o načinu aplikacije, a time i mestu gde će se određeni lek aplikovati. U ovom delu će ukratko biti iznete najvažnije činjenice, ili bolje reći, opisani najvažniji načini aplikacije lekova kod koza.

Peroralna primena

Grupni ili masovni tretman ili primena lekova preko hrane ili vode za piće, nije ništa pouzdaniji način kod koza u odnosu na druge vrste životinja. Kada su bolesne i ove životinje manje uzimaju hranu, a nekad čak i vodu. Šta više, kod koza je to možda i izraženije, zbog toga što su one izbirljivije i lako otkrivaju promenu mirisa vode, koju potom odbijaju. Kada je u pitanju individualni tretman, lekovi se peroralno kozama mogu dati relativno lako, pomoću šprica, drenč pištolja ili aplikatora za boluse. Za ovakve načine primene lekova, neophodno je da se životinja prethodno obuzda, odnosno da se ispravno drži. Životinju treba postaviti tako, da joj jedna strana bude uza zid, a zatim (ukoliko je jedinka manja) zakorači se preko nje ili (ukoliko je veća) stane pored nje u nivou ramenog dela. Glavu treba normalno držati u horizontalnom položaju, a ne nagnutu unazad, da

bi se smanjila mogućnost nastanka aspiracione pneumonije. Držeći donju vilicu jednom rukom, drenč pištolj ili aplikator za boluse se stavljaju u usta u predelu gde se usne spajaju, i sadržaj brzo istisne (drenč), odnosno vrh aplikatora postavi na bazu jezika i aplikuje bolus ili tableta. Pri tome, treba voditi računa da se drenč ili bolus ne ubaci odmah u usnu duplju, jer će to koza vrlo brzo izbaciti (drenč odmah, a bolus nakon žvakanja) napolje. Isto tako, drenč pištolj ili aplikator za boluse se ne smeju gurati u ždrelo na silu, da ne nastane traumatska povreda. Pre svakog korišćenja pištolja ili aplikatora, njih treba pregledati i videti da li imaju neka oštećenja, koja bi eventualno mogla povrediti sluznicu. Primena lekova preko želudačne sonde i njeno uvlačenje kroz usta nije posebno teško kod koza ukoliko se životinja prethodno imobilise i koristi odgovarajući spekulum. U ove svrhe se može koristiti komercijalno dostupan spekulum za ovce ili komad drveta sa otvorom u sredini. Koze su generalno tolerantne prema želudačnoj sondi, ali treba istaći da neretko mogu i da je progrizu (Matthews, 2016; Sherman i Smith, 2009).

Zatvaranje retikularnog žleba

Resorpcija mnogih lekova kod preživara iz buraga je prilično slaba. Međutim, ukoliko se izazove refleks zatvaranja ezofagealnog ili retikularnog žleba, primenjeni lekovi mogu direktno iz jednjaka otići u pravi želudac (sirište - abomasus).

Ovo se može postići:

- Peroralnom primenom rastvora bakar-sulfata (5 ml rastvora dobijenog rastvaranjem bakar- sulfata u količini: 1 supena kašika u litri vode).
- Aplikacijom injekcije vazopresin-lizina (0,25 i.j./kg t.m., i.v.)
- Aplikacijom 10% rastvora natrijum-hlorida ili 10% rastvora natrijum-bikarbomata (Matthews, 2016).

Supkutane injekcije

Za mesto aplikacije leka pod kožu se kod koza preporučuju vrat, grudni koš (oko 5 cm iza lakatnog zgloba) ili opuštena koža ispod vrata. Injekcije ispred lopatice treba izbegavati kod koza koje se spremaju za izložbu, zbog toga što mogu nastati lokalne reakcije u blizini površinskih cervikalnih (preskapularnih) limfnih čvorova (kazeozni limfadenitis). Veličina igala za supkutanu aplikaciju treba da iznosi 18 do 20 G. Korišćenjem navedene veličine igle, sprečava se akcidentalna aplikacija leka u mišić. Inače je potkožni put aplikacije leka sigurniji i kao takav se sve više preporučuje kod koza u odnosu na intramuskularnu aplikaciju. Treba istaći da perzistentnost ili postojanost leka u organizmu više varira nakon supkutane, nego intramuskularne primene. Zbog toga se mora posebno obratiti pažnja na karencu (Matthews, 2016; Sherman i Smith, 2009).

Intramuskularne injekcije

Zbog relativno male mišićne mase na zadnjoj nozi, (naročito u glutealnom delu), u odnosu na druge preživare, veoma često se kod tretiranih životinja nakon intramuskularne injekcije, može pojaviti prolazna hromost (usled oštećenja išijadičnog nerva). Čak i kada nerv nije oštećen, može nastati hromost.

Ovo je naročito zapaženo nakon aplikacije tetraciklina i fluorohinolona. Zbog toga se ova regija za izbegava primenu injekcija i kao alternativno mesto koristi kleido-okcipitalni mišić u predelu srednjeg dela vrata. Važno je napomenuti da bol indukovao u ovom delu može rezultirati gubitkom apetita. Iz tog razloga se, kao mesto za i.m. aplikaciju, preporučuje deo na vratu, koji se nalazi između kičmenog stuba, *ligamentum nuchae* i lopatice. Osim toga, kao mesto za intramuskularnu aplikaciju lekova kod koza, preporučuje se i *musculus triceps*, kao i longissimus mišići leđa u lumbalnom delu. Treba izbegavati butne mišiće kao mesto za aplikaciju, naročito kod mladih jedinki. Ovde je bitan je i volumen, odnosno zapremina leka koja se može aplikovati na jedno mesto. Tako se za intramuskularnu aplikaciju kod odraslih jedinki preporučuje da maksimalni volumen iznosi 5 ml (da igla da bude veličine 18 G ili manja, tj. da bude dužine između 25 i 38 mm, a prečnika oko 1 mm). Samo u slučaju kada su lekovi koji se aplikuju suviše viskozni, može se koristiti igla većeg prečnika. Manju količina leka, kao i kraće igle, treba koristiti kod jaradi (Matthews, 2016; Sherman i Smith, 2009).

Intravenske injekcije

Za intravensku aplikaciju kod koza se preporučuje jugularna vena i to u sredini vrata. Pri tome, životinju treba držati u stojećem položaju sa rukom na nozdrvama. Potom, ošišati dlaku na predviđenom mestu za injekciju i mesto punkcije dezinfikovati alkoholom ili jodoformom (povidon jod). Za intravensku injekciju se kod odraslih koza preporučuju igle veličine 18 G, a za manje životinje, veličine 20 G ili 0,9 x 40 mm. Lek treba ubrizgavati sporo (Matthews, 2016; Sherman i Smith, 2009).

Intraperitonealne injekcije

Intraperitonealne injekcije se retko koriste, osim za lečenje hipoglikemije novorođenčadi rastvorima glukoze ili infekcija pupka vodenim rastvorima antimikrobnih lekova. Držeći životinju (jare) za prednje noge, igla veličine 18 ili 20 G se uvodi okomito kroz kožu, oko 1 cm levo od pupka i ne dublje od 1 cm (Sherman i Smith, 2009).

Intradermalne injekcije

Za intradermalne injekcije se koriste tuberkulinske igle (Sherman i Smith, 2009).

LEKOVI KOJI SE OBIČNO KORISTE KOD KOZA I PRIBLIŽNO VREME KARENCE

Tabela 1. Antimikrobni lekovi koji se koriste kod koza i približna vremena karence (Dawson, 2005)

Lekovi	Komercijalno ime	Odobrenje	Doze	Način primene	Interval aplik.	Karenca	
						Meso	Mleko
Prokain-penicilin G	Crystacillin	<i>Extra-label</i>	20.000-40.000 i.j./kg t.m.	s.k.	Jednom dnevno	16-21 dan	120 časova
Benzatin-penicilin G	Pen-BP 48	<i>Extra-label</i>	40.000 i.j./kg t.m.	s.k.	Svakih 48 sati	30 dana	NP
Amoksicilin	Amoxi-inject	<i>Extra-label</i>	10 mg/kg t.m.	s.k.	Jednom dnevno	25 dana	120 časova
Ampicilin	Polyflex	<i>Extra-label</i>	10 mg/kg t.m.	s.k.	Jednom dnevno	10 dana	72 sata
Oksitetraciklin	LA-200	<i>Extra-label</i>	18 mg/kg t.m.	s.k.	Svakih 48 sati	50 dana	144 sata
Sulfadimetoksin	Albon	<i>Extra-label</i> primena – zabranjena					
Ceftiofur	Naxcel	Odobren	1-2 mg/kg t.m.	i.m.	Jednom dnevno	0 dana	0 sati
Eritromicin	Erythro-200	<i>Extra-label</i>	2 mg/kg t.m.	s.k.	Jednom dnevno	5 dana	96 sati
Tilozin	Tylan-200	<i>Extra-label</i>	20 mg/kg t.m.	i.m.	Jednom dnevno	30 dana	96 sati
Neomicin	Biosol	Odobren	10 mg/kg t.m.	p.o.	Dva puta dnevno	3 dana	NP
Florfenikol	Nuflor	<i>Extra-label</i>	18 mg/kg t.m.	i.m.	Svakih 48 sati	28 dana	120 sati
Gentamicin	Gentocin	Ne koristi se					
Tilmikozin	Micotil	Ne koristi se – Toksičan za koze					
Enrofloksacin	Baytril 100	<i>Extra-label</i> primena – zabranjena					

Tabela 2. Antiinflamatorni lekovi koji se koriste kod koza i približna vremena karence (Dawson, 2005)

Lekovi	Komerc. ime	Odobrenje	Doze	Način primene	Interval aplikacije	Karenca	
						Meso	Mleko
Fluniksimeglumin	Banamine	<i>Extra-label</i>	1,1-2,2 mg/kg t.m.	i.v. ili i.m.	Jednom dnevno	10 dan	72 sata
Fenilbutazon	Bute	<i>Extra-label</i> Ne koristi se kod jedinki u laktaciji	10-20 mg/kg t.m.	p.o.	Jednom dnevno	45 dana	NP
Aspirin	Aspirin	<i>Extra-label</i>	100 mg/kg t.m.	p.o.	Jednom dnevno	1 dan	24 časa
Dypiron	Dypiron	<i>Extra-label</i> primena – zabranjena					

Tabela 3. Antikokcidijalni lekovi koji se koriste kod koza i približno vreme karence (Dawson, 2005)

Lekovi	Komerrijalno ime	Odobrenje	Doze	Način primene	Karenca	
					Meso	Mleko
Monensin	Rumensin	Odobren	15-20 g/tona hrane	p.o.	0 dana	96 sati
Lasalocid	Bovatec	<i>Extra-label</i>	20-30g/tona hrane	p.o.	0 dana	24 sata
Dekokvinat	Deccox	Odobren	13-91 g/tona hrane	p.o.	0 dana	24 časa
Amprolium	Corid	<i>Extra-label</i>	25-50 mg/kg t.m. u hrani ili vodi za piće	p.o.	2 dana	48 sati

Tabela 4. Antihelmintici koji se koriste kod koza i približna vremena karence (Dawson, 2005).

Lekovi	Komerrijalno ime	Odobrenje	Doze	Način primene	Karenca	
					Meso	Mleko
Avermektini						
Ivermektin	Ivomec Drench	<i>Extra-label</i>	0,3 mg/kg t.m.	p.o.	14 dana	9 dana
Ivermektin	Ivomec 1%	<i>Extra-label</i>	0,3 mg/kg t.m.	s.k.	56 dana	40 dana
Doramectin	Dectomax	<i>Extra-label</i>	0,3 mg/kg t.m.	s.k.	56 dana	40 sati
Eprinomectin	Eprinex	<i>Extra-label</i>	0,5 mg/kg t.m.	p.o.	NP	NP
Moksidektin	Quest, Cydectin	<i>Extra-label</i>	0,5 mg/kg t.m.	p.o.	23 dana	56 dana
Benzimidazoli						
Albendazol	Valbazen	<i>Extra-label</i>	10 mg/kg t.m.	p.o.	7 dana	120 sati
Fenbendazol	Panacur/Safeguard	Odobren	10 mg/kg t.m.	p.o.	14 dana	96 sati
Oksfendazol	Synanthic	<i>Extra-label</i>	10 mg/kg t.m.	p.o.	14 dana	120 sati
Holinergički agonisti						
Levamisol	Levasole	<i>Extra-label</i>	8 mg/kg t.m.	p.o.	10 dana	4 dana
Morantel-tartarat	Rumatel	Odobren	10 mg/kg t.m.	p.o.	30 dana	0 dana

Tabela 5. Anestetici i sedativi koji se koriste kod koza i približna vremena karence (Dawson, 2005).

Lekovi	Komerrijalno ime	Odobrenje	Doze	Način primene	Karenca	
					Meso	Mleko
Ksilazin	Rompun	<i>Extra-label</i>	0,05 ili 0,1 mg/kg t.m.	i.v. ili i.m.	5 dana	72 sata
Ketamin	Ketaset	<i>Extra-label</i>	5-10 mg/kg t.m.	i.v. ili i.m.	3 dana	48 sati
Tiamilal-natrijum	Biotol	<i>Extra-label</i>	10-20 mg/kg t.m.	i.v.	1 dan	24 sata
Johimbini	Yobin	<i>Extra-label</i>	0,25 mg/kg t.m.	i.v.	7 dana	72 sata
Lidokain	Lidocaine	<i>Extra-label</i>	Za lokalnu anesteziju koza se koristi 1% konc.	p.o.	23 dana	56 dana

Tabela 6. Hormoni koji se koriste kod koza i približna vremena karence (Dawson, 2005)

Lekovi	Komercijalno ime	Odobrenje	Doze	Način primene	Karenca	
					Meso	Mleko
Oksitocin	Oxytocin	<i>Extra-label</i>	10-20 i.j.	i.m.	0 dana	0 dana
Dinoprost	Lutalyse	<i>Extra-label</i>	5-10 mg	i.m.	0 dana	0 dana
Kloprostamol	Estrumate	<i>Extra-label</i>	125 µg	i.m.	0 dana	0 dana
Deksametazon	Azium	<i>Extra-label</i>	20-25 mg ili 0,1 mg/kg t.m.	i.m.	14 dana	4 dana

Tabela 7. Elektroliti koji se koriste kod koza i približna vremena karence (Dawson, 2005).

Lekovi	Komercijalno ime	Odobrenje	Doze	Način primene	Karenca	
					Meso	Mleko
Kalcijum	Calcium borogluconate	<i>Extra-label</i>	60 -100 ml 20-25% rastvora	i.v.	0 dana	0 dana
	Calcium-gluconate	<i>Extra-label</i>	5-10 mg	i.v.	0 dana	0 dana

ZAKLJUČAK

Danas proizvođači lekova, u svojim uputstvima uglavnom preporučuju iste doze lekova za ovce i koze. Kako je utvrđeno je da je kod koza metabolizam brži u odnosu na ovce, to generalno znači da se i većina lekova brže metaboliše, a time i da je poluvreme eliminacije kraće. Iz tog razloga, doze preporučene za ovce, ili govoda ne mogu se a priori primeniti kod koza. Ovo se naročito odnosi na anti-helmintike, čije je poluvreme eliminacije duplo kraće u odnosu na ovce. Stoga se, da bi se ostvarila maksimalna efikasnost, navedeni lekovi moraju aplikovati u dozama koje su za 1,5 do 2 puta veće od onih, koje su preporučene kod ovaca.

LITERATURA

1. Ali B.H., Charles B.G., M. Al-yousif M., Bashir A.K. 2003. Comparative Pharmacokinetics of Metronidazole in Camels, Sheep and Goats. *Acta Vet Brno*. 72: 49-53.
2. Aksit D., Yalinkilinc H.S., Sekkin S., Boyacioğlu M., Cirak V.Y., Ayaz E. et al, 2015. Comparative pharmacokinetics and bioavailability of albendazole sulfoxide in sheep and goats, and dose-dependent plasma disposition in goats. *BMC Veterinary Research*. 11:124.
3. Anonymous, 2013. Guidance on the Use of Cascade – Veterinary Medicines Guidance Note 13. Veterinary Medicines Directorate.
4. Bogan J., Benet E., Delatour P. 1987. Pharmacokinetics of oxfendazole in goats: a comparison with sheep. *J Vet Pharmacol Ther*. 10. 4:305-9.
5. Dawson L. 2005. A Guide to Drug Usage in Goats. In: Proc. 20th Ann. Goat field day. Langston University, Langston. OK, USA.
6. Delatour P., Garnier F., Benoit E., Caude I. 1991. Chiral behaviour of the metabolite albendazole sulphoxide in sheep goats and cattle. *Res Vet Sci*. 50:134-8.
7. El-Hewaity M., El Latif A.A., Soliman A. Aboubakr M. 2014. Compara-

tive Pharmacokinetics of Cefquinome (Cobactan 2.5%) following Repeated Intramuscular Administrations in Sheep and Goats. *Journal of Veterinary Medicine*. Vol. 2014, Article ID 949642. **8.** El Banna H.A., El-Sooud K.A., Soliman G.A. 1999. Comparative pharmacokinetics of diminazene in lactating goats and sheep. *Zentralbl Veterinarmed A*. 46 (1):49-57. **9.** Escudero E., Espuny A., Vicente M.S., Cárceles C.M. 1996. Comparative pharmacokinetics of an ampicillin/sulbactam combination administered intramuscularly in lactating sheep and goats. *Vet Res*. 27:201-8. **10.** Fajt V.R. 2011. Drug laws and regulations for sheep and goats. *Vet. Clin. North Amer.: Food Anim. Pract.*, 27, 1–21. **11.** Gokbulut C., Yalinkilinc H.S., Aksit D., Veneziano V. 2014. Comparative pharmacokinetics of levamisole-oxyclozanide combination in sheep and goats following per os administration. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 78:316–20. **12.** Matthews J.. 2016. *Diseases of the Goat*, Fourth Edition. John Wiley and Sons, Ltd. Published 2016 by John Wiley and Sons, Ltd. **13.** McDougall S., Millar A. 2011. If it's not on the label, what do I do? Off-label drug use. *Australian College of Veterinary Scientists, Chapter of Veterinary Pharmacology Science Week 2011 Session Proceedings*, p. 3. **14.** Sherman D.M., Smith M.C. 2009. *Goat Medicine*. Second Edition. Wiley-Blackwell. John Wiley and Sons, Ltd. **15.** Shukla M., Singh G., Sindhura B.G., Telang A.G., Rao G.S., Malik J.K. 2007. Comparative plasma pharmacokinetics of meloxicam in sheep and goats following intravenous administration. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* >145>4>528-532). **16.** Wesongah J.O., Jones T.W., Kibugu J.K., Murilla G.A. 2004. A comparative study of the pharmacokinetics of isometamidium chloride in sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 53, 1–2, 9-14.

SPECIFICITY OF DRUG APPLICATION IN GOATS

**Vitomir Ćupić, Saša Ivanović, Sunčica Borozan, Gordana Žugić,
Indira Mujezinović, Dejana Ćupić Miladinović, Jelena Aleksić**

Summary

It is known that most drug manufacturers recommend the same doses of drugs for sheep and goats in their instructions. However, it should be pointed out that there are certain specificities (primarily a different and faster metabolism) in goats, which condition different doses and dosing of drugs in these animals. For this reason, doses of drugs recommended for sheep or cattle cannot be used in goats. There are several reasons for this statement: a) First of all, the elimination half-time of some drugs, including many anthelmintics, which are eliminated mainly through the liver (via bile), is twice as short in goats as compared to sheep. For this reason, the doses of the mentioned drugs are 1.5 to 2 times higher than those recommended for sheep. Also, the elimination half-life of meloxicam in goats is much shorter (6.73 hours) compared to cattle (24 hours) and sheep (10.85 hours). Since the elimination half-life of any drug directly affects the dosing interval, so in this and similar cases, it is recommended a shorter dosing interval in goats.

Key words: application of drugs, drugs, elimination half time, goats

TEMATSKO ZASEDANJE VIII
PLENARY SESSION VIII

BEZBEDNOST NAMIRNICA ANIMALNOG POREKLA
ANIMAL FOOD SAFETY

MESO IN VITRO-ANTE PORTAS

Milan Ž. Baltić^{1,2}, Marija Bošković Cabrol¹, Marija Dokmanović¹, Jelena Janjić¹, Milica Glišić¹, Ivana Branković Lazić³, Mirjana Dimitrijević¹

Kratak sadržaj

Poslednjih godina, pažnja istraživača u oblasti nauke o mesu posvećena je u velikoj meri alternativni konvencionalnoj proizvodnji mesa, odnosno proizvodnji mesa in vitro. To se vidi iz brojnih saopštenja u prestižnim svetskim časopisima, kao i u sredstvima javnog informisanja. I sami naslovi, u naučnim časopisima ukazuju na to da je meso in vitro nešto, neočekivano. Među tim naslovima pominjemo neke: "Mogućnost nemogućeg", "Vi to proizvodite, da li i jedete?", "Od fikcije do stvarnosti", "Kultura, meso i kultivisano meso", "Izazovi i benefiti", "Zašto i kako?", "Mit o kultivisanom mesu", "Ep o proizvodnji mesa in vitro", itd. Mada se o mogućnosti proizvodnje mesa in vitro govorilo pre više od 90 godina, prvi proizvod od mesa in vitro, goveđa pljeskavica, proizvedena je 2013. godine. Od tada se o mesu in vitro govori sa različitih aspekata (proizvodnja, zdravlje, bezbednost, nutritivna vrednost, prihvatljivost, dobrobit životinja, etički i verski pristup, zaštita životne sredine, ekonomska opravdanost, populacija stanovništva, potrebe za proteinima, funkcionalna hrana, prerada mesa, tržište mesa i zakonska regulativa). Danas se u svetu, preko 40 laboratorija bavi ispitivanjem mogućnosti proizvodnje mesa in vitro, a neke imaju i projektovane kapacitete proizvodnje (godišnje, mesečne) i proizvode meso za tržište. U svetu već ima specijalizovanih restorana koji pripremaju obroke od mesa in vitro.

Cljučne reči: bezbednost, kultivisano meso, potrošnja, proizvodnja, zakonska regulativa

UVOD

Najveći deo današnje populacije ljudi u svetu, čiji će broj ove godine dostići 8 milijardi, živela je i živi u dva veka (20. i 21.) i dve geološke epohe (holocenu

¹Dr sci. vet. med. Milan Ž. Baltić, redovni profesor u penziji; dr sci. vet. med. Marija Bošković Cabrol, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Marija Dokmanović, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Jelena Janjić, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Milica Glišić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Mirjana Dimitrijević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Milan Ž. Baltić, redovni profesor u penziji, Matica Srpska, Novi Sad, R. Srbija

³Dr sci. vet. med. Ivana Branković Lazić, viši naučni saradnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: milanbaltic@gmail.com

i antropocenu). Epoha holocena počela je završetkom poslednjeg ledenog doba (9560-9300 godina p.n.e.). Promene na Zemlji, nastale kao posledica čovekovog delovanja, poslužile su geolozima da sadašnje vreme nazovu epohom antropocena. To je i zvanično, prihvatila 2016. godine, Međunarodna komisija za stratigrafiju. Odvajanje pojedinih geoloških epoha ne može precizno da se datira, kao što se to datira razdvajanje godine od godine, veka od veka. Dakle, dve epohe uvek imaju jedan period preklapanja, pa se tako prema nekim svojim karakteristikama, prirodnim i društvenim, preklapaju holocen i antropocen. Holocen je epoha u kojoj je čovek prešao sa sakupljačko-lovačkog na sedelački način života, počeo da se bavi poljoprivredom i u daleko manjoj meri je bio zavistan od darova prirode. Danas, međutim, još uvek ima plemena koja nisu prihvatila civilizacijske tekovine i žive kao sakupljači plodova i lovci. Takva plemena žive (njih oko 60, Inuiti, Hunze, Aboridžini, Bušmani, Hadze) po načinu života, koji odgovara načinu života na početku holocena, dok je ceo ostali svet već u antropocenu. U holocenu su se smenjivali različiti tehnološki periodi (starije i mlađe kameno doba, bakarno, bronzano, gvozdeno doba, industrijska revolucija, atomsko doba, informacijsko doba, doba plastike). Neka od ovih doba karakteristična su sa antropocenom (informacijsko doba, doba plastike). Za holocen se, u društvenom smislu, vezuje formiranje prvih civilizacija (Egipćana, Kineza, Indijaca, Asiraca, Vavilonaca, Persijanaca, Inka, Maja, Asteka, Grka i Rimljana), prvih država, ratnih sukoba, migracija stanovništva. Te stare civilizacije su ostavile čovečanstvu saznanja iz različitih oblasti (filozofije, istorije, matematike, arhitekture, astronomije, biologije, prava i umetnosti) koja imaju neprocenjivu vrednost. Holocen je i epoha razvoja poljoprivrede čiji je osnovni zadatak uvek bio da obezbedi dovoljne količine hrane biljnog i životinjskog porekla za sve stanovnike sveta. Unapređenje poljoprivredne proizvodnje, biljne i stočarske, uključivalo je primenu brojnih naučnih dostignuća iz ovih oblasti. Za ta dostignuća, najbolji primer je „Zelena revolucija“ primenjena u gajenju žita (pšenice i kukuruza), pirinča, soje u više zemalja sveta, čiji je idejni tvorac i realizator ovog projekta bio nobelovac Norman Borlaug (1914-2009). Holocen i antropocen se preklapaju i u tzv. „populacionoj bombi“, koja predstavlja ubrzanu promenu broja svetske populacije. Pre više od 200 godina (1804. godine), broj stanovnika u svetu je bio jedna milijarda. Za 123 godine taj broj je porastao na dve milijarde, da bi za 33 godine (1960. godine) dostigao tri milijarde. Od 1960. godine, do 2012. godine na svakih 12 do 14 godina broj stanovnika rastao je za po jednu milijardu, tako da je 2012. bio sedam milijardi. Očekivalo se da će povećanje za još jednu milijardu biti potrebno 15 godina i da će u svetu 2028. godine živeti osam milijardi ljudi. Izvesno je međutim, da će taj broj stanovnika u svetu biti već ove, 2022. godine. To znači, da je za tu novu milijardu ljudi bilo potrebno samo deset godina, što je dosad najmanji period između dve uzastopne milijarde. Ukoliko se ovakav trend nastavi, u svetu će 2050. godine broj stanovnika biti veći od deset milijardi (Baltić i Marković, 2017; Baltić i sar., 2018; Merck, 2022)

Proizvodnja hrane u svetu

Od svih ljudskih proizvodnih aktivnosti na Zemlji, značajnih za opstanak čovečanstva, najveći izazov se nalazi pred poljoprivrednom proizvodnjom, odnosno proizvodnjom hrane. Proizvodnja hrane je aktivnost bez koje ljudski rod ne može da opstane. Sa porastom broja stanovnika u svetu, razumljivo je da rastu i potrebe za proizvodnjom hrane, naročito hrane životinjskog porekla, čiji je značaj u ishrani ljudi dobro poznat. Ukupna proizvodnja mesa u svetu bila je 2020. godine 337 miliona tona, od čega je proizvodnja mesa živine bila 133 miliona tona (39,47%), svinjskog 110 miliona tona (32,64%), goveđeg 68 miliona tona (20,18%) i mesa ostalih životinjskih vrsta (malih preživara, kopitara) 26 miliona tona (7,71%). Za 20 godina ovog veka, od 2000. do 2020. godine, ukupna proizvodnja mesa porasla je za 45%, živinskog 94%, svinjskog za 22%, goveđeg za 22% i ostalih vrsta mesa za 39%. Potrebe za mesom će 2030. godine biti 400 miliona tona, a 2050. godine blizu 500 miliona tona. Ukupne potrebe hrane za ljude u svetu bile su 2011. godine 952 miliona tona, a 2030. godine, povećaće se na 1 160 miliona tona i 2050. godine na blizu 1 400 miliona tona (Destatis, 2022). Ova prognoza je zasnovana na činjenici da „populaciona bomba“ i dalje traje i da je porast broja stanovnika u svetu veći nego što je to bilo predviđeno pre desetak godina. Očekuje se, bez obzira na porast broja stanovnika, da će poljoprivredna proizvodnja i drugi izvori hrane (prirodni vodeni resursi, gajena riba, nova hrana, meso *in vitro*), moći da obezbede dovoljne količine hrane za sve ljude. Obezbeđenje dovoljne količine hrane za sve ljude sveta definisano je terminom „sigurnost hrane“ (engl. *food security*), pod kojim se podrazumeva: „stanje kada svi ljudi, u svakom vremenu, mogu fizički i ekonomski da imaju dovoljno hrane, bezbedne i nutritivno vredne, koja može da zadovolji njihove potrebe, da bude prihvatljiva i da im omogućava uobičajene aktivnosti i „zdrav život““ (Baltić i Marković, 2017). Ovako definisana sigurnost hrane u svetu nije dostignuta. Sigurnost hrane se vezuje za sve nutritijente (ugljene hidrate, masti, mikro i makroelemente, vitamine), ali pre svega proteine, kao najvažnije i najvrednije sastojke hrane. Smrtnost i glad u svetu zbog nedostatka hrane su najčešće posledica nedovoljnog unosa proteina. U svetu godišnje umre 5,6 miliona dece starosti do pet godina i milion dece starosti od pet do 14 godina. Na svetskom nivou je hronično pothranjeno 690 miliona stanovnika (9% populacije), 650 miliona je gojaznih, a 1,9 milijarde (1/4) ima *body mass index*- BMI veći od preporučenog. Izvori najvažnijih sastojaka u ishrani ljudi proteina animalnog porekla potiču od gajenih životinja (327 miliona tona mesa), ribe iz ulova (90-95 miliona tona), ribe iz akvakulture (75 miliona tona), mleka (718 038 hiljada tona), jaja (87 000 tona), mesa divljači, insekata i mesa *in vitro* (još uvek zanemarljive količine). U ishrani ljudi, deo proteina potiče od proteinskih hraniva biljnog porekla (soja, suncokret, uljana repica, lan) i žita. Poslednjih godina, sve više pažnje se posvećuje dobijanju proteina iz algi (mikro i makro), kao i od jednoćelijskih organizama (bakterije, kvasci, pleśni). O značaju proteina u ishrani ljudi najbolje govori činjenica da FAO/WHO imaju preporuke o dnevnom unosu proteina za četiri starosne grupe stanovništva, kao i preporuke o unosu esencijalnih aminokiselina za odraslu populaciju

ljudi (Starčević i sar., 2022; Baltić i sar., 2022; Ismail i sar., 2020). O ishrani mesom, njegovoj nutritivnoj vrednosti i značaju za zdravlje ljudi objavljena je 2020. godine revijalna studija u najprestižnijem medicinskom časopisu *Lancet* (IF 70), pri čemu se u radu ne razmatra detaljnije sigurnost hrane, odnosno ne pominje se obim proizvodnje mesa u svetu (Willet i sar., 2019).

Terminologija mesa *in vitro*

Terminologija koja se odnosi na meso proizvedeno *in vitro* nije jedinstvena, ni u naučnim krugovima ni u sredstvima informisanja. Tako se za ovo meso koriste termini: „zdravo meso“, „meso bez klanja“, „meso izraslo u laboratoriji“, „meso zasnovano na ćelijama“, „kultivisano meso“, „sintetsko meso“, „veštačko meso“, „nekonvencijalno meso“, „*in vitro* kultivisano meso“ itd. Termin „*in vitro* meso“ označava način proizvodnje, odnosno dobijanje mesa izvan živog organizma. Posle brojnih diskusija, polemika i traganja za najprihvatljivijim terminom *Good Food Institute* (GFI) je prihvatio termin „kultivisano meso“ (engl. *cultivate meat*), što je prihvatilo dve trećine kompanija koje se bave razvojem i metodologijom proizvodnje mesa *in vitro*. Otuda se ovaj termin našao i u Wikipediji (Wikipedia, 2022).

Istorija mesa *in vitro*

Istorija mesa *in vitro* mogla bi se okarakterisati kao spoj futurističkih predviđanja (naučne fantastike) i naučnih istraživanja. Najčešće se istorija mesa *in vitro* vezuje za knjigu u kojoj je 1931. godine, poznati britanski državnik Winston Čerčil (kasnije dobitnik Nobelove nagrade za knjiženost), napisao da će doći vreme kada će čovek konzumirati meso grudi i krilca živine koje će biti „uzgojeno“ u posebnom medijumu. Međutim, dve godine ranije, pisac i konzervativni britanski političar Frederik Edwin Smith, je zapisao da neće proći dugo vremena do dostupnosti čoveku bifteka koji neće poticati od životinja. Desetak godina kasnije, francuski naučnik i futurista Rene Barjavel u jednoj svojoj noveli opisuje restoran u kome se služi *in vitro* proizvedeno meso (Wikipedia, 2022; Baltić i sar., 2013).

Prvi pokušaj kultivisanja embrionalne muskulature pilećeg srca u Petrijevoj šolji uradio je 1912. godine Alexis Carrel (francuski hirurg, nobelovac) sa zaključkom da je mišićno tkivo raslo u Petrijevoj šolji. Pedesetih godina prošlog, dvadesetog veka, Willem van Eelen, holandski naučnik, govorio je o mogućnosti upotrebe kulture tkiva o proizvodnji mesa *in vitro*. Krajem 20. veka, ova ideja je poslužila kao koncept na kome su se razvile matične ćelije. Mišićna vlakna zamorca kultivisao je 1971. godine, profesor patologije Russell Cek. Iz ove oblasti zaštićeno je nekoliko patenata u Holandiji i SAD (zaštićene kao ideje). Američki biznismen Jon F. Vein je 1951. godine, zaštitio patent o proizvodnji mesa *in vitro*. Za proizvodnju mesa *in vitro* bila je zainteresovana i NASA (2000. godine), koja je u saradnji sa Morrisom Benjaminsonom radila na kultivisanju mišića ribe, a kasnije i muskulature ćuraka. Testovi su dokazali da se na ovaj način može dobiti meso prihvatljivo kao hrana (Bhat i sar., 2015; Wikipedia, 2022).

Od početka 21. veka, interes za proizvodnju mesa *in vitro* je u stalnom porastu i različite organizacije su ulagale sve veća sredstva u naučna istraživanja vezana za njegovu proizvodnju. Tako je holandska vlada dala četiri miliona evra, 2008. godine, za eksperimentalna istraživanja proizvodnje mesa *in vitro*. U to vreme, održana je i prva međunarodna konferencija posvećena proizvodnji mesa *in vitro*, koja se, zatim, održavala svake godine. Časopis *Times* je uvrstio proizvodnju kultivisanog mesa u 50 najboljih ideja u svetu 2009. godine. Holandija je postala lider u inovacijama sistema proizvodnje mesa *in vitro*. Otuda nije bilo iznenađenje što je prvi goveđi hamburger *in vitro* proizveden u Holandiji. Projektom je rukovodio Mark Post sa univerziteta u Mastroihu. Te, 2013. godine, cena jednog hamburgera bila je 300 000 dolara, projekat je trajao dve godine, a sama proizvodnja hamburgera trajala je tri meseca. Hamburger je konzumiran u jednom londonskom restoranu, a sama prezentacija se mogla posmatrati u direktnom TV prenosu (Baltić i sar., 2013; Bhat i sar., 2022; Post, 2012). Za one koji su hamburger konzumirali, on nije bio dovoljno sočan (nije imao dovoljno masti), ali je bio prihvatljiviji nego hamburger pripremljen od proteina soje. Ovaj prvi hamburger je proizveden od matičnih ćelija uzetih od goveđe plečke. Mark Post je tada izjavio da će se hamburger proizveden *in vitro* naći u supermarketima za 10 do 20 godina. Od 2014. godine, raste interes i povećava se broj kompanija koje rade na razvoju proizvodnje mesa *in vitro*. Na jelovniku jednog restorana u Singapuru se 2020. godine, pojavilo meso živine proizvedeno *in vitro*. Iste godine, meso *in vitro* su konzumirali novinari, eksperti i mali broj potrošača u jednom restoranu u Izraelu. Restoran te godine nije otvoren zbog pandemije COVID-19. Cena mesa *in vitro* se, usavršavanjem tehnologije proizvodnje, rapidno smanjivala i bila 2020. godine, za meso živine između 11 i 12 dolara, što je bilo manje od cene mesa živine proizvedenog na konvencionalan način. U Tabeli 1 su prikazane cene različitih vrsta mesa proizvedenih *in vitro* od 2015. do 2019. godine (Wikipedia, 2022; Warner, 2021).

Tabela 1. Cena različitih vrsta mesa proizvedenih *in vitro* od 2015. do 2019. godine.

Godina	Cena	Masa	Vrsta mesa
2015	140 €	1 kg	Jetra
2015	60 €	1 kg	Govedina
2015	1 700 \$	450 g	Živina
2016	7 000 \$	450 g	Tuna
2017	100 €	1 kg	Svinjetina
2017	1 000 £	1 kg	Svinjetina
2018	3 500 \$	1 kg	Škampi
2018	35 \$	200 g	Živina
2018	10 \$	450 g	Meso
2019	10 €	1 kg	Živina
2019	15 000 €	1 kg	Jetra
2019	1 350 \$	1 kg	Kengur

Izvor: prilagođeno prema Wikipedia, 2022;

Danas se u svetu, 44 kompanije bave razvojem tehnologija proizvodnje mesa *in vitro*. Prva je osnovana 2011. godine, a najveći broj kompanija je osnovan 2018. godine (13) i 2019. godine (9). Kompanije su osnovane u 18 zemalja sveta. Najveći broj je osnovan u SAD (13), zatim Izraelu (4), po tri u Singapuru, Kanadi i Velikoj Britaniji, po dve u Španiji, Australiji, Japanu i Holandiji, a po jedna u Hong Kongu, Turskoj, Argentini, Kini, Indiji, Francuskoj, Belgiji, Češkoj, dok je jedna kompanija zajednička (Izrael, Belgija). Od 44 kompanije koje rade na razvoju tehnologije proizvodnje mesa *in vitro*, najveći deo je usmeren na meso (osam kompanija), bez podataka o kojoj vrsti mesa se radi. Za njih sedam, interes je proizvodnja mesa svinja, za šest meso goveda, ribu i proizvode voda pet, živinu tri, jetru živine tri, po dve za *pet food* i masno tkivo, jedna za meso kengura i po jedna samo za proizvodnju medijuma, odnosno skele (nosača) (Wikipedia, 2022).

Od 44 kompanije, njih 25 (56,82%) ima dokaz koncepta (dokaz da imaju uslove za proizvodnju). Dve kompanije su bez dokaza koncepta, a za 17 kompanija nema podataka. Prvi dokaz koncepta datira iz 2013. godine, a najveći broj tih dokaza je dat u periodu od 2016. do 2022. godine. Probni pogoni su registrovani u 15 kompanija (34,09%). Za sada, šest kompanija ima meso *in vitro* na tržištu, a njih 13 najavljuje svoj izlazak na tržište između 2022. i 2025. godine. U tabeli 2 su prikazani instalisani i projektovani kapaciteti proizvodnje mesa *in vitro* različitih kompanija (MarketWatch, 2020).

Tabela 2. Instalisani i projektovani kapaciteti proizvodnje mesa *in vitro*

Država/Mesto	Vreme proizvodnje ili očekivane proizvodnje	Kapacitet*	Vrsta mesa
Izrael/Rehovot	Februar 2022	3 000 m ²	Goveđe
Španija/San Sebastian	2020	ND	Svinjsko
Kalifornija/San Francisko	2020	1200 l bioreaktor	Meso
Kalifornija/Emeryville	2021	ND	Tuna
Izrael/Rehovot	Jun 2021	500 kg/dan ili 182 625 kg/godišnje	Meso
Holandija/Delft	Septembar 2021	5000 kg/dan 2025	Svinjsko
Belgija/Antverp	Mart 2020	700 g/proizvodnoj jedinici	Jetra
Holandija/Mastriht	Maj 2020	100 kg/mesec ili 1200 kg/godišnje (moguće do 180 000 kg/godišnje)	Goveđe
Kalifornija/Alameda	2021	20 000 kvadratnih stopa	Svinjsko
Izrael/Ness Ziona	Novembar 2020	100 kg/nedeljno	Pileće
Kalifornija/Emeryville	Novembar 2021	22 680 kg/godišnje (moguće do 181 440 kg/godišnje)	Pileće
Kalifornija/San Francisko	Jun 2021	22 680 kg/godišnje (moguće do 90 718 kg/godišnje)	Losos

* u različitim mernim jedinicama; ND - nije definisan

Izvor: prilagođeno prema Wikipedia, 2022;

Proizvodnja mesa *in vitro*

Proizvodnja mesa *in vitro* je složen, zahtevan proces i za veliki broj istraživača je pravi izazov. Sam proces proizvodnje mesa *in vitro* zahteva četiri osnovna elementa: ćelijske linije, medijum, skelu (nosač) i bioreaktor.

Ćelije

Ideja o proizvodnji mesa *in vitro* proizašla je iz primene embrionalnih matičnih ćelija u humanoj medicini, čija se upotreba prevashodno vezuje za regenerativnu medicinu i danas se koristi u lečenju preko 60 različitih oboljenja. Matične ćelije su nediferencirane ćelije, što znači da imaju potencijal da se diferenciraju u različite tipove specijalizovanih ćelija. Pluripotentne ćelije mogu da se diferenciraju u sve tipove ćelija, dok se multipotentne ćelije diferenciraju u nekoliko specijalizovanih vrsta ćelija. Unipotentne matične ćelije se ne diferenciraju. Mada su pluripotentne embrionalne ćelije idealan izvor matičnih ćelija, zbog etičkih razloga postoje oprečna mišljenja o njihovoj upotrebi u naučne svrhe, pa i u proizvodnji mesa *in vitro*. Zbog toga su naučna istraživanja usmerena na ispitivanje mogućnosti da se pluripotentne ćelije dobiju iz multipotentnih ćelija krvi ili kože njihovom regresijom, a one se, zatim, mogu diferencirati u različite specijalizovane ćelije. Kao alternativa pluripotentnim ćelijama mogu da se koriste multipotentne matične ćelije iz linije mišićnih ćelija, odnosno miosatelitske ćelije. Da bi mogle da se koriste, matične ćelije treba da imaju određene karakteristike, odnosno da ne propadaju, da imaju sposobnost proliferacije, nesposobnost „udruživanja“, nezavisnost od seruma i laku diferencijaciju u željeno tkivo. Takve osobine zavise od vrste i porekla ćelija. Zbog toga, kultivisanje ćelija mora da bude prilagođeno njihovim specifičnim potrebama. Ćelijske linije mogu da se uzmu biopsijom uz primenu lokalne anestezije. Sekundarni izvori su zamrznute matične ćelije iz prethodnih istraživanja. Kao matične ćelije se koriste četiri tipa ćelija: embrionalne ćelije (u proizvodnji mesa *in vitro* napuštene), specifične ćelije tkiva (npr. jetra), indukovane pluripotentne ćelije i miosatelitske ćelije (mogu da se diferenciraju samo u mišićne ćelije) (Warner, 2019; Sharma i sar., 2015; Ben-Arye i Levenberg, 2019; Chriki i Hocquette, 2020; Edelman i sar., 2005; Zidarič i sar., 2020). Za kultivisanje ćelija masnog tkiva, koristi se biopsijom dobijeno subkutano masno tkivo prasadi (Song i sar., 2022).

Medijum

Odabrana linija ćelija se stavlja u medijum u kome se indukuje njihova proliferacija. Medijum je posebno definisana sredina koja sadrži sve neophodne sastojke (ugljene hidrate, masti, proteine, minerale, vitamine) za proliferaciju ćelija. Količina medijuma mora da bude dovoljna da obezbedi eksponencijalni rast populacije ćelija. Medijumu mogu da se dodaju različiti aditivi (npr. serum), zatim faktori rasta, sekretorni proteini ili steroidi. Kada diferencijacija počne, mišićna vlakna počinju da se kontrahuju i stvaraju mlečnu kiselinu. Sposobnost ćelija da

koriste nutrijente i da se umnožavaju delimično zavisi od pH vrednosti medijuma. Ukoliko se medijum zakiseli može da stvori uslove koji nisu optimalni za umnožavanje ćelija i njihov rast. Zbog toga se medijum mora povremeno „osvežavati“ nutrijentima iz bazalnog medijuma. Medijum je jedna od osnovnih komponenti *in vitro* kultivacije ćelija. Pritom je najveći izazov obezbeđenje faktora rasta. Za ovo se najčešće koristi goveđi serum (krvni produkt iz fetusa teladi). Kako je upotreba krvi goveđeg fetusa neetički pristup, to se rešenje za sastav medijuma traži nezavisno od životinja. Medijum je, inače, najskuplji element proizvodnje mesa *in vitro* (1 000 dolara/litar). Hemijski sastav medijuma nije isti za sve vrste kultivisanja mesa proizvedenog *in vitro*. Poslednjih godina je pažnja istraživača usmerena na biljne derivate koji bi poslužili u formulaciji medijuma. To se, pre svega, odnosi na fotosintetičke alge i cijanobakterije koje mogu da sintetišu brojne sastojke koji se koriste za formulaciju medijuma, kao zamena za fetalni, goveđi ili konjski serum. Recikliranje medijuma smanjuje troškove proizvodnje, a zahteva praćenje proizvodnje, naročito u kritičnim kontrolnim tačkama (HACCP) (Warner, 2019; Sharma i sar., 2015; Chriki i sar., 2020; Bhat i sar., 2019; Brayant, 2020; Datar i Betti, 2010; Zidarić i sar., 2020).

Skela

Skela (nosač) omogućava dobijanje karakteristične strukture tkiva. U *in vivo* uslovima, to se postiže interakcijom ćelija sa ekstracelularnim matriksom, odnosno trodimenzionalnom mrežom glikoproteina, kolagena i enzima. Skela treba da simulira osobine ekstracelularnog matriksa. Ključne osobine skele su poroznost, vaskularizacija (protok tečnosti), sposobnost adhezije ćelija i podsticanje diferencijacije ćelija. Alternativno, hemijske osobine skele treba da imaju sposobnost da se menjaju sa drugim supstancama koje imaju slične funkcionalne osobine. Poželjno je da se materijal skele može da razgrađuje i da ga na kraju procesa kultivisanja ćelija bude što manje. To se može postići enzimima koji ne deluju na mišićno tkivo, već samo na tkivo skele. Skela treba da bude od jestivog materijala, odnosno da ne utiče na bezbednost proizvedenog mesa *in vitro*. Takav materijal je celuloza (sastavni deo biljaka), zatim kolagen ili želatin (proteini), hitin i citozan (polisaharidi) i nanomaterijali (nanoceluloza, nanovlakna alginata). Dobar izbor skele omogućava dobijanje 3D stukture *in vitro* mesa (Orellana i sar., 2020; Wikipedia, 2020; Baltić i sar., 2013; Warner, 2019; Datar i Betti, 2010).

Bioreaktor

Bioreaktor je uređaj u kome se nalaze ćelije, medijum i skela i u kome se omogućava diferencijacija i proliferacija ćelija. Temperatura u bioreaktoru treba da obezbedi uslove koji su identični onima koji su karakteristični za životinje *in vivo*, što je za sisare temperatura od 37 °C, a za ribe znatno niža. Ćelije insekata mogu da rastu pri sobnim temperaturama. Konstrukcije bioreaktora imaju različita tehnička rešenja. U bioreaktoru, umnožavanje ćelija može da se stimuli-

še biomedicinski, biofizički i elektrostimulacijom. U toku kultivacije, bioreaktor mora da bude snadbeven dovoljnom količinom kiseonika, a metabolički otpad mora da se uklanja. Kontrola procesa „fermentacije“ u bioreaktoru je omogućena brojnim odgovarajućim senzorima (senzor za kiseonik, pH, itd.) (Warner, 2019; Datar i Betti, 2010; Edelman i sar., 2005).

Prednosti i opasnosti proizvodnje mesa *in vitro*

Zaštita životne sredine

Gajenje životinja u velikoj meri doprinosi zagađenju vazduha (ugljendi-oksidi, metan, azot-oksidi) i vode (hemijske i fizičke opasnosti). Smatra se da bi proizvodnja mesa *in vitro* znatno doprinela zaštiti životne sredine, zato što bi, bi prema nekim studijama, emitovala samo 4 % štetnih gasova u atmosferu, a upotreba energije bi se smanjila za 45 %. Za proizvodnju jedne tone konvencionalnog mesa potrebno je 26-33 GJ energije, 367-521 m³ vode i 190-230 m² zemlje, a emisija gasova je 1 900-2 240 CO₂ ekvivalenata. Za istu količinu mesa proizvedenog u *in vitro* treba 7 do 45 % manje energije, 99 % manje površine zemlje, 82-96 % manje vode, a emisija štetnih gasova bi se smanjila za 78-96 %. Pri ovom obračunu računa se na mogućnost iskorištavanja metana za proizvodnju energije. Potrebna količina vode za proizvodnju jednog kilograma biljnih kultura i mesa različitih životinjskih vrsta ima sledeći opadajući niz: ovce (51 000 l/kg) > goveda (43 000 l/kg) > svinje (6 000 l/kg) > brojleri (3 500 l/kg) > soja (2 000 l/kg) > pirinač (1 600 l/kg) > sirak (1 300 l/kg) > lucerka (1 100 l/kg) > pšenica (900 l/kg) > kukuruz (650 l/kg) > paradajz (630 l/kg) > proso (272 l/kg). Rasprostranjenost vode i vodni resursi slatke vode su neravnomerno raspoređeni na našoj planeti, pa je otuda i sigurnost vode svim stanovnicima sveta neravnomerna. Kako broj stanovnika u svetu raste brže od očekivanog, kao i zbog sve izraženijih klimatskih promena (otopljanje), to postoji realna opasnost za sve većom oskudicom vode u pojedinim delovima sveta, naročito onim najmnogoljudnijim. U antropocenu, čovečanstvo se suočava sa jednim od najvećih problema zagađenja životne sredine i u njoj posebno zagađenja voda. Alarmanтна je činjenica da se u morima i okeanima sve češće pojavljuju tzv. „mrtve zone“, područja u kojima nema života u vodenim sredinama. Smatra se, takođe, da jedna fizička opasnost, a to je prisustvo plastike u vodenoj sredini, predstavlja jedan od najvećih problema današnjice. Prema nekim procenama, u vodenim sredinama će za nekoliko godina masa plastike biti jednaka masi živog sveta u vodi (Baltić i sar., 2018; Wikipedia, 2022; Bhat i sar., 2015; Warner, 2019; Balasubramanian i sar., 2021).

Dobrobit

Proizvodnja mesa *in vitro* ne utiče na dobrobit životinja i njom se isključuje mogućnost neuslovnog gajenja životinja, njihovog transporta, nepravilnih postupaka u depou, povreda u fazama gajenja, transporta, istovara i smeštaja. Takođe, nema omamljivanja i klanja koji se neretko obavljaju na način koji kod životinja

izazivaju bol i patnju (Sharma, 2015). Smanjenjem broja gajenih životinja, omogućili bi se bolji uslovi držanja i postupaka sa životinjama. Činjenica, da će od samo 10 matičnih ćelija, moći da se proizvede 50 000 tona mesa za samo dva meseca opravdava smanjenje broja gajenih životinja. Teoretski, samo jedna ćelijska linija biće dovoljna da hrani čovečanstvo (Warner, 2019; Zidarić i sar., 2020).

Ekonomska opravdanost

Stočarstvo danas koristi 77% poljoprivrednog zemljišta, a u ukupnoj proizvodnji kalorija učestvuje sa 17%. Sa druge strane, proizvodnja sa 23 % korištenog poljoprivrednog zemljišta zasejanog žitom i drugim biljnim kulturama učestvuje sa 83% kalorija u ishrani ljudi. Farmski uzgoj životinja emituje četiri puta više gasova staklene bašte od biljne proizvodnje. Istraživanja u oblasti mesa *in vitro* su veoma skupa, a omogućavaju ih državni organi (holandska vlada 2011. godine četiri miliona evra, španska vlada 2016. godine 3,7 miliona evra, projekti Evropske Unije, pojedine kompanije i donatori). Svi ovi projekti vrede više miliona evra. Za sada je kultivisano meso još uvek skuplje od konvencionalnog mesa. Hamburger od mesa *in vitro* je 2015. godine imao cenu od 250 000 evra, a pet godina kasnije cena mu je bila osam evra. Smatra se da će cena goveđeg mesa *in vitro* za nekoliko godina biti jednaka ceni konvencionalno proizvedenog mesa, a da će 2030. godine cena biti 5,66 dolara/kg, što znači manja, nego što je to cena mesa danas (Zidarić i sar., 2020, Wikipedia, 2022; Sharma i sar., 2015).

Bezbednost i kvalitet mesa *in vitro*

Meso *in vitro* se proizvodi bez hormona i kako se proizvodi u sterilnim uslovima, isključuje se i upotreba antibiotika. Sa aspekta nutritivne vrednosti, meso *in vitro* može da se proizvede sa optimalnim odnosom n-3/n-6 masnih kiselina i manjim sadržajem holesterola. Kako se meso *in vitro* proizvodi u zatvorenim, kontrolisanim uslovima sredine, ono ne sadrži biološke opasnosti (bakterije, parazite, viruse, prione), odnosno nema prenosa zoonoza. Ovo meso je slobodno i od hemijskih opasnosti (pesticidi, teški metali i sl.). Stoga meso *in vitro* može da ima i funkcionalne osobine i osobine organske hrane, a nema osobine genetski modifikovane hrane. Kada se govori o senzornim osobinama mesa *in vitro* (izgled, miris, ukus, boja, tekstura), ono ne treba da se stavlja u konkurentski odnos sa konvencionalno proizvedenim mesom. Dobro je poznato da prihvatljivost mesa i proizvoda od mesa u mnogome zavisi od kulinarskog umeća, odnosno od načina proizvodnje. Istina je da deo potrošača preferira meso pripremljeno sa kostima (svinjska rebra, pileća krilca), ali nije isključeno da će kosti i krv biti i sastavni deo mesa *in vitro*. Nutritivna vrednost mesa u ishrani ljudi je nesumnjiva (proteini, aminokiseline, minerali, vitamini, pa čak i masti), ali neki sastojci mesa (zasićene masne kiseline, nepovoljan odnos n-3/n-6 masnih kiselina, holesterol) dovode se u vezu sa hroničnim nezaraznim bolestima (kardiovaskularne bolesti, dijabetes) i kancerima. Rizik od pojave ovih bolesti zavisi od brojnih faktora (vr-

sta mesa, načina pripreme, prerade i obima potrošnje) (Chriki i Hocquette, 2020; Warner, 2019; Baltić i sar., 2013). Još uvek nisu dovoljno poznate posledice upotrebe kultivisanog mesa za zdravlje ljudi. Jedna od nepoznanica je: da li postoji mogućnost da usled velikog broja multiplikacija ćelija dođe do promena u ćelijskim linijama, kao što se to događa kod kancera? Još uvek nema testova koji bi u in vivo uslovima na životinjama (miševi, pacovi) dokazali eventualne opasnosti od konzumiranja kultivisanog mesa (Hocquette, 2016).

Potrošači i meso *in vitro*

Prihvatljivost *in vitro* mesa kod potrošača je od posebnog interesa za proizvođače. Poznato je da su potrošači često sumnjičavi, naročito starija populacija, na nešto novo, nešto sa čim se nisu susretali. Studije u tri najmnogoljudnije zemlje sveta (Kina, Indija, SAD) dokazuju da o kultivisanom mesu znatan broj ispitanika ima pozitivno mišljenje (čak je za 75% potrošača ovo meso prihvatljivo). Mišljenje potrošača se najčešće odnosi na brigu o zdravlju, bezbednost mesa, njegovu nutritivnu vrednost, održivost i cenu. Ispitivanja, takođe, dokazuju da su negativne reakcije potrošača vezane za nerazumevanje objašnjenja o načinu proizvodnje i osobinama *in vitro* proizvedenog mesa. Zbog toga je važna dobra komunikacija između proizvođača i potrošača i ona treba da bude u većoj meri usmerena na gotov proizvod i njegove osobine, a manje na tehnologiju proizvodnje koja je za većinu potrošača nerazumljiva. Za prihvatljivost mesa *in vitro*, značajno je ne samo poznavanje njegovih osobina, već i sam njegov naziv, kao i zakonska regulativa koja se odnosi na ovu vrstu mesa. Razume se da ima i drugih činilaca koji utiču na prihvatljivost mesa proizvedenog *in vitro* (navike u ishrani, obrazovanje, kupovna moć, stečeno iskustvo i sl.). Kad se govori o potrošačima, mora se reći da prihvatljivost mesa proizvedenog *in vitro* zavisi i od etičkih i religioznih motiva. Meso *in vitro* isključuje mogućnost okrutnosti prema životinja, odnosno kao što je već rečeno, doprinosi njihovoj dobrobiti, manje utiče na životnu sredinu, bezbednije je, a vremenom će imati istu cenu kao i konvencionalno proizvedeno meso. Prvo pojavljivanje mesa *in vitro* 2013. godine dočekano je sa više nepoverenja zbog toga što je u njegovoj proizvodnji kao medijum korišten fetalni goveđi serum. On je u međuvremenu zamenjen sastojcima u kojima nema govedeg seruma, što je imalo uticaja na potrošače različitih veroispovesti, kao i na potrošače opredeljene za vegeterijanstvo. Jevreji smatraju da meso *in vitro* nije „košer“ i da nije u skladu sa njihovim pravom i običajima. Međutim, da li je meso „košer“ ili nije zavisi od porekla matičnih ćelija. Ako su ove ćelije uzete od životinja pre klanja, onda meso *in vitro* nije „košer“, a ako su uzeti posle „košer“ klanja, onda se smatra da se radi o „košer“ mesu. Hinduizam ne prihvata upotrebu mesa *in vitro* u ishrani ljudi. Islam, takođe, razmatra upotrebu mesa *in vitro* u ishrani ljudi. Prema jednim upotreba mesa *in vitro* nije opravdana, dok drugi smatraju da ovo meso ne treba da bude razmatrano kao meso od živih životinja, već od životinja zaklanih po „halalu“ i da je najvažnije da kultivisano meso ne potiče od matičnih ćelija svinja, pasa i drugih životinja koje se ne koriste u ishra-

ni njihovih vernika. U hrišćanstvu je najmanje otpora upotrebi mesa *in vitro* u ishrani ljudi (Chirki i Hocquette, 2020; Balasubramanian i sar., 2021; Zidarić i sar., 2020; Baltić i sar., 2013).

Zakonska regulativa

Singapur je prva zemlja u svetu koja je dozvolila upotrebu mesa *in vitro* u ishrani ljudi. U Izraelu, potrošač može da konzumira meso *in vitro* uz obavezu da potpiše izjavu da ga konzumira na sopstvenu odgovornost. Evropska Unija, Novi Zeland, Velika Britanija i SAD su na putu izrade zakonske regulative vezane za upotrebu kultivisanog mesa. U SAD je odgovornost podeljena između FDA i USDA. FDA je nadležan za deo koji se odnosi na ćelije (prikupljanje, banka ćelija, rast, diferencijacija), dok su pod okriljem USDA proizvodnja i promet kultivisanog mesa (Wikipedia, 2022; Asioli i sar., 2021; Chirki i Hocquette, 2020; Warner, 2019).

Umesto zaključka – Šta dalje?

Dalja istraživanja u proizvodnji mesa *in vitro* biće usmerena u više različitih pravaca: entomokultura, dizajn medijuma i skele, nutritivni profil mesa, kinetika, fenomeni transporta i metabolizna, proces biotehnologije, bezbednost, nutritivna vrednost, opasnosti i biološki ogledi. Očekuje se da će posle komercijalizacije kultivisanog mesa pažnja biti usmerena na njegovu održivost, kao i na mogućnost primene u preradi mesa (Paredes i sar., 2022). Za sada je vrlo malo radova koji govore o mogućnostima upotrebe mesa proizvedenog *in vitro* u izradi proizvoda od mesa, što je i razumljivo zbog toga što je još uvek proizvodnja kultivisanog mesa ograničenih kapaciteta. Dosadašnjim istraživanjima, vezanim za proizvodnju mesa *in vitro* došlo se do toga da nam je ono *ante portas*. Negde su vrata već odškrinuta. Čekamo li da se širom otvore?

Zahvalnica:

Ovu studiju je podržalo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u skladu sa odredbama Ugovora o finansiranju istraživanja (br. 451-03-68/2022-14/200143).

LITERATURA

1. Asioli D., Bazzani C., Nayga Jr R. M. 2022. Are consumers willing to pay for in-vitro meat? An investigation of naming effects. *Journal of Agricultural Economics*, 73(2): 356-75.
2. Balasubramanian B., Liu W., Pushparaj K., Park S. 2021. The Epic of *In Vitro* Meat Production—A Fiction into Reality. *Foods*, 10(6): 1395.
3. Baltić M. Ž., Bošković M., Mitrović R. 2013. *In vitro* meat: possibility of the impossible. In *Proceedings, International 57th Meat Industry Conference, Meat and Meat Products-Perspectives of Sustainable Production*, Belgrade, Serbia, June 10-12, 2013 (41-7). Institute of Meat Hygiene and Technology.
4. Baltić M. Ž., Marković R. 2017. Hrana-prošlost, sadašnjost, budućnost. 28. Savetovanje

Veterinara Srbije, Zlatibor, 21-33. **5.** Baltić M. Ž., Popović M., Marković R., Ćirić J., Baltić B. M., Starčević M., Janjić J. 2018. Voda-prošlost, sadašnjost, budućnost. 29. Savetovanje Veterinara Srbije, Zlatibor, 15-30. **6.** Baltić Ž. M., Marković R., Nešić K., Bošković M., Janjić J., Nedić D., Popović M., 2022. Izvori proteina za ishranu ljudi i životinja. 27. godišnje savetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH), Međunarodni naučni skup. **7.** Ben-Arye T., Levenberg S. 2019. Tissue engineering for clean meat production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3: 46. **8.** Bhat Z.F., Kumar S., Fayaz, H. 2015. *In vitro* meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(2): 241-248. **9.** Bhat Z.F., Morton J.D., Mason S.L., Bekhit A.E.D.A., Bhat H.F. 2019. Technological, regulatory, and ethical aspects of *in vitro* meat: A future slaughter-free harvest. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4): 1192-208. **10.** Bryant C. J. 2020. Culture, meat, and cultured meat. *Journal of animal science*, 98(8): skaa172. **11.** Chriki S., Hocquette J. F. 2020. The myth of cultured meat: a review. *Frontiers in nutrition*, 7. **12.** Datar I., Betti M. 2010. Possibilities for an *in vitro* meat production system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1): 13-22. **13.** DESTATIS: Global animal farming, meat production and meat consumption. Available at: https://www.destatis.de/EN/Themes/Countries-Regions/International-Statistics/Data-Topic/AgricultureForestryFisheries/livestock_meat.html/. Accessed 08.07.2022. **14.** Edelman P.D., McFarland D.C., Mironov V.A., Matheny J. G. 2005. Commentary: *In vitro*-cultured meat production. *Tissue engineering*, 11(5-6): 659-62. **15.** Hocquette, J.F., 2016. Is *in vitro* meat the solution for the future?. *Meat science*, 120, 167-176. **16.** Ismail I., Hwang Y., Joo S., 2020. Meat analog as future food: a review. *Journal of Animal Science and Technology*, 62:111-120. <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.2.111>. **17.** MarketWatch: Is cell-based meat the next big thing? Here are 5 companies leading the revolution. Available at: <https://www.marketwatch.com/story/is-cell-based-meat-the-next-big-thing-here-are-5-companies-leading-the-revolution-2020-10-06/>. Accessed 08.07.2022. **18.** Merck: Clean meat - the food of the future. Available at: <https://www.merckgroup.com/en/research/science-space/envisioning-tomorrow/scarcity-of-resources/cleanmeat.html/>. Accessed 08.07.2022. **19.** Orellana N., Sánchez E., Benavente D., Prieto P., Enrione J., Acevedo C.A. 2020. A new edible film to produce *in vitro* meat. *Foods*, 9(2): 185. **20.** Paredes J., Cortizo-Lacalle D., Imaz A.M., Aldazabal J., Vila M. 2022. Application of texture analysis methods for the characterization of cultured meat. *Scientific Reports*, 12(1): 1-10. **21.** Post M.J., 2012. Cultured meat from stem cells: challenges and prospects. *Meat Science*, 92:297-301. **22.** Sharma S., Thind S. S., Kaur A. 2015. *In vitro* meat production system: why and how?. *Journal of food science and technology*, 52(12): 7599-607. **23.** Slade P. 2018. If you build it, will they eat it? Consumer preferences for plant-based and cultured meat burgers. *Appetite*, 125: 428-437. **24.** Song W.J., Liu P.P., Meng Z.Q., Zheng Y.Y., Zhou G.H., Li H.X., Din S.J., 2022. Identification of porcine adipose progenitor cells by fluorescence-activated cell sorting for the preparation of cultured fat by 3D bioprinting. *Food Research International* (in press). **25.** Starčević M., Glamočlija N., Janjić J., Baltić B., Nešić K., Marković R., Baltić Ž. M., Izvori proteina za ishranu ljudi i životinja – prošlost, sadašnjost, budućnost. 33 Savetovanje veterinar Srbije, in press. **26.** Warner R.D. 2019. Analysis of the process and drivers for cellular meat production. *Animal*, 13(12): 3041-3058. **27.** Wikipedia: Cultured meat. Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/Cultured_meat/. Accessed 08.07.2022. **28.** Willett W., Rockström J., Loken B., Springmann M., Lang T., Vermeulen S., Murray C. J. 2019. Food in the Anthropocene: the EAT-Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *The Lancet*, 393(10170): 447-492. **29.** Zidarić T., Milojević M., Vajda J., Vihar B., Maver U. 2020. Cultured meat: meat industry hand in hand with biomedical production methods. *Food Engineering Reviews*, 12(4): 498-519.

IZVORI PROTEINA U ISHRANI LJUDI I ŽIVOTINJA – PROŠLOST, SADAŠNJOST, BUDUĆNOST

*Marija Starčević¹, Nataša Glamočlija¹, Jelena Janjić¹, Branislav Baltić²,
Ksenija Nešić³, Radmila Marković¹, Milan Ž. Baltić¹*

Kratak sadržaj

Očekuje se da će zbog povećanja broja stanovnika na svetu do 2050. godine biti potrebno oko 70 procenata više hrane nego što se trenutno proizvodi. Sa rastom populacije, čija ishrana zahteva i unošenje proteina, stočarska proizvodnja će nastaviti da raste, a proteini životinjskog porekla ostaće važan deo ishrane stanovništva. Proizvodnja proteina životinjskog porekla će u budućnosti porasti najvećim delom zahvaljujući povećanoj proizvodnji svinjskog i živinskog mesa. Zbog toga će se povećati i potražnja za proteinima u hranivima zbog toga što svinje i živina imaju veću potrebu za proteinima u hrani u poređenju sa preživarima. Prema tome, potrebe i izazovi u današnjem vremenu biće da se pronađu oni izvori proteina koji će po svojim svojstvima zadovoljiti nutritivne potrebe najvećeg dela stanovništva i životinja, a čija će proizvodnja biti jeftinija i pristupačnija od izvora proteina koji se danas koriste u ishrani ljudi i životinja. Do danas je već nekoliko novih izvora proteina za ishranu ljudi i životinja u upotrebi, a njihov značaj će u budućnosti biti još veći. Kao alternativni proteinski dodaci se sve češće koriste insekti, proteini jednoćelijskih organizama i alge. Pored toga, mikrobnom tehnologijom i biološkom fermentacijom može se poboljšati svarljivost, a samim tim i upotrebna vrednost proteinskih dodataka.

Ključne reči: *alge, insekti, proteini, proteini jednoćelijskih organizama*

UVOD

Do 2050. godine se očekuje da će svetska populacija dostići broj od 9,7 milijardi. Sadašnje procene predviđaju da će nam zbog toga biti potrebno oko 70 procenata hrane više nego što se trenutno proizvodi (FAO, 2009). Struktura stanovništva sveta se menja tako što dolazi do povećanja potrošačke moći velikog broja ljudi, prvenstveno u Aziji. Naime, svet je već dostigao prekretnicu gde se

¹Dr sci. vet. med. Marija Starčević, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Nataša Glamočlija, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Jelena Janjić, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Radmila Marković, redovni profesor; dr sci. vet. med. Milan Ž. Baltić, redovni profesor u penziji, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Branislav Baltić, naučni saradnik, Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, R. Srbija

³Dr sci. vet. med. Ksenija Nešić, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: marijadok@gmail.com

više od polovine stanovništva sada smatra srednjom klasom ili bogatijom i gde većina živi u gradovima. Bez obzira na povećanje broja ljudi koji pripadaju srednjoj klasi, raslojavanje među stanovništvom postojaće i u budućnosti, pa tako veliki deo svetske populacije neće imati dovoljno hrane, posebno one koja je visoko vredna, a to je hrana životinjskog porekla. Poslednji podaci ukazuju da je skoro 690 miliona ljudi u svetu pothranjeno, a predviđanja su da će do 2030. godine taj broj dostići 840 miliona. Oblasti koje su najviše pogođene glađu su Afrika, Azija i delom Latinska Amerika (FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO, 2020). Zato su potrebe i izazovi u današnjem vremenu pronaći one vrste namirnica koje će po svojim svojstvima zadovoljiti nutritivne potrebe najvećeg dela stanovništva, a čija će proizvodnja biti jeftinija i pristupačnija od proizvodnje hrane životinjskog porekla.

Još jedan od problema sa kojima se suočavamo je nedostatak raznolikosti namirnica koje se koriste u ishrani ljudi. Stanovništvo u svojoj ishrani koristi mali broj namirnica, pa se tako 75 procenata svetske proizvodnje hrane dobija od samo 12 vrsta biljaka i 5 vrsta životinja (FAO, 1999). Skoro 60 procenata od ukupnih kalorija, dobijenih iz biljaka, potiče od samo tri biljne vrste: pirinča, kukuruza i pšenice. Nedostatak raznolikosti u ishrani može negativno uticati na naše zdravlje. Iako ljudi, koji pripadaju srednjoj i višoj klasi, mogu unositi dovoljno kalorija, ishrana bogata energijom dovodi do gojaznosti. Pored toga, jednolična ishrana ne može da obezbedi dovoljno vitamina i minerala što rezultira zdravstvenim problemima. Danas postoji lepeza neiskorišćenih vrsta namirnica koje mogu dati raznolike hranljive materije, a osim toga, pružaju jedinstvene ukuse i teksture za izbirljive potrošače. Jedan od načina kojim bi se stanovništvu ponudila raznolikost u ishrani, a sa druge strane i zadovoljile nutritivne potrebe velikog dela siromašne populacije, je da se u ishrani više koriste proteini dobijeni od biljaka, kao i iz drugih izvora (Colgrave i sar., 2021).

IZVORI PROTEINA U ISHRANI LJUDI I ŽIVOTINJA

Proteini su važni makronutritijenti u ishrani ljudi i životinja zbog toga što imaju ključnu ulogu u rastu i fiziološkim procesima u organizmu. U funkcionisanju mišića i organa, kao i enzima, hormona i imunskog sistema važne su sve aminokiseline (Wu, 2009). Aminokiseline su klasifikovane kao esencijalne i neesencijalne, na osnovu toga da li telo može da ih sintetise. Neesencijalne aminokine ljudsko telo može sintetisati *de novo*, dok su jedini izvor esencijalnih aminokiselina proteini u hrani. Stoga je važno obezbediti njihov adekvatan unos hranom. Utvrđena je količina proteina koju stanovništvo starije od 18 godina treba da unese svakog dana, tzv. „preporučeni dnevni unos“, i on iznosi 0,83 g proteina po kg telesne mase. Unos proteina za decu, trudnice, žene koje doje, kao i za stariju populaciju treba da bude veći od količina preporučenih za odrasle. Pored preporučenog unosa ukupnih proteina utvrđene su i dnevne potrebe za svaku esencijalnu aminokiselinu za različite starosne grupe stanovništva (EFSA, 2012).

Proteini u ishrani se razlikuju po hemijskim, biološkim, funkcionalnim i nutritivnim karakteristikama u zavisnosti od izvora i molekularne strukture (Day

i sar, 2022). Opšte je poznato da proteini životinjskog porekla imaju veću nutritivnu vrednost u odnosu na proteine biljnog porekla zbog njihovog aminokiselinskog sastava, svarljivosti i sposobnosti transporta drugih važnih hranljivih materija, kao što su kalcijum i gvožđe. Pored toga, njihova tehnološka svojstva, poput želiranja, emulgovanja i stvaranja pene, daju hrani privlačnu teksturu i senzorna svojstva, pa se smatraju više vrednim u odnosu na proteine biljnog porekla (Colgrave i sar, 2021). Iako su proteini biljnog porekla sve više zastupljeni u ishrani ljudi zbog njihove održivosti, kao i zdravstvenih i etičkih razloga, njihova nutritivna vrednost je manja u odnosu na proteine životinjskog porekla. Naime, proteini biljnog porekla imaju neuravnotežen aminokiselinski sastav i smanjenu ili sporiju svarljivost zbog svoje molekularne strukture (Day i sar, 2022). Pored toga, postoji veliki broj argumenata zašto isključivo biljna ishrana može dovesti do nedostatka hranljivih materija. Neki esencijalni hranljivi sastojci nisu prisutni ili postoje u malim količinama u biljnoj hrani (vitamin B₁₂, jod). Drugi neophodni mikronutritijenti mogu biti prisutni u dovoljnim količinama u biljnoj hrani, kao što su kalcijum (Ca) ili cink (Zn), ali niska dostupnost ovih minerala u mnogim biljkama zbog prisustva fitata ili oksalata, može dovesti do njihovog nedostatka kod ljudi (Adhikari i sar, 2022).

PROTEINI ŽIVOTINJSKOG POREKLA

Upotreba hrane životinjskog porekla u ishrani ljudi ima dugu prošlost. Postoje pretpostavke da se meso koristilo tokom evolucije čoveka još pre 5-7 miliona godina. Upotreba mesa prošla je kroz četiri perioda tokom evolucije čoveka: 1) slučajni lov i jedenje ostataka uginulih životinja, 2) pravi lov koji je počeo pre oko 2 miliona godina, 3) pripitomljavanje i uzgoj životinja, kao i uzgoj poljoprivrednih kultura koje je nastupilo pre oko 10 000 godina i 4) u današnje vreme upotreba hrane životinjskog porekla sa nepovoljnim sastavom masnih kiselina koje su štetne za zdravlje ljudi (Larsen, 2003). Pre oko 2,5 miliona godina preci čoveka su koristili alate od kamena kako bi skidali meso sa životinja. Iako su preci čoveka koristili meso u ishrani, ono nije bilo značajno zastupljeno dok nije započet organizovani lov, pre oko 2 miliona godina (Shipman, 1986). Tada su se grupe lovaca udruživale i hvatale veliki plen, što je omogućilo da se veća količina hrane životinjskog porekla unese u telo. Vrlo je moguće da je lov doprineo da se zdravlje predaka čoveka poboljša, pa je pre oko 2,0-1,7 miliona godina došlo do značajnog rasta (za 33% kod muškaraca i za 37% kod žena) i povećanja telesne težine (za 44% kod muškaraca i za 55% kod žena) (McHenry i Coffing, 2000). Razvoj zemljoradnje, pre oko 10 000 godina, je bio veliki korak unapred za čoveka, zbog toga što se sa preživljavanja dan za danom sakupljanjem plodova i lovom prešlo na organizovanu i sigurniju proizvodnju hrane. Međutim, sa razvojem zemljoradnje došlo je do velike promene u ishrani čoveka, pa je smanjena upotreba mesa, a povećao se unos žitarica. Arheološki dokazi potvrđuju da je u ovom periodu došlo do pogoršanja zdravlja čoveka, tako što se povećala učestalost pojave karijesa, anemija usled nedostatka gvožđa, infekcija i razvoja osteoporoze. Sa razvojem zemljoradnje, ljudi su počeli da se okupljaju oko obradive zemlje, pa je to stvorilo

idealne uslove za prenošenje bolesti (Larsen, 2003). U današnje vreme, upotreba mesa se povećala, a sa tim i učestalost kardiovaskularnih oboljenja. Iako je ishrana savremenog čoveka u mnogome slična ishrani čoveka pre više od 10 000 godina koji je bio lovac i sakupljač, pogoršanje zdravlja ljudi danas se može objasniti manjim unosom mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina, kao i slabijim kretanjem današnjeg čoveka u odnosu na svoje pretke lovce (Cordain i sar., 2002).

Kao što je ranije napomenuto, meso, jaja i mlečni proizvodi imaju izuzetnu nutritivnu vrednost, zato što sadrže visoko vredne proteine, masti (n-3 masne kiseline), ugljene hidrate i mikronutrijente, kao što su raznovrsni minerali (kalcijum, gvožđe i cink) i vitamini. Hranom životinjskog porekla se proizvodi 18% od ukupnih kalorija i 25% od ukupno proizvedenih proteina u svetu. Pothranjenost, koja nastaje zbog nedovoljnog unošenja proteina životinjskog porekla, predstavlja stalan problem u siromašnim zemljama. Dodavanjem proteina životinjskog porekla u ishrani ljudi koji ne unose dovoljno visoko vrednih proteina mogao bi se sprečiti razvoj sarkopenije, osteoporoze i anemije. Sa rastom populacije čija ishrana zahteva i unošenje proteina, stočarska proizvodnja će nastaviti da raste, a proteini životinjskog porekla ostaće važan deo ishrane stanovništva (Colgrave i sar., 2021). Predviđanja su da će se od 2005. do 2050. godine povećati proizvodnja mesa za 57%, a mleka za 48%. Prema tome, stočarska proizvodnja će se od 2010. do 2025. godine povećati za 21% (Kim i sar., 2019). Od ukupne proizvedene hrane životinjskog porekla, goveda čine 45%, živina 31%, a svinje 20% (Mottet i sar., 2017). Proizvodnja proteina životinjskog porekla će u budućnosti rasti, a najvećim delom zahvaljujući povećanoj proizvodnji svinjskog i živinskog mesa. Zbog toga će biti povećana i potražnja za proteinima u hranivima, jer svinje i živina imaju veću potrebu za proteinima u hrani u poređenju sa preživarima (Kim i sar., 2019). Pored toga, upotrebom ribe u ishrani ljudi obezbeđuju se proteini visoke vrednosti, ali i različiti neophodni mikronutrijenti, uključujući vitamine (A, B i D), minerale (kalcijum, jod, cink, gvožđe i selen) i polinezasićene n-3 masne kiseline, kao što su dokozaheksaenska kiselina (DHA) i eikozapentaenske kiseline (EPA). Sa rastom populacije i povećanom svešću potrošača o zdravstvenim prednostima korišćenja ribe u ishrani ljudi, prosečna svetska potrošnja ribe je porasla i iznosi 20 kg godišnje po glavi stanovnika. Ova potražnja za ribom sada daleko prevazilazi održivi prinos iz okeana, pa se akvakulturom snabdeva više od polovine ukupne proizvodnje ribe. Međutim, da bi se povećala proizvodnja ribe iz akvakulture potrebno je prevazići nekoliko izazova, a to su pre svega nedovoljno hrane za ishranu riba, zagađenje životne sredine, smanjen kvalitet vode, bolesti riba, kao i nedovoljno propisa koji se tiču ove grane poljoprivrede (Colgrave i sar., 2021).

Kod svinja se potrebe za proteinima u ishrani razlikuju od starosti i fiziološkog stanja životinje (graviditet, laktacija), a često se određuju prema težini životinje. Dnevne potrebe za lizinom kod svinja se povećavaju sa rastom od 4,0 g/dan do 18,3 g/dan kada životinja dostigne 100 kg telesne težine. Do sada postoji nekoliko esencijalnih aminokiselina koje se dodaju u obrok za svinje, kao što

su lizin, treonin, metionin, triptofan, valin, arginin i izoleucin. Dodavanjem ovih esencijalnih aminokiselina u obrok za svinje može se smanjiti količina potrebnih proteina iz mahunarki, kao i proteina životinjskog porekla. Za ishranu zalučene prasadi koriste se proteini životinjskog porekla iz ćelija krvi, krvno brašno, krvna plazma, obrano mleko u prahu, riblje brašno, mesno i koštano brašno, sporedni proizvodi klanja živine, sušena jaja i koncentrat proteina surutke. Ova proteinska hraniva životinjskog porekla imaju visoku svarljivost hranljivih materija i sadrže funkcionalne proteine koji unapređuju zdravlje odbijene prasadi (Kim i sar, 2019).

Potrebe za proteinima i aminokiselinama u ishrani živine zavise od njihove produktivnosti. Ćurkama i brojlerima potreban je visok sadržaj proteina i aminokiselina u hrani kako bi se zadovoljile njihove potrebe za brzim rastom (National Research Council, 1994). Rasa, smeštaj (kavezni ili podni sistem, gustina naseljenosti), nosivost jaja, temperatura okoline i bolesti utiču na potrebe koka nosilja i pataka za proteinima (Kim i sar, 2019). Potrebe živine za proteinima u hrani se često zadovoljavaju unošenjem 17-22% proteinskih hraniva biljnog porekla, 1-2% proteinskih hraniva životinjskog porekla i dodavanjem 0,2-0,5% sintetičkih aminokiselina (National Research Council, 1994). Mlade ćurke teških linija koje brzo rastu zahtevaju 28% sirovih proteina u ishrani, pa obrok za ćuriće sadrži i više od 50% proteinskih hraniva (sojina sačma i riblje brašno). Za ishranu gusaka i pataka, mogu se koristiti pogače i sačma od semena pamuka i uljane repice kao zamene za sojinu sačmu, dok se riblje brašno retko koristi (Kim i sar, 2019).

U prošlosti se hrana za ribe mesožderke u velikoj meri proizvodila od ribljeg brašna i ribljeg ulja koji su poticali od izlovljenih riba sa otvorenog mora. Stoga, riblje brašno, kao odličan izvor proteina i esencijalnih hranljivih materija za ribu, predstavlja ograničeni prirodni resurs i njegova godišnja proizvodnja iznosi oko 5 miliona tona. Riblje ulje je takođe veoma traženi proizvod zbog bogatstva n-3 masnim kiselinama. Tokom godina akvakultura je preraspodelila upotrebu ovih ograničenih resursa, tako da se danas umesto ribljeg brašna i ribljeg ulja koriste ulja nekih biljaka (soja, kukuruz, uljana repica i pšenično brašno) i sporedni proizvodi životinjskog porekla (brašno od živine, krvno brašno, brašno od perja i mesno-koštano brašno). Međutim, jedan od najvećih izazova danas predstavljaju ograničenja koja postavljaju mnoge zemlje o upotrebi sporednih proizvoda životinjskog porekla kao izvora proteina. Osim visoke cene ribljeg brašna, dostupnost i cena biljnih hraniva često variraju, pa se za ishranu riba sve više koriste hraniva dobijena mikrobiološkim procesima, kao i insekti (Colgrave i sar, 2021).

PROTEINI BILJNOG POREKLA

Biljke su važne u ishrani ljudi zato što predstavljaju izvor ugljenih hidrata, masti, proteina, vlakana, kao i kratkolančanih n-3 masnih kiselina. Soja, pšenica i u manjoj meri grašak i krompir, predstavljaju glavne izvore proteina biljnog porekla. U bliskoj budućnosti, soja će najverovatnije postati osnovni izvor pro-

teina biljnog porekla zbog njenih poželjnih svojstava za preradu (tekstura, ukus i izgled) i kvaliteta hranljivih materija. Soja je, u poređenju sa ostalim vrstama biljaka najpribližnija govedini i mlečnim proizvodima u pogledu sastava aminokiselina i svarljivosti proteina (Colgrave i sar., 2021). Danas se istražuju novi izvori proteina biljnog porekla koji se mogu koristiti u ishrani ljudi, pri čemu treba osigurati da potrošači dobiju sve potrebne esencijalne aminokiseline ishranom zato što mnogim biljkama nedostaju određene esencijalne aminokiseline. Dodatna istraživanja treba da razmotre poboljšanje kvaliteta i količine proteina žitarica (npr. heljde i kinoe) i mahunarki (npr. leblebije, fava pasulja i sočiva) koji se nedovoljno koriste u našoj ishrani. Takođe će postojati potreba za razvojem novih sorti biljaka koje će odgovarati različitim klimatskim regionima i/ili zemljištima. Pored toga, tehnološke inovacije će dovesti do razvoja novih proizvoda bogatih proteinima biljnog porekla, kao što su pekarski proizvodi, testenine, žitarice za doručak i grickalice ili zamene za meso ili mlečne proizvode (Colgrave i sar., 2021).

U ishrani životinja, glavni izvori proteina su proteini dobijeni od uljarica. Od ukupno proizvedenih uljarica, na prvom mestu je sojina sačma sa 226 miliona tona (70%), a zatim sledi sačma uljane repice sa 39 miliona tona (12%) (Kim i sar., 2019). Životinje imaju jedinstvenu sposobnost da ugrade nejestivu ili hranu male vrednosti za ljude u visoko vredne proteine povećavajući dostupnu količinu proteina za ishranu ljudi (Mottet i sar., 2017). Proteinski suplementi su jedan od najskupljih i ograničavajućih sastojaka hrane. Do sada je sojina sačma, kao nuzproizvod ekstrakcije ulja iz soje, bila glavni izvor kvalitetnih proteina za ishranu životinja. Naime, godišnje se 85% svetske proizvodnje soje prerađuje u sojinu pogaču i ulje, od čega se približno 97% koristi kao hrana za životinje (Kim i sar., 2019). Međutim, zbog velikog broja gladnih ljudi u svetu, sve više se razmatra opravdanost hranjenja životinja proteinima soje, kao i upotreba drugih uljarica i žitarica u ishrani životinja koje istovremeno predstavljaju i hranu za ljude. Zbog toga je sve veća potreba da se nova hraniva, kao i novi izvori proteina za životinje pronađu i zamene postojeće (FAO, 2016). Na ponudu hraniva u budućnosti uticaće mnogi faktori, uključujući dostupnost obradivog zemljišta i vode, klimatske promene, troškove energije i mogućnost poboljšanja prinosa (Kim i sar., 2019). Pored toga, potreba za proteinima u hrani može biti smanjena poboljšanjem efikasnosti ishrane životinja i nutritivne vrednosti sastojaka hrane (Mottet i sar., 2017).

Iako se u obrok za svinje najčešće dodaju proizvodi mahunarki, kao proteinska hraniva biljnog porekla se mogu koristiti i sporedni proizvodi mlinarske i pivarske industrije (i do 30%). Antinutritivne materije koje se nalaze u proteinskim hranivima, uključujući inhibitore tripsina, alergene (kao što su glicinin i b-konglicinin) i jedinjenja koja proizvode nadutost (oligosaharidi kao rafinoza), ograničavaju njihovu upotrebu u ishrani podmlatka. Određenim postupcima prerade, npr. fermentacijom ili upotrebom enzima, antinutritivne materije u ovim hranivima se mogu inaktivirati, pa se mahunarke mogu koristiti i u ishrani podmlatka (Kim i sar., 2019). Pošto antimikrobni promotori rasta nisu poželjni

u ishrani svinja, obroke za prasad treba formulisati tako da sadrže malo sirovih proteina kako bi se smanjila pojava dijareje. To se može postići dodavanjem sintetskih aminokiselina u obrok za svinje, pri čemu se smanjuje izlučivanje azota fecesom (Kim i sar., 2019).

Dodavanje većih količina proteinskih hraniva biljnog porekla u obroke za živinu nije moguće zbog prisustva nesvarljivih sastojaka i/ili zbog prisustva antinutritivnih ili toksičnih materija (Kim i sar., 2019). Kao i kod svinja, dodavanjem potrebnih aminokiselina u obrok za živinu može se smanjiti upotreba proteinskih hraniva, kao i zagađenje životne sredine azotom. Kako bi se dovoljne količine hrane za živinu u budućnosti proizvele važno je predvideti porast potrošnje živinskog mesa u narednim decenijama. Nova proteinska hraniva poput upotrebe insekata, proteina jednoćelijskih organizama i algi će u budućnosti imati izuzetan značaj kao proteinski dodaci u ishrani za živinu (Makkar, 2017). Pored toga, mikrobna tehnologija i biološka fermentacija mogu se koristiti za poboljšanje svarljivosti i samim tim upotrebne vrednosti proteinskih dodataka (Kim i sar., 2019).

Za razliku od svinja i živine preživari zadovoljavaju potrebe za aminokiselinama putem dva različita izvora: proteinima iz hrane koji nerazgrađeni prolaze kroz burag i proteinima koje mikroorganizmi sintetišu u buragu (mikrobijalni proteini). Ovi izvori proteina se zatim vare i resorbuju u donjim partijama digestivnog trakta, pri čemu se resorbovane aminokiseline definišu kao metabolički proteini. Mikrobijalni proteini su neophodan izvor proteina za goveda i ovce i mogu da obezbedi približno 70 % od ukupnih potreba za metaboličkim proteinom (Sok i sar., 2017). Pored toga, mikrobnii protein je odličan izvor esencijalnih aminokiselina i za njegovu optimalnu proizvodnju je neophodna istovremena upotreba proteinskih hraniva sa razgrađivim proteinima, kao i fermentirajućih ugljenohidratnih hraniva koji obezbeđuju neophodnu energiju za sintezu proteina u buragu (Schwab i Broderick, 2017). Više od 60 % sirovih proteina se može razgraditi u buragu kako bi se dobio amonijak za rast mikroorganizama. Dok veliku količinu amonijaka, mikroorganizmi mogu iskoristiti u buragu za sintezu proteina, višak amonijaka se može resorbovati u krvotok životinje i izlučiti putem urina i fecesa. Prema tome, preživari imaju slabiju iskoristivost unetog azota putem hrane, pa se kod krava muzara 72 %, tovne junadi 78 % i ovaca 81 % unetog azota, izlučuje putem fecesa i urina. Za sada je najprihvatljiviji pristup da se za ishranu preživara koriste obroci sa manjim sadržajem proteina kako bi se smanjilo izlučivanje azota. U jednoj studiji je utvrđeno da ishrana krava muzara obrocima koji imaju 169 g/kg suve materije sirovih proteina, umesto 183 g/kg suve materije, nije imala negativan uticaj na proizvodnju mleka, ali se izlučivanje azota fecesom i urinom smanjilo za 11% (Kim i sar., 2019).

Kako se proizvodi nedovoljno proteinskih hraniva, akademska zajednica i industrija hrane za životinje, preduzeli su različite pristupe kako bi se poboljšalo snabdevanje njima. Kao prvo, razvijeni su alternativni izvori proteina kao što su proteini insekata i proteini algi kako bi zamenili konvencionalna proteinska hraniva za živinu, svinje i ribu. Zatim se genetskom selekcijom smanjio sadržaj antinutritivnih materija (soja sa nižim sadržajem oligosaharida i kukuruz sa nižim

sadržajem fitata) ili poboljšao sadržaj poželjnih hranljivih materija (soja sa većim sadržajem metionina, kukuruz sa većim sadržajem lizina i većom aktivnošću fitaze). Nadalje, preradom i tretiranjem proteinskih dodataka kao što je uklanjanje oligosaharida ili inhibitora tripsina iz soje, poboljšala se njihova iskoristivost. Na kraju, u obroke za životinje se dodaju aminokiseline, kao i enzimi kako bi se poboljšala svarljivost proteina i smanjila količina dodatih sirovih proteina (Kim i sar., 2019).

IZVORI PROTEINA IZ MORA: ALGE I MORSKE ALGE

Alge su deo ishrane ljudi hiljadama godina i pružaju raznovrsne hranljive materije neophodne za zdravlje čoveka, uključujući vitamine, minerale, vlakna i proteine. Alge se mogu podeliti na mikroalge i makroalge (morske alge). Mikroalge i morske alge u svom metabolizmu troše ugljen-dioksid apsorbujući ga direktno iz mora zajedno sa azotom i fosforom. Značaj algi u ishrani ljudi se ogleda u tome što će biti moguća njihova obimna proizvodnja u zatvorenim proizvodnim sistemima ili bioreaktorima (mikroalge) koji koriste recikliranu vodu i ugljen-dioksid proizveden drugim industrijskim aktivnostima (Caporgno i Mathys, 2018).

Očekuje se da će veći deo rasta proizvodnje proteina algi poticati od dve slatkovodne vrste algi, filamentozne cijanobakterije *Arthrospira platensis* (spirulina) i jednoćelijske zelene alge *Chlorella*. Ove dve alge su prepoznate kao izvor visoko vrednih proteina, jer sadrže i do 70 % proteina u suvoj materiji, kao i sve esencijalne aminokiseline (iako manje količine cisteina i lizina). Pored toga, alge su bogate mineralima, kao što su kalcijum, gvožđe i bakar, n-3 masnim kiselinama, ali su i jedan od retkih neživotinjskih izvora vitamina B₁₂ (Caporgno i Mathys, 2018). Međutim, mogućnosti njihove primene u ishrani ljudi su ograničene intenzivnim pigmentima i ukusom (Colgrave i sar., 2021). Jedan od nedostataka proteina algi je taj što su oni često vezani za ugljene hidrate u ćelijskom zidu i tako ograničavaju dostupnost proteina digestivnim enzimima. Fenolna jedinjenja, koja se nalaze u različitim vrstama algi, vezuju aminokiseline pri čemu se formiraju nerastvorljiva jedinjenja smanjujući svarljivost proteina. Ipak, povećanje svarljivosti proteina algi je moguće nakon primene enzima, temperature ili pritiska kako bi se veze između proteina i drugih jedinjenja raskinule (Kadam i sar., 2013). Pigmenti (npr. karoteni, hlorofili i fikobiliproteini) i ukus algi trenutno ograničavaju količine koje se mogu dodati velikom broju prehrambenih proizvoda. Kao što je ranije pomenuto, tehnologija prerade može izdvojiti proteine ili ukloniti neželjenu boju ili ukus i tako omogućiti njihovu širu primenu (Colgrave i sar., 2021).

Iako je hranljiva vrednost mikroalgi istraživana pedesetih godina prošlog veka, nedavnim istraživanjima je utvrđen njihov potencijal kao sirovine treće generacije za proizvodnju biogoriva, pri čemu se proizvedena biomasa može koristiti kao glavni sastojak hrane za životinje. Mikroalge koje su odmašćene, sadrže približno 20%-45% sirovih proteina sa poželjnim aminokiselinskim sastavom. Dodavanje odmašćenih mikroalgi u obroke za svinje i brojlere od 10% do 15% i za koke nosilje do 25% nije negativno uticalo na proizvodne rezultate i zdravlje

životinja. Pored toga, odmašćene mikroalge su imale pozitivan efekat na sintezu proteina u jetri i mišićima. Odmašćene mikroalge su, ne samo odličan izvor proteina, već i izvor n-3 polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i gvožđa. Međutim, iako se dodavanjem mikroalgi u obrok za junad povećao sadržaj n-3 PUFA u govedini, njihova upotreba je negativno uticala na ukus i boju mesa (Kim i sar., 2019).

INSEKTI KAO IZVOR PROTEINA

Entomofagija ili praksa korišćenja insekata u ishrani je bila deo ljudske istorije hiljadama godina unazad tokom kojih je imala važnu ulogu u nekim kulturnim i verskim obredima širom sveta. Tokom prošlosti, preci *Homo sapiens* i ljudi prvobitne zajednice su koristili insekte u ishrani kao izvor hranljivih materija. Pre nego što su ljudi osmislili alate za lov i sakupljanje hrane insekti su imali značajnu ulogu u ishrani ljudi, što je potvrđeno analiziranjem sastava koproлита – fosilizovanih ostataka izmeta drevnih ljudi (Govorushko, 2019). Prema Yi i sar. (2010), insekti su bili deo ishrane u Kini još pre 3 200 godina. Najraniji pisani tragovi upotrebe insekata u ishrani ljudi u Evropi opisani su u delu Aristotela (384–322 p.n.e.), *Historia Animalium*, u kome je utvrđeno da su ženke cvrčaka imale najbolji ukus nakon parenja zbog prisustva zrelih jaja. U svetim knjigama hrišćanske, jevrejske i islamske religije postoje odeljci vezani za entomofagiju (Govorushko, 2019).

Insekti imaju visoku nutritivnu vrednost, zbog toga što su bogati proteinima koji sadrže esencijalne aminokiseline, a svarljivost im je slična ili malo niža, u odnosu na proteine jaja ili govedine (van Huis, 2013). Insekti su dobar izvor proteina, minerala, vitamina i energije, koštaju manje od proteina životinjskog porekla, a njihovom upotrebom se mogu sprečiti mnogi slučajevi neuhranjenosti kod siromašnog stanovništva. Prednosti gajenja insekata za ishranu ljudi i životinja su što se njima može obezbediti ili dopuniti sve veća potražnja za proteinima. U poređenju sa drugim izvorima hrane, prednost uzgoja insekata je što oni zahtevaju manje prostora i vode, imaju kratak životni ciklus i bolju konverziju hrane. Hranljiviji su za ljude u odnosu na mnoge vrste namirnica, a proizvodi koji se od njih dobijaju mogu se koristiti za ishranu ljudi i životinja. Lako se transportuju, a što se tiče uzgoja insekata povrat uloženi sredstava je brz, zarada je visoka i nije potrebna velika obuka (Govorushko, 2019).

Jestivi insekti imaju veći sadržaj proteina u odnosu na ostale izvore proteina, kao što su govedina, piletina, riba i soja. Hranljiva vrednost insekata može značajno da varira u zavisnosti od vrste, faze rasta i načina ishrane. Tako su odrasli crvi brašnari odličan izvor gvožđa, joda, mangana, magnezijuma i cinka, dok su njihove larve bogate vitaminima B grupe. Jestivi cvrčci su bogat izvor makronutrijenata, proteina (oko 70 %), lipida (7-25 %) i ugljenih hidrata, kao i mikronutrijenata (vitamina). Insekti po svojoj nutritivnoj vrednosti predstavljaju odgovarajuću hranu kako za ljude, tako i za životinje (Imathiu, 2020).

Veliki broj različitih vrsta insekata (preko 2 000) konzumira oko 2 milijarde ljudi svakog dana u više od 100 zemalja. Uprkos dugoj istoriji njihove upotrebe u

ishran, u nekim delovima sveta insekti nisu našli svoje mesto primene u kulinarsstvu zapadne civilizacije. U razvijenim zemljama, potrošači teško prihvataju insekte kao izvor proteina, pa se preradom insekata i izdvajanjem visoko vrednog proteina u obliku praha ova odbojnost može prevazići (Colgrave i sar., 2021). Prihvatanje insekata u ishrani ljudi može biti korisno iz tri razloga, a to su: pozitivan uticaj na zdravlje ljudi, očuvanje životne sredine i ekonomski razlozi. Prednost za zdravlje ljudi se ogleda u tome što su insekti dobra zamena za proteine životinjskog porekla. Mnoge vrste insekata imaju visok sadržaj proteina i dovoljno kalcijuma, gvožđa i cinka, a pored toga, insekti su već deo ishrane mnogih naroda. Prednosti za životnu sredinu su što insekti oslobađaju mnogo manje štetnih gasova koji imaju efekat staklene bašte u odnosu na druge životinje. Uzgoj insekata zahteva daleko manje zemlje i vode nego uzgoj stoke i insekti su hladnokrvne životinje, pa je njihova efikasnost pretvaranja hrane u proteine veoma visoka. Ekonomski i društveni razlozi koji čine uzgoj insekata poželjnijim od uzgoja stoke su što njihovo gajenje ne zahteva visoku tehnologiju i veliko ulaganje, pa i najsiromašniji slojevi društva mogu time da se bave (Govorushko, 2019).

Za ishranu životinja, insekti koji u svojoj ishrani koriste otpatke od hrane, mogu da obezbede značajnu količinu proteina za ishranu riba i stoke. Inače, insekti su prirodna hrana za ribu i živinu. Pet glavnih vrsta insekata su istraženi za proizvodnju proteinskih hraniva i to su: obična kućna muva (*Musca domestica*), crna vojnička muva (*Hermetia illucens*), žuti veliki brašnar (*Tenebrio molitor*), skakavci (*Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*, *Okia speces*) i svilena buba (*Bombyx mori*). Upotreba insekata kao izvora proteina za hranu za životinje se smatra perspektivnom i održivom (Govorushko, 2019).

Dok su prednosti entomofagije mnogobrojne, jedna od najvećih prepreka upotrebe insekata u ishrani ljudi i životinja je bezbednost hrane. Ishrana insekata nosi rizik od hemijskih, fizičkih i bioloških opasnosti i pojave alergija. Opisani su slučajevi trovanja histaminom nakon unošenja prženih insekata koji imaju veći sadržaj histidina (Govorushko, 2019). Mogući rizici od pojave oboljenja, nakon upotrebe insekata u ishrani ljudi i životinja, se mogu prevazići uvođenjem higijenske prakse u ceo lanac proizvodnje insekata kao hrane. Potrebna su dalja istraživanja kako bi se utvrdilo moguće prisustvo toksina ili alergena u insektima koji se koriste za ishranu ljudi i životinja (Colgrave i sar., 2021). Pored toga, postoje zakonske prepreke, koje će u skorijoj budućnosti morati da se prevaziđu kako bi se omogućila šira primena insekata u ishrani ljudi i životinja. Nedavno je EFSA odobrila primenu crva brašnara za ishranu ljudi, pa bi se ovaj insekt uskoro mogao naći u nekoj grickalici, sastojku određenih namirnica ili bio poslužen kao glavno jelo (Colgrave i sar., 2021).

JEDNOĆELIJSKI PROTEIN

Više od četiri decenije, jednoćelijski protein je prepoznat kao moguće proteinsko hranivo za ishranu stoke, posebno za monogastrične životinje. Jednoćelijski proteini se izoluju iz ćelija mikroorganizama, kao osušene ćelije i/ili kao

prečišćeni proteini. Jednoćelijski protein ima visok sadržaj proteina (60-82% težine suve materije), poželjan aminokiselinski sastav, nizak sadržaj masti i veći sadržaj proteina u odnosu na ugljene hidrate (Bratosin i sar., 2021). Pored toga, on sadrži vitamine (tiamin, riboflavin, piridoksin, nikotinsku kiselinu, pantotensku kiselinu, folnu kiselinu, biotin, cijanokobalamin, askorbinsku kiselinu, β -karoten i α -tokoferol), esencijalne aminokiseline, minerale, nukleinske kiseline i lipide (Suman i sar., 2015). Do sada je jednoćelijski protein imao široku primenu u hrani za ljude kao nosač aroma i vitamina, hrani za životinje (svinje, živina, goveda, ribe) i industriji papira i olova (Bratosin i sar., 2021). Iako jednoćelijski protein mogu da proizvode mnogi mikroorganizmi, uključujući bakterije, kvasce i gljivice, samo mali broj se koristi u komercijalne svrhe. Kvasci su verovatno najviše prihvaćeni i korišćeni kao izvor jednoćelijskog proteina. Najčešće korišćene vrste kvasca su *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* i *Saccharomices*. Pored toga, mikroorganizmi mogu da koriste poljoprivredni otpad, kao što su: pirinčana slama, pirinčane ljuske, stajnjak i skrobni ostatak i to kao supstrat za fermentaciju pretvarajući ga u protein visoke vrednosti (Oshoma i Eguakun-Owie, 2018). Postoji nekoliko prednosti kad se koristi otpad za proizvodnju jednoćelijskog proteina, a to su konverzija jeftinog organskog otpada u koristan proizvod i smanjenje zagađenja životne sredine. Celuloza, hemiceluloza i lignin su prirodni otpad poreklom od drveta i predstavljaju supstrat za mikroorganizme, ali prethodno moraju biti hemijski (kisela hidroliza) ili enzimski razgrađeni (celulaze) u šećere koje mikroorganizmi mogu fermentisati. Poljoprivredni otpad može biti odličan supstrat za ekonomičnu proizvodnju jednoćelijskog proteina, pri čemu nastaje proizvod bogat proteinima dobrog kvaliteta i pogodan za hranu za životinje. Nakon obrade, jednoćelijski protein mogu u ishrani da koriste i ljudi (Bratosin i sar., 2021).

Do danas se jednoćelijski protein komercijalno upotrebljava kao dodatak hrani za ishranu koka nosilja, tov živine, junadi, svinja i ribe, zatim kao aditiv za hranu (nosači vitamina i aroma i emulgatori), za poboljšanje nutritivne vrednosti hrane (gotova jela, supe), kao kulture za fermentaciju (pekarski, pivski i vinski kvasac) i u industrijskim procesima, kao sredstvo za stabilizaciju pene i u preradi papira i kože. Jednoćelijski protein se prvenstveno koristi kao proteinski dodatak u ishrani ljudi i životinja i zamena za visoko vredne proteine životinjskog porekla, zbog niske cene proizvodnje, jednostavnog dobijanja i visoke nutritivne vrednosti (Bratosin i sar., 2021).

Različiti supstrati se mogu koristiti za razmnožavanje mikroorganizama kao što su sirovine bogate energijom (gasno ulje, prirodni gas, etanol, metanol, n-alkani i sirćetna kiselina), sirovine poreklom od biljaka (skrob, šećer i celuloza), otpad različitog porekla (sulfitni otpad, melasa, surutka, mleko i voćni otpad) i ugljen dioksid (Bratosin i sar., 2021). Izbor supstrata zavisi od njegove cene, dostupnosti, kiseonika koji je potreban za fermentaciju, količine proizvedene toplote i mogućnosti hlađenja fermentora, ali i troškova vezanih za obradu posle tretmana (Suman i sar., 2015). Odabrani supstrati se koriste za rast mikroorganizama kako bi se povećala njihova masa. Fermentacija je glavni proces odgovoran za proizvodnju jednoćelijskog proteina. Dostupna biomasa se sakuplja kada je

proces fermentacije završen i biomasa se dalje obrađuje prečišćavanjem, razbijanjem ćelija, pranjem i ekstrakcijom proteina da bi se obezbedio njihov visok sadržaj (Bratosin i sar., 2021).

Nutritivne i prehrambene vrednosti jednoćelijskog proteina zavise od mikroorganizama koji se koriste. Sastav aminokiselina proteina dobijenih iz bakterija sličan je proteinima iz mesa riba, a proteini iz kvasaca su slični proteinima iz soje. Mikroorganizmi koji se koriste za proizvodnju jednoćelijskog proteina ne smeju biti patogeni, ne smeju sintetisati toksine, moraju biti brzorastući i proizvoditi veću količinu biomase, biti laki za rukovanje i da se jednostavno odvoju od supstrata (Bratosin i sar., 2021).

Iako jednoćelijski proteini imaju veoma poželjne osobine, postoje ograničenja njihove primene zato što neki mikrobi mogu da proizvode toksična jedinjenja, ćelijski zid im je nesvarljiv i imaju visoku koncentraciju nukleinskih kiselina koje izazivaju određene zdravstvene probleme (Kim i sar., 2019). Jednoćelijski protein sadrži i do 16 % nukleinskih kiselina, što može biti problem ako je namenjen za ishranu ljudi, zbog toga što je preporučen sadržaj nukleinskih kiselina u ishrani ljudi do 2%. Purini koji nastaju razlaganjem nukleinskih kiselina tokom metaboličkih procesa, odgovorni su za povećanje nivoa mokraćne kiseline u krvi, što može dovesti do nastanka gihta i kamena u bubregu. Postupak osposobljavanja jednoćelijskog proteina za ishranu ljudi podrazumeva i razvijanje poželjne arome i ukusa proizvoda, što čini proces manje isplativim. Pored toga, jednoćelijski protein može izazvati alergijske reakcije kod nekih ljudi koji imaju osetljiv sistem organa za varenje. Otpadni materijali koji se koriste kao supstrat za proizvodnju jednoćelijskog proteina mogu da sadrže nepoznate supstance koje mogu izazvati druge zdravstvene probleme. Osim toga, jednoćelijski proteini imaju nedovoljno aminokiselina koje sadrže sumpor (metionin i cistein), pa je neophodno dodavanje ovih aminokiselina. Međutim, ukoliko se obrati pažnja na ove nedostatke i oni uklone, jednoćelijski proteini predstavljaju odličan proteinski dodatak ishrani ljudi i životinja zbog svoje nutritivne vrednosti i u budućnosti će njihova upotreba biti veća (Bratosin i sar., 2021).

ZAKLJUČAK

Nedovoljna proizvodnja proteina za ishranu ljudi i životinja danas predstavlja sve veći problem. Sa porastom broja stanovnika u budućnosti, potrebe za proteinima u ishrani ljudi i životinja, će se značajno povećati. Trenutna istraživanja akademske zajednice usmerena su ka pronalaženju što većeg broja novih izvora proteina za ishranu ljudi i životinja, kao što su alge, insekti i jednoćelijski proteini. Međutim, pronalaženje novih izvora proteina neće zadovoljiti potrebe ljudi i životinja za proteinima, ukoliko se i novi načini prerade ovih proteina ne primene i tako poveća njihova svarljivost i bezbednost. Osim toga, nove tehnologije proizvodnje proteina treba da omoguće upotrebu sporednih proizvoda različitih industrija kako bi se smanjila količina otpada i zagađenje prirode, a proizvod bio jeftin i pristupačan za sve.

Zahvalnica:

Ovu studiju podržalo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u skladu sa odredbama Ugovora o finansiranju istraživanja (br. 451-03-68/2022-14/200143).

LITERATURA

1. Adhikari S., Schop M., de Boer I.J.M., Huppertz T. 2022. Protein Quality in Perspective: A Review of Protein Quality Metrics and Their Applications. *Nutrients*, 14:947. <https://doi.org/10.3390/nu14050947>. 2. Bratosin B.C., Darjan S., Vodnar D.C. 2021. Single Cell Protein: A Potential Substitute in Human and Animal Nutrition. *Sustainability*, 13:9284. <https://doi.org/10.3390/su13169284>. 3. Caporgno M.P., Mathys A. 2018. Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Frontiers in Nutrition*, 5:58. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00058>. 4. Colgrave M.L., Dominik S., Tobin A.B., Stockmann R., Simon C., Howitt C.A. et al. 2021. Perspectives on Future Protein Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69:15076–15083. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05989>. 5. Cordain L., Eaton S.B., Brand Miller J., Mann N., Hill K. 2002. The paradoxical nature of hunter-gatherer diets: meat-based, yet nonatherogenic. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56:S42–52. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601353>. 6. Day L., Cakebread J.A., Loveday S.M. 2022. Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 119:428–442. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.020>. 7. European Food Safety Authority 2012. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. *EFSA Journal*, 10(2):2557. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2557>. 8. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1999. Women: Users, Preservers and Managers of Agrobiodiversity. Rome, Italy. <https://www.fao.org/gender/en/>. 9. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2009. How to Feed the World in 2050: High-Level Expert Forum. Rome, Italy, Oct 12–13. 10. Food and Agriculture Statistics, 2016. Food and Agriculture Data, Rome: Food Agric. Organ. <http://www.fao.org/statistics/en/>. 11. FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO, 2020. The State of Food Security and Nutrition in the World 2020: Transforming Food Systems for Affordable Healthy Diets, Rome, Italy, healthy diets. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9692en>. 12. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2016. FAOSTAT, Food and Agriculture Data. <http://www.fao.org/statistics/en/>. 13. Govorushko S. 2019. Global status of insects as food and feed source: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 91:436–445. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.032>. 14. Imathiu S. 2020. Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. *NFS Journal*, 18:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.11.002>. 15. Kadam S.U., Tiwari B.K., O'Donnell C.P. 2013. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:4667–4675. <https://doi.org/10.1021/jf400819p>. 16. Kim S.W., Less J.F., Wang L., Yan T., Kiron V., Kaushik S.J., Lei X. G. 2019. Meeting Global Feed Protein Demand: Challenge, Opportunity, and Strategy. *Annual Review of Animal Biosciences*, 15:221–243. doi: 10.1146/annurev-animal-030117-014838. 17. Makkar H.P.S., 2017. Review: feed demand landscape and implications of food-not-feed strategy for food security and climate change. *Animal*, 12:1744–1754. <https://doi.org/10.1017/S175173111700324X>. 18. McHenry H.M., Coffing, K., 2000. Australopithecus to Homo: transformations in body and

mind. *Annual Review of Anthropology*, 29:125–46. <https://doi.org/10.1146/annurev.anthro.29.1.125>. **19.** Mottet A., de Haan C., Falcucci A., Tempio G., Opio C., Gerber P., 2017. Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Global Food Security*, 14:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.01.001>. **20.** National Research Council, 1994. *Nutrient Requirements of Poultry: Ninth Revised Edition*, 1994. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/2114>. **21.** Os-homa C E., Eguakun-Owie S.O. 2018. Conversion of food waste to single cell protein using *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 22:350–355. <https://doi.org/10.4314/jasem.v22i3.10>. **22.** Schwab C.G., Broderick G.A., 2017. A 100-year review: protein and amino acid nutrition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100:10094–112. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13320>. **23.** Shipman P. 1986. Scavenging or hunting in early hominids: theoretical framework and tests. *American Anthropologist*, 88:27–43. <https://www.jstor.org/stable/679277>. **24.** Sok M., Ouellet D.R., Firkins J.L., Pellerin D., Lapierre H. 2017. Amino acid composition of rumen bacteria and protozoa in cattle. *Journal of Dairy Science*, 100:5241–5249. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-1244>. **25.** Suman G., Nupur M., Anuradha S., Pradeep B., 2015. Single Cell Protein Production: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4: 251–262. **26.** van Huis A., 2013. Potential of Insects as Food and Feed in Assuring Food Security. *Annual Review of Entomology*, 58:563–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>. **27.** Wu G. 2009. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37:1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>. **28.** Yi C., He Q., Wang L., Kuang R., 2010. The utilization of insect-resources in Chinese rural area. *Journal of Agricultural Science*, 2:146–154. <https://doi.org/10.5539/jas.v2n3p146>.

BIOAKTIVNI PEPTIDI IZ MLEKA

Jasna Đorđević, Tijana Ledina, Marija Kovandžić, Snežana Bulajić

Kratak sadržaj

Bioaktivni peptidi su funkcionalne komponente proteina mleka, koji su u okviru matičnog proteina neaktivni, ali se dejstvom proteolitičkih enzima u gastrointestinalnom traktu ili primenom određenih tehnoloških postupaka, oslobađaju iz proteina. Tako aktivirani mogu imati uticaj na različite fiziološke i metaboličke funkcije u organizmu ljudi, kao što su antimikrobna, antioksidativna, antihipertenzivna, antitrombotična, imunomodulatorna, anticitotoksična aktivnost i druge. Antimikrobno dejstvo bioaktivnih peptida je važan deo nespecifičnog imuniteta, posebno na površini sluzokože tankog creva. Takođe, bioaktivni peptidi imaju sposobnost da podstiču aktivnost antioksidativnih enzima (katalaze, superoksid dismutaze i glutation peroksidaze), mogu imati antiinflamatorno dejstvo, kao i da podstiču lučenje insulina. Zbog brojnih različitih pozitivnih efekata na zdravlje ljudi, modulacijom ili poboljšanjem fizioloških funkcija, proteini mleka, kao izvor bioaktivnih peptida, imaju potencijal za komercijalnu upotrebu u proizvodnji kako konvencionalne, tako i funkcionalne i medicinirane hrane ili dijetetskih suplemenata. Međutim, s obzirom da su rezultati većine istraživanja dobijeni u in vitro uslovima, postoji potreba za istraživanjima in vivo kako bi se u potpunosti ispitalo dejstvo bioaktivnih peptida na različite fiziološke funkcije.

Ključne reči: bioaktivni peptidi, funkcionalna hrana, proteini mleka

UVOD

Bioaktivni peptidi su specifične funkcionalne komponente proteina, neaktivne unutar matičnog proteina, ali nakon aktiviranja mogu uticati na različite fiziološke i metaboličke procese, odnosno na zdravlje ljudi (Kitts i Weiler, 2003). Bioaktivni peptidi se mogu aktivirati dejstvom proteaza iz mleka, digestivnih enzima ili enzima koje oslobađaju mikroorganizmi iz gastrointestinalnog trakta, enzima koje proizvode starteri ili primenom određenih tehnoloških postupaka (Picariello i sar., 2010; Espejo-Carpio i sar., 2018; El-Sayed i Awad, 2019). Na osnovu fiziološke funkcije koju vrše u organizmu ljudi, bioaktivni peptidi mogu imati antihipertenzivnu, antimikrobnu, antioksidativnu, antitrombotičnu, opioidnu, imunomodulatornu, mineral-vezujuću ili antidijabetičnu ulogu. Zbog broj-

¹Dr sci. vet. med. Jasna Đorđević, asistent; dr sci. vet med. Tijana Ledina, docent; dr vet. Marija Kovandžić, istraživač-pripravnik; dr sci. vet med. Snežana Bulajić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: jasna.djordjevic@vet.bg.ac.rs

nih različitih pozitivnih efekata na zdravlje ljudi, modulacijom ili poboljšanjem fizioloških funkcija, proteini mleka kao izvor bioaktivnih peptida imaju potencijal za komercijalnu upotrebu u proizvodnji, kako konvencionalne, tako i funkcionalne i medicinirane hrane ili dijetetskih suplemenata (Muro i sar., 2011).

DOBIJANJE BIOAKTIVNIH PEPTIDA IZ MLEKA

Najčešći način dobijanja bioaktivnih peptida je enzimska hidroliza molekula proteina iz mleka različitih životinjskih vrsta, kao i iz proizvoda od mleka: jogurta, kefira i sireva. Jedan od načina dobijanja bioaktivnih peptida iz proteina mleka, kazeina ili proteina surutke je enzimska digestija, dejstvom enzima poreklom iz gastrointestinalnog trakta, u cilju imitiranja prirodnog procesa. Mnogi bioaktivni peptidi, kao što su bioaktivni peptid inhibitor angiotenzin-konvertujućeg enzima, kalcijum-vezujući fosfopeptid, različiti antibakterijski, imunomodulatorni i opioidni peptidi iz kazeina i proteina surutke mogu se dobiti na ovaj način (Yamamoto i sar., 2003; Gobetti i sar., 2007). Izolacija bioaktivnih peptida, inhibitora angiotenzin-konvertujućeg enzima iz proteina surutke, može biti malo komplikovaniji proces, u odnosu na proces dobijanja iz kazeina, zbog rigidne strukture β -laktoglobulina i velike otpornosti na digestivne enzime, kao što su pepsin ili pankreatin (Saito, 2008).

Drugi način dobijanja bioaktivnih peptida iz mleka je fermentacija usled aktivnosti bakterija mlečne kiseline. Proteinaze bakterija mlečne kiseline mogu hidrolizovati više od 40 odsto peptidnih veza α 1- i β -kazeina, aktivnošću svog proteolitičkog sistema, pri čemu nastaju oligopeptidi sa 4 do 40 aminokiselina (El-Sayed i Awad, 2019). Bioaktivni peptidi se mogu aktivirati i dejstvom proteinaza startera i nestarterskih bakterija mlečne kiseline. Proteolitički sistem bakterija koje se najčešće koriste u industriji mleka (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus*) su danas dobro poznati, što olakšava sam proces dobijanja. Proteolitički sojevi *Lactobacillus helveticus*-a, koji se koristi za proizvodnju ementaler sira, imaju sposobnost oslobađanja bioaktivnih peptida koji imaju funkciju inhibicije angiotenzin-konvertujućeg enzima. Najpoznatiji peptidi sa ovom funkcijom su valin-prolin-prolin (VPP) i izoleucin-prolin-prolin (IPP) i izolovani su iz fermentisanog mleka u koje je kao starter dodat *Lb. helveticus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus* i *Bifidobacterium lactis* takođe imaju sposobnost hidrolize β -laktoglobulina pri čemu se oslobađaju bioaktivni peptidi koji imaju funkciju inhibicije angiotenzin-konvertujućeg enzima (El-Sayed i Awad, 2019).

ANTIHIPERTENZIVNA AKTIVNOST

Antihipertenzivna aktivnost je jedno od najčešće opisanih svojstava bioaktivnih peptida poreklom iz mleka i proizvoda od mleka. Angiotenzin je polipeptidni hormon, moćan vazokonstriktor, koji utiče na arterijski krvni pritisak kontrolom kontrakcije glatke muskulature krvnih sudova (Park, 2009). Angio-

tenzin-konvertujući enzim konvertuje angiotenzin I u angiotenzin II, potentni vazokonstriktor, a u isto vreme inhibira bradikinin i enkefaline koji imaju funkciju vazodilatacije, pri čemu dolazi do povećanja arterijskog krvnog pritiska. Bioaktivni peptidi iz mleka imaju sposobnost inhibicije ovog enzima i na taj način utiču na snižavanje arterijskog krvnog pritiska. Više različitih inhibitora angiotenzin-konvertujućeg enzima je identifikovano *in vitro* enzimskom digestijom proteina mleka, a u zavisnosti od toga da li su dobijeni iz kazeina ili proteina surutke, u literaturi se nazivaju kazokinini ili laktokinini (Park i Nam, 2015). Zbog ovakve aktivnosti bioaktivnih peptida iz mleka, sve češća je njihova upotreba u istraživanjima u kojima se radi na formulaciji novih proizvoda. Ong i Sha (2008) su u svojim radovima opisali kako dodatak *Lactobacillus acidophilus* mleku namenjenom za proizvodnju sira povećava sadržaj bioaktivnih peptida iz k-kazeina (f96-102), α_1 -kazeina (f 1-9; f 1-7; f 24-32), α_s -kazeina (f 1-7) i β -kazeina (f 193-209). Svi ovi bioaktivni peptidi mogu uticati na smanjenje arterijskog krvnog pritiska inhibicijom angiotenzin-konvertujućeg enzima. Slično ovom istraživanju, u mleko su dodavali *Lactobacillus helveticus* kako bi povećali udeo bioaktivnih peptida sa antihipertenzivnom funkcijom, zbog čega se ova kultura koristi za proizvodnju fermentisanog mleka koje je bogato izoleucin-prolin-prolin (IPP) i valin-prolin-prolin (VPP), bioaktivnim peptidima koji imaju sposobnost snižavanja krvnog pritiska kod ljudi (Cicero i sar., 2013; Beltrán-Barrientos i sar., 2016). Takođe, Xue i saradnici (2018) su ustanovili da bioaktivni peptid YQKFPQYLQY iz kazeina kravljeg mleka, ima sposobnost snižavanja krvnog pritiska kod pacova.

ANTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Najbolje opisani proteini kravljeg mleka sa antibakterijskom aktivnošću su laktoferin, laktoperoksidaza i lizozim. Međutim, istraživanja su dokazala da je antibakterijski efekat mleka veći od zbira antibakterijskih efekata pojedinačnih proteina. Ovo se pripisuje upravo aktivnosti bioaktivnih peptida, koji se nalaze u sklopu ovih proteina. Katjonska priroda bioaktivnih peptida dovodi do vezivanja i nakupljanja bioaktivnih peptida na negativno naelektrisanu površinu membrane patogenih bakterija, dok hidrofobna strana dolazi u kontakt sa hidrofobnim komponentama bakterijske membrane. Nakon vezivanja, dolazi do strukturnih promena, ulaska peptida u bakterijsku ćeliju i lize (Seo i sar., 2012; Teixeira i sar., 2012). Bioaktivni peptidi sa antibakterijskom aktivnošću se obično sastoje od manje od 50 aminokiselina, od kojih je 50 odsto hidrofobne prirode i molekulske mase ispod 10 kDa i mogu se dobiti *in vitro* enzimskom hidrolizom (El-Sayed i Awad, 2019). Najpoznatiji je laktofericin, bioaktivni peptid koji potiče iz laktoferina. Utvrđeno je da laktofericin ispoljava antimikrobnu aktivnost protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija i kvasaca (Korhonen i Pihlanto, 2007). Brojna istraživanja su sprovedena, a i dalje se sprovode u cilju otkrivanja, prečišćavanja i karakterizacije što većeg broja bioaktivnih peptida i njihove primene u industrijskoj proizvodnji hrane. Ispitivana je antimikrobna aktivnost bioaktivnih peptida poreklom iz proteina surutke ovčijeg mleka, pri čemu je

utvrđeno da su hidrolizati proteina inhibirali rast *Escherischia coli* HB101, *Escherichia coli* Cip812, *Bacillus subtilis* Cip5265 i *Staphylococcus aureus*, ali nije identifikovana molekularna struktura dobijenih bioaktivnih peptida. Hidrolizat dobijen nakon hidrolize proteina surutke kozijeg mleka *in vitro*, takođe je imao antimikrobno dejstvo na *E.coli* i *Bacillus cereus*, ali je utvrđena razlika u aktivnosti u odnosu na različite procese hidrolize.

ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Oksidativnim procesima dolazi do stvaranja slobodnih radikala, koji mogu dovesti do inhibicije enzima superoksid-dismutaze, katalaze i peroksidaze i izazvati destruktivne promene usled oksidacije lipida, ćelijskih proteina i DNK. Lipidna peroksidacija hrane dovodi do užeglog ukusa, a oksidativni stres u organizmu igra značajnu ulogu u nastanku mnogih oboljenja (Pihlanto, 2006). Uklanjanje slobodnih radikala koji nastaju tokom procesa oksidacije i dovode do ovakvih promena, predstavlja glavnu ulogu antioksidativnih materija u hrani. Utvrđeno je da bioaktivni peptidi dobijeni iz proteina mleka imaju antioksidativno dejstvo. Istraživanja bioaktivnih peptida koji u svom sastavu imaju histidin, ukazala su da oni imaju sposobnost vezivanja jona metala i slobodnih radikala. Slično antibakterijskoj aktivnosti, sposobnost peptidnih hidrolizata da inhibiraju štetne promene nastale oksidacijom lipida povezana je sa prirodom i sastavom dobijenih peptidnih frakcija, ali i specifičnosti proteolitičkih procesa usled kojih se dobijaju bioaktivni peptidi (Pihlanto, 2006). Bioaktivni peptidi iz hrane koji imaju antioksidativnu aktivnost smatraju se bezbednim jedinjenjima sa malom molekulskom masom, visokom aktivnošću, a velikom stabilnošću i lakom apsorpcionom sposobnošću, zbog čega bi mogli imati prednost u odnosu na antioksidanse enzimske prirode. Dostupni rezultati istraživanja ukazali su da postoji više različitih bioaktivnih peptida sa antioksidativnom aktivnošću poreklom iz proteina mleka, veličine 5 do 11 aminokiselina, uključujući hidrofobne aminokiseline prolin, histidin, tirozin i triptofan. Tretman ovim bioaktivnim peptidima iz proteina mleka, doveo je do poboljšanja aktivnosti antioksidativnih enzima, katalaze, superoksid-dismutaze, glutation-S-tranferaze i glutation-peroksidaze i do smanjenja koncentracije glutationa, kod zdravih i pacova sa dijabetesom (Awad i sar., 2016).

ANTITROMBOGENA AKTIVNOST

Bioaktivni peptidi koji imaju antitrombogenu aktivnost smanjuju ili sprečavaju formiranje krvnih ugrušaka. Dva najviše istražena bioaktivna peptida sa antitrombogenom funkcijom su kazoplatelin i κ -kazeinoglikopeptid (106-171). Kazoplatelin, bioaktivni peptid poreklom iz kazeinomakropeptida, smanjuje agregaciju aktiviranih trombocita, ali i vezivanje γ lanaca fibrinogena za receptore na površini krvnih ugrušaka. Kazeinoglikopeptid - κ (106-171) smanjuje agregaciju trombina kod kolagenom indukovanih ugrušaka (Park i Nam, 2015).

ANTIDIJABETIČNA AKTIVNOSTI

Brojna istraživanja su dokazala da konzumacija kazeina i proteina surutke dovodi do povećanog lučenja insulina (Nilsson i sar., 2007), ali je takođe utvrđeno da unos hidrolizata proteina mleka *in vivo* dovodi do bržeg lučenja insulina u poređenju sa unošenjem celih proteina mleka, što ukazuje na aktivnost bioaktivnih peptida koji se nalaze u sastavu proteina (Power i sar., 2009). Autori objašnjavaju uticaj mleka i proizvoda od mleka na lučenje insulina i kontrolu glikemije visokim udelom esencijalnih aminokiselina i bioaktivnih peptida koji stimulišu lučenje insulina, specifičnom kombinacijom makro i mikronutrijenata, kao i delovanjem mikrobiote, odnosno prisustvom bakterijskih sojeva, koji utiču na oslobađanje i aktivnost bioaktivnih peptida. Istraživanja koja su rađena na pacovima, dokazala su da bioaktivni peptidi iz mleka (VAGTWY) i Gauda sira (LPQNIPPL) smanjuju nivo glukoze u krvi (Vargas-Bello-Pérez i Márquez-Hernández, 2019). Bioaktivni peptidi izoleucin-prolin-alanin (ILE-PRO-ALA), kao i LPQNIPPL, dobijeni iz β -laktoglobulina inhibiraju aktivnost dipeptidil - peptidaze 4, usled čega se smanjuje nivo glukoze u krvi i stimuliše lučenje insulina (Tulipano i sar., 2011).

OSTALE AKTIVNOSTI BIOAKTIVNIH PEPTIDA IZ MLEKA

Za sada su identifikovana 4 bioaktivna peptida koja imaju hipoholestere-mičnu aktivnost i to svi poreklom iz hidrolizata β -lakoglobulina (f 9-14; f41-60; f71-75; f142-146). Mehanizam ovog efekta još nije poznat. Bioaktivni peptidi iz mleka mogu imati i opioidnu aktivnost. Opioidni bioaktivni peptidi su ligandi opioidnih receptora sa agonističkim ili antagonističkim delovanjem (Park, 2009). Bioaktivni peptidi α ₁-kazein-egzorfina (α ₁-kazein f90-96), β -kazomorfin 7 i 5 (β -kazein f60-66 i f60-64) i laktorfina (α -lakalbumin f50-53 i β -laktoglobulin f102-105) imaju agonističko, dok kazoksini (k-kazein f35-42, f58-61 i f25-34) antagonističko dejstvo (Gobbetti i sar., 2007). Bioaktivni peptidi iz mleka, takođe mogu uticati na smanjenje apetita. Proteini surutke se dovode u vezu sa snižavanjem LDL holesterola, a takođe i sa smanjenjem apetita usled povećanog oslobađanja hormona holecistokinina. Pretpostavlja se da bioaktivne funkcije proteina surutke upravo proističu iz kombinacije aktivnih frakcija proteina ili pojedinih sekvenci aminokiselina. Upravo ova aktivnost bioaktivnih peptida iz proteina surutke predstavlja veliki potencijal u industriji hrane, kao značajnog sastojka novih funkcionalnih proizvoda (Park i Nam, 2015). Pored navedenih, bioaktivni peptidi poreklom iz kazeina i proteina surutke imaju i imunomodulatornu ulogu, utiču na proliferaciju limfocita, sintezu antitela i regulaciju citokina (Park i Nam, 2015). Nekoliko studija je dokazalo da bioaktivni peptidi iz mleka imaju pozitivan uticaj na pacijente sa malignim oboljenjima. Castro i saradnici (2009) su primetili da se aktivnost kaspaze 3, značajno povećala u ćelijama melanoma B16F10 kada su rasle u medijumu koji je sadržao izolat proteina surutke. Kaspaze su odgovorne za cepanje ćelijskih proteina, što dovodi do tipičnih promena koje se javljaju u ćelijama koje prolaze kroz apoptozu (Zhao i sar., 2018). Za sada su ova istraživanja izvođena isključivo u *in vitro* uslovima. Takođe je opisano da

bioaktivni peptidi, β -kazomorfini i k-kasecidini imaju antitumorska svojstva u *in vitro* uslovima i da mogu dovesti do lize malignih ćelija (ćelija melanoma, ćelija raka dojke, ćelija leukemije), što je dokazano i istraživanjima u kojima je upotreba jogurta koji sadrže ove peptide smanjila pojavu raka debelog creva (Tidona i sar., 2009; Sah i sar., 2015).

PRIMENA BIOAKTIVNIH PEPTIDA U INDUSTRIJI HRANE

Među potrošačima postoji sve veća svest i interesovanje za bioaktivne peptide, kao sastojke hrane koji mogu poboljšati zdravlje ljudi. Nekoliko bioaktivnih peptida je već komercijalno proizvedeno i postoji na tržištu, a postoji i funkcionalna hrana obogaćena bioaktivnim peptidima. Međutim, veoma mali broj studija je sproveden u *in vivo* uslovima, da bi se procenio efekat bioaktivnih peptida u matriksu hrane. Takođe je bilo pokušaja da se bioaktivni peptidi inkorporiraju u fermentisane proizvode od mleka na kraju procesa fermentacije, kada je pH vrednost u opsegu 4,25-4,5 (Hafeez i sar., 2014). Međutim, postoje problemi vezani za direktnu inkorporaciju bioaktivnih peptida u hranu. Pitanje stabilnosti, moguća interakcija peptida sa komponentama hrane, kao i različiti tehnološki postupci mogu smanjiti njihovu bioaktivnost. Može postojati i problem senzornih osobina hrane sa dodatkom bioaktivnih peptida. Da bi se prevazišli ovi problemi, postoji mogućnost kombinovanja sa stabilnim nosačima ili inkapsulacije peptida (Peghambardoust i sar., 2021). Pored stabilnosti, postavlja se pitanje bezbednosti bioaktivnih peptida u hrani, odnosno mogućnost formiranja alergeni ili toksičnih peptida (Liu i sar., 2020). Uprkos činjenici da se većina bioaktivnih peptida izoluje iz hrane, većina još uvek nije konzumirana od strane ljudi, zbog čega se ne može sa sigurnošću tvrditi da su bezbedni. Tokom procesa dobijanja, koriste se enzimi ili supstance koji se prirodno ne nalaze u gastrointestinalnom traktu ljudi, pa upravo zbog toga nema ni podataka o njihovoj mogućoj toksičnosti, odnosno upotreba im je i dalje ograničena. Zbog svega navedenog su neophodna istraživanja koja bi utvrdila dozu unosa, učestalost i dužinu primene.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Awad S., El-Sayed M.I., Wahba A., El Attar A., Yousef M.I. Zedan M. 2016. Antioxidant activity of milk protein hydrolyate in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Dairy Science*, 99:8499-510. 2. Beltrán-Barrientos L.M., Hernández-Mendoza A., Torres Llanez M.J., González-Córdova A.F., Vallejo-Córdoba B. 2016. Fermented milk as antihypertensive functional food. *Journal of Dairy Science*, 99:4099-110. 3. Castro G., Maria D., Bouhallab S., Sgarbieri V. 2009. In vitro impact of a whey protein isolate (WPI) and collagen hydrolysates (CHs) on B16F10 melanoma cells proliferation. *Journal of Dermatological Science*,

56:51-7. **4.** Cicero A., Aubin F., Azais-Braesco V., Borghi C. 2013. Do the lactotripeptides isoleucine-proline-proline and valine-proline-proline reduce systolic blood pressure in European subjects? A meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Hypertension*, 26:442-9. **5.** El-Sayed M., Awad S. 2019. Milk Bioactive Peptides: Antioxidant, Antimicrobial and Anti-Diabetic Activities- Review Article. *Advances in Biochemistry*, 7(1):22-33. **6.** Espejo-Carpio F., Pérez-Gálvez R., Guadix A., Guadix E. 2018. Artificial neuronal networks (ANN) to model the hydrolysis of goat milk protein by subtilisin and trypsin. *Journal of Dairy Research*, 85:339-46. **7.** Gobetti M., Minervini F., Rizzello C.G. 2007. Bioactive Peptides in Dairy Products. In *Handbook of food products manufacturing*. Ed. Y.H.Hui, Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc, 489-517. **8.** Hafeez Z., Cakir-Kiefer C., Roux E., Perrin C., Miclo L., Dary-Mourot A. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalise fermented milk products. *Food Research International*, 63:71-80. **9.** Kitts D.D., Weiler K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9:1309-23. **10.** Korhonen H., Pihlanto A. 2007. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9:1297-308. **11.** Liu L., Li S., Zheng J., Bu T., He G., Wu J. 2020. Safety considerations on food protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 96:199-207. **12.** Muro U., Álvarez F., Rodríguez R., Cuenca A., Jurado T. 2011. Review: production and functionality of active peptides from milk. *Food Science and Technology International*, 17: 293-317. **13.** Nilsson M., Holst J.J., Bjorck I.M. 2007. Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85:996-1004. **14.** Ong L., Shah N.P. 2008. Release and identification of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides as influenced by ripening temperatures and probiotic adjuncts in Cheddar cheeses. *Journal of Food Science and Technology*, 41:1555-66. **15.** Park Y.Q., Nam M.S. 2015. Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: Review. *Korean Journal of Food Science*, 35(6):831-40. **16.** Park Y.W. 2009. Bioactive components of goat milk. In *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*. Ed. Y.W.Park. Wiley-Blackwell Publishers, Ames, Iowa and Oxford, England. 43-82. **17.** Peighambaroust S.H., Karami Z., Pateiro M., Lorenzo J.M. 2021. A Review on Health-Promoting, Biological, and Functional Aspects of Bioactive Peptides in Food Applications. *Biomolecules*, 11:631. **18.** Picariello G., Ferranti P., Fierro O., Mamone G., Cairra S., Di Luccia A. et al. 2010. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications. *Journal of Chromatography*, B878:295-308. **19.** Pihlanto A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16:1306-14. **20.** Power O., Hallihan A., Jakeman P. 2009. Human insulinotropic response to oral ingestion of native and hydrolysed whey protein. *Amino Acids*, 37:333-9. **21.** Sah B.N.P., Vasiljevic T., Mckechnie S. Donkor O.N. 2015. Identification of anticancer peptides from bovine milk proteins and their potential roles in management of cancer: a critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14:123-38. **22.** Saito T. 2008. Antihypertensive Peptides Derived from Bovine Casein and Whey Proteins. In *Bioactive Components of Milk*. Ed. Z. Bösze, Springer. New York. **23.** Seo M., Won D., Kim H.S., Mishig-Ochir J.H., Lee B.J. 2012. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. *Molecules*, 17:12276-86. **24.** Teixeira V., Feio M.J., Bastos M. 2012. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51:149-77. **25.** Tidona F., Criscione A., Guastella A.M., Zuccaro A., Bordonaro S., Marletta D. 2009. Bioactive peptides in dairy products. *Italian Journal of Animal Science*, 8:315-340. **26.** Tulipano G., Sibilia V., Caroli A.M., Cocchi D.

2011. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase- 4) inhibitors. *Peptides*, 32(4):835-8. **27.** Vargas-Bello-Pérez E., Márquez-Hernández R.I. 2019. Bioactive peptides from milk: animal determinants and their implications in human health. *Journal of Dairy Research*, 86:136-144. **28.** Xue L., Wang X., Hu Z., Wu Z., Wang L., Wang H., Yang M. 2018. Identification and characterization of an angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein. *Peptides*, 99:161-68. **29.** Yamamoto N., Ejiri M., Mizuno S. 2003. Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*, 9:1345-55. **30.** Zhao R., Kaakati R., Lee A.K., Liu X., Li F. Li C.Y. 2018. Novel roles of apoptotic caspases in tumor repopulation, epigenetic reprogramming, carcinogenesis, and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*, 37:227-236.

UTICAJ PANDEMIJE COVID-19 NA BEZBEDNOST HRANE

**Nevena Grković, Milijana Babić, Nikola Čobanović, Ivan Vičić,
Neđeljko Karabasil, Branko Suvajdžić, Mirjana Dimitrijević**

Kratak sadržaj

Pandemija izazvana virusom COVID-19 u 2020. godini je suočila svet sa zdravstvenom krizom koja je ostavila nemerljive zdravstvene, socijalne i ekonomske posledice, ugrozila nacionalne ekonomije i izvršila udar na bezbednost stanovništva. Kao odgovor na krizu, države su u početku preduzimale određene restriktivne mere u cilju prevencije, kontrolisanja i zaustavljanja pandemije. Mere su varirale od zatvaranja granica, restrikcija međudržavnog saobraćaja, ograničavanja rada pojedinih objekata, do karantina i policijskog časa. Pandemija ne predstavlja samo zdravstvenu katastrofu koju treba savladati i sanirati, već je i ozbiljan faktor destabilizacije svih društvenih sistema, svih grana privrede, pa i bezbednosti namirnica. Organizacije za bezbednost hrane širom sveta, kao što su Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA) i Uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Država (FDA) objavile su da još uvek nema podataka o prenošenju ovog virusa putem hrane, ali se i dalje prikupljaju dokazi o potencijalnom postojanošću virusa na hrani. Koronavirus može kontaminirati sveže prehrambene proizvode ili pakovanja hrane preko zaražene osobe koja kija ili kašlje direktno na njih. Zabeležen je i negativan uticaj pandemije COVID-19 na glad u svetu, sa čak 10 miliona gladnih ljudi više nego u 2019. godini. Sa druge strane, smanjena izloženost ljudi kontaminiranoj hrani, usled zatvaranja restorana i smanjenog uvoza i izvoza dovela je do pada broja prijavljenih epidemija prenosivih hranom za 47 procenata u odnosu na 2019. godinu. Najveći pad među prijavljenim uzročnicima prenosivih hranom u 2020. god. zabeležen je za Norovirus i Hepatitis A, gde se broj prijavljenih slučajeva smanjio za 72, odnosno 65 procenata, prema podacima EFSA. Potrošači su i dalje zabrinuti za bezbednost hrane, pa je razumevanje rizika od opasnosti od suštinskog značaja za izbegavanje potencijalnih negativnih uticaja u lancu proizvodnje hrane u doba nakon pandemije Covid-19.

Ključne reči: bezbednost hrane, Covid-19, pandemija, virusi

¹Dr sci. vet. med. Nevena Grković, docent; dr sci. vet. med. Milijana Babić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Nikola Čobanović, docent; dr vet. Ivan Vičić, asistent; dr sci. vet. med. Neđeljko Karabasil, redovni profesor; dr sci. vet. med. Branko Suvajdžić, docent; dr sci. vet. med. Mirjana Dimitrijević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

e-mail adresa autora za korespondenciju: nevena.ilic@vet.bg.ac.rs

UVOD

Novi virus, poznat pod nazivom Covid-19, odnosno teški akutni respiratorni sindrom korona virus 2 (SARS-CoV-2) i dalje se nekontrolisano i brzo širi, a od 11. marta 2020. godine, Svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization* - WHO) je proglasila pandemiju ovog virusa, od kada su i sve sfere života znatno promenjene. Jedan od sektora koji je snažno pogođen tokom pandemije Covid-19 je prehrambena industrija, a bezbednost hrane i sigurnost snabdevanja hranom u celom svetu ozbiljno je ugrožena (Galanakis, 2020). Naglo zatvaranje pogona prehrambene industrije u velikom obimu: restorani, škole, hoteli i zabavni parkovi izazvalo je osetni pad potražnje za hranom (Jribi i sar., 2020). Istovremeno, potrošači su panično žurili u prodavnice prehrambenih proizvoda, što je rezultiralo praznim policama, nestašicama i skokovima cena (Miranda i Schaffner, 2019). Pandemija COVID-19 je direktno i indirektno uticala i na ukupnu proizvodnju mesa. Preko zaražene radne snage, koja je izazvala gašenje mesnih kombinata, došlo je do smanjenja proizvodnog, distributivnog i marketinškog potencijala. Ujedinjeni sindikat prehrambenih i komercijalnih radnika objavio je da je čak 13 radnika za pakovanje mesa umrlo od posledica zaraze virusom COVID-19 što je izazvalo masovna zatvaranja pogona za preradu mesa, a to je dovelo do gubitka proizvodnog kapaciteta goveđeg mesa za 25–43 procenata u Sjedinjenim Američkim Državama. Cene mesa i mesnih prerađevina su takođe oscilirale zbog jaza u potražnji i ponudi, uglavnom zbog panične kupovine i ograničenja kretanja (CDC, 2020). Poljoprivrednici su se takođe suočili sa poteškoćama, kada su tražili pogodnije tržište za prodaju svojih životinja. Prodaja komada mesa I kategorije smanjena je zbog privremenog zatvaranja ugostiteljskih objekata, što je uticalo na prihode od mesa i mesnih prerađevina. U ovim okolnostima je došlo do smanjenja proizvodnje mesa sa 338,9 miliona tona (masa trupa) u 2019. na 333,0 miliona tona u 2020., što je gubitak od oko 13,6 milijardi dolara (FAO, 2020). U Indiji je najteže bio pogođen živinarski sektor i tamo je potražnja za mesom brojlera impulsivno opala zbog izveštaja koji ih povezuju sa COVID-19 (The Third Pole, 2020).

Pored toga, pandemija ima direktan uticaj na praćenje zdravstvenog stanja i dnevnih potreba životinja usled ograničenog kretanja veterinarskih stručnjaka i farmera. Mnoge životinje su usled toga žrtvovane, što je ograničilo stočarsku proizvodnju.

Tema ovog rada je uticaj virusa Covid-19 na snabdevanje i bezbednost hrane, kao i tehnološki napredak u oblasti ispitivanja i kontrole namirnica koji se dogodio od početka pandemije izazvane ovim virusom.

Karakteristike virusa Covid-19

Virus Covid-19 je prvi put otkriven u decembru 2019. godine, kod pacijenta koji su болоvali od neuobičajne upale pluća, u gradu Vuhanu, Kina. SZO je virus tada nazvala novi korona virus (2019-nCoV), a kasnije, kada je otkriveno da je

86,9% genoma ovog novog virusa slično genomu SARS-CoV, virus je preimenovan u SARS-CoV-2 (Chang i sar., 2020). Kliničke manifestacije bolesti koju izaziva ovaj virus su nespecifične i promenljive među pacijentima i među zemljama. Generalno, simptomi uključuju temperaturu, bol u grlu, curenje ili začepljen nos, suv kašalj, glavobolju, mijalgiju ili umor, bol ili pritisak u grudima, bol u zglobovima, gubitak ukusa i/ili mirisa. Bol u stomaku, vrtoglavica, dijareja, mučnina i povraćanje su ređi simptomi (Kaul, 2020)

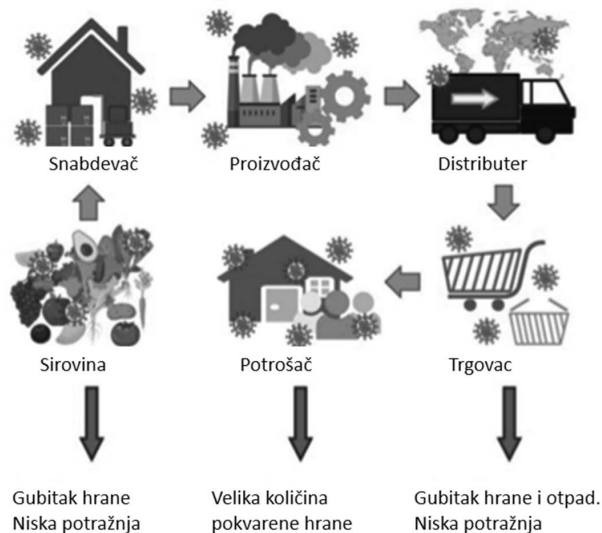
Virus SARS-COV-2 je sa omotačem koji pripada porodici *Coronaviridae*, a njegova struktura određuje i njegovo potencijalno ponašanje u lancu snabdevanja hranom. Postoje četiri glavne podgrupe *Coronaviridae*, poznate kao alfa, beta, gama i delta. Alfa i beta koronavirusi obično inficiraju sisare, dok gama i delta tipično inficiraju ptice. Koronavirus tipa beta predstavlja virusnu liniju koja izaziva teški akutni respiratorni sindrom (SARS), verovatno zbog jedinstvenog šiljastog proteina koji se vezuje za ACE2 receptore epitelnih ćelija (Chen, Rui i sar., 2020). Virusi bez omotača, kao što su adenovirusi (Norovirus), rinovirusi, koksaki virusi, rotavirusi i poliovirusi, ne sadrže lipidni omotač i imaju kapsid na bazi proteina izložen okruženju. Bez prisustva receptorskih proteina na lipidnoj ovojnici, ovi virusi moraju direktno prodreti u plazma membranu, ili koriste različite mehanizme endocitoze da bi ušli u ćelije domaćina (Spriggs i sar., 2019).

Potencijalni prenos virusa Covid-19 hranom

Virusi koji se prenose hranom (za razliku od bakterija koje se prenose hranom) ne mogu da se razmnožavaju u hrani zbog tog što im je za rast potreban živi organizam. Većina ovih virusa je neverovatno stabilna u okruženju, gde mogu da prežive tokom dužeg perioda (Cook, 2001). COVID-19 je respiratorna bolest i glavni put prenošenja je kontakt od osobe do osobe i direktan kontakt sa kapljicama koje nastaju u respiratornom traktu zaražene osobe kada kašlje ili kija, tako da je šansa da se ljudi zaraze ovim virusom putem hrane ili pakovanja hrane izuzetno mala. Kapljice nastale u respiratornom traktu su preteške da bi dugo opstale u vazduhu, pa se talože na objektima i površinama koje okružuju zaraženu osobu i postaju potencijalni rezervoari za infekciju. Osoba se može zaraziti dodirivanjem kontaminirane površine, predmeta ili ruke zaražene osobe, a zatim dodirivanjem sopstvenih usta, nosa ili očiju (WHO, 2020). Važno je napomenuti da su prvi prijavljeni slučajevi COVID-19 prethodno posetili veleprodajnu pijacu morskih plodova Huanan, gde su se žive životinje prodavale u blizini morskih plodova i mesnih proizvoda, što sugerise da se virus prenosio sa životinja na ljude. Analiza genoma izolovanih virusa dokazuje da je primarni domaćin SARS-CoV-2 bio slepi miš, a da su druge životinje, uključujući i svinje, potencijalni sekundarni domaćini virusa (Ceilan i sar., 2020). Do danas, uticaj tržišta morskih plodova na širenje COVID-19 nije u potpunosti shvaćen i utvrđeno je da se bolest brže širila međuljudskim interakcijama (Harapan i sar., 2020).

Uprkos velikoj zdravstvenoj pretnji koju predstavlja virus SARS-CoV-2, Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA) je u svom poslednjem izveštaju

objavila, da još uvek nema naučnih dokaza da je hrana rizična ili da je put prenosa ovog virusa (EFSA, 2020). Ono što se i dalje ispituje je opstanak ovog virusa u hrani. Isparavanje i inaktivacija kapljica i aerosola opterećenih patogenima u složenim biološkim tečnostima su slabo razumljive tačke (Bourouiba, 2020). Step i brzina isparavanja u velikoj meri zavise od temperature okoline i vlažnosti. Neka trenutna istraživanja sugerišu da niže temperature vazduha poboljšavaju preživljavanje virusa korona virusa. Ono što negativno utiče na opstanak virusa je i njegova akumulacija na površini rastvora, odnosno kontakt sa vodom i vazduhom, koji izazivaju njegova strukturna oštećenja. Tako i sušenje tokom skladištenja hrane, može dovesti do inaktivacije zbog činjenice da gubitak molekula vode pokreće formiranje radikala kiseonika (Oliveiros i sar., 2020). Međutim, objavljeno je da je ljudski koronavirus 229E (HuCoV-229E) preživeo najmanje 5 dana na površinama od polivinil hlorida (PVC), polifluorotetraetilena (teflon, PTFE), stakla, keramičkih pločica i nerđajućeg čelika i 3 dana na površinama od silikonske gume na 21 °C sa relativnom vlažnošću od 30–40% (Warnes et al., 2015). Slično tome, SARS-CoV-2 je preživeo na nerđajućem čeliku i plastici do 2 i 3 dana, tim redom, na 21–23°C pri relativnoj vlažnosti od 40%. On nije detektovan na bakru i kartonu posle 4 i 24 h (van Doremalen i sar., 2020). Ovi rezultati su dokazali da se SARS-CoV-2 može preneti preko kontaktnih površina zbog sposobnosti virusa da preživi na površinama nekoliko dana.

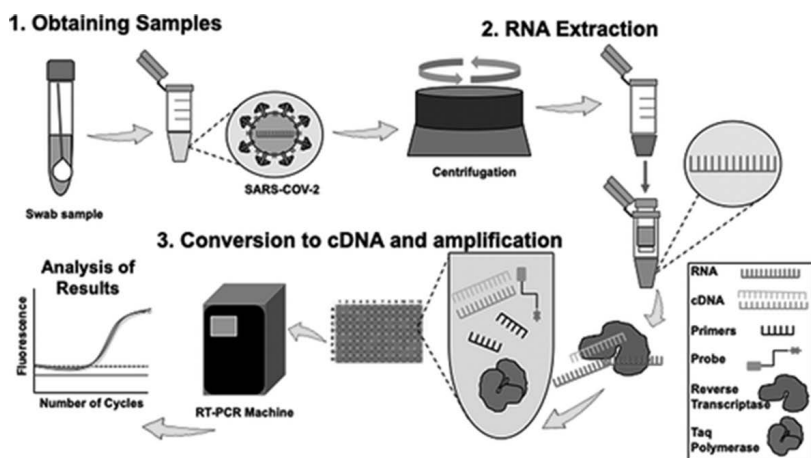


Slika 1. Uticaj COVID-19 na bezbednost hrane i sigurnost lanca snabdevanja hranom. Virusne ikone predstavljaju zbirnu akumulaciju virusnih čestica u diskretnim karikama u lancu snabdevanja. Duže strelice pokazuju da delovi lanca snabdevanja hranom doživljavaju gubitak i rasipanje hrane, što na kraju utiče na sigurnost hrane i ekonomsku sigurnost.

Neki naučnici, poput Yekta i saradnika (2020), još uvek ispituju moguće puteve kontaminacije Covid-19 putem hrane, kao što je kontaminacija mesom ili proizvodima od mesa, naročito svinjskog ili poreklom od divljih životinja, ali i širenjem virusa sa osoblja na prehrambene proizvode ili površine koje su bile u kontaktu sa hranom.

Dijagnostika virusa

Pojava SARS-CoV-2 je povećala potrebu za laboratorijama koje mogu bezbedno da rukuju i obrađuju visoko zarazne viruse. Kako je SARS-CoV-2 nov i Američki centar za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) i Svetska zdravstvena organizacija (SZO) su objavili privremene smernice za sakupljanje, rukovanje i testiranje uzoraka na prisustvo virusa SARS-CoV-2. CDC je predložio upotrebu objekata na nivou biološke bezbednosti 3 (BSL3) za izolaciju virusa u ćelijskoj kulturi i karakterizaciju virusnih agenasa koji su pronađeni u kulturama uzoraka SARS-CoV-2. Jedan od visokih rizika izloženosti povezanih sa SARS-CoV-2 je prenos vazдушnim putem. Stoga je neophodno zadržavanje u objektima BSL-3 da bi se zaštitili laboratorijski radnici (Iwen i sar., 2020). Još uvek ne postoje zvanične smernice i protokoli za praćenje SARS-CoV-2 u javnim prostorima i površinama. Za sada postoje dve vrste metoda detekcije: dijagnostički i serološki testovi (Kang i sar., 2020). Kod dijagnostičke metode se koriste testovi na bazi nukleinske kiseline i antigena, dok direktno merenje antitela specifičnih za ovaj virus spada u serološke metode. Princip detekcije SARS-CoV-2 zasnovanog na nukleinskim kiselinama prikazan je na slici 2. Moguće je da se ovaj pristup može proširiti na uzorke nežive površine u kombinaciji sa standardnim protokolom Međunarodne organizacije za standardizaciju (ISO) 15216 za norovirus i hepatitis A, pri čemu se pamučni brisevi koriste za prikupljanje uzoraka sa površina za pripremu hrane (Park i sar., 2015).



Slika 2. Metoda detekcije virusa Covid 19 (Lacombe i sar., 2020)

Prevenција

Za prehrambenu industriju je imperativ da pojača mere lične higijene i da se ponovo edukuje o principima higijene hrane kako bi se eliminisao ili smanjio rizik od virusne kontaminacije površina hrane i materijala za pakovanje krivicom radnika. Implementacija sistema upravljanja bezbednošću hrane, kao što su analiza opasnosti i kritične kontrolne tačke (HACCP) i dobre proizvodne prakse (GMP) su važne za smanjenje rizika od infekcije COVID-19. Čišćenje, sanitacija, dobra higijenska praksa i odgovarajuća ambalaža su od presudnog značaja u svim fazama lanca proizvodnje. Lična zaštitna oprema, kao što su maske i rukavice, efikasna je u smanjenju širenja virusa i infekcija u prehrambenoj industriji, ali samo kada se pravilno koristi. Pored toga, držanje fizičke distance, sprovođenje strogih higijenskih i sanitarnih mera i često pranje ruku. Ove mere će zaštititi osoblje od širenja COVID-19, održati zdravu radnu snagu i identifikovati i ukloniti zaražene radnike i one u direktnom kontaktu sa njima. Da bi sprečili širenje ovog virusa, mnogi objekti za preradu hrane su obustavili rad dok se ne osigura bezbednost radnika, kao i lanac snabdevanja hranom (Kang i sar., 2020).

Savetuje se da se minimizira kontakt između ljudi i stoga su isporuke hrane na kućnu adresu poželjnije. Ovo omogućava fizičko distanciranje između kupaca i prodajnog osoblja.

Ono što je takođe bila tema u jeku širenja ovog virusa, je i pravilna ishrana ljudi, ali i dodatna suplementacija. Sastojci hrane i bioaktivna jedinjenja koja podržavaju imunske funkcije kod ljudi, kao što su vitamin D, polifenoli i flavonoidi, takođe su bili u fokusu istraživanja u smislu prevencije i lečenja Covid-19, kao što je navedeno u pregledu Galanakisa i sar. (2020).

ZAKLJUČAK

Pandemija virusa Covid-19 rezultirala je promenom svesti o hrani i ojačala bezbednosne navike radnika u lancu proizvodnje, ali i potrošača. U narednim godinama, svi oni koji se bave hranom i tehnologijom njene proizvodnje i prerade, moraće da doprinose oporavku i ponovnom jačanju prehrambenog sektora. Ovo će zahtevati saradnju sa drugim srodnim disciplinama i zainteresovanim stranama kako bi se osigurala spremnost lanca snabdevanja hranom u odgovoru na svaku buduću pandemiju, ali i da se obezbedi bezbedna i dovoljna količina hrane za kompletnu svetsku populaciju. Pored toga, savet mnogih naučnika koji se bave hranom je da u budućnosti treba podržati razvoj kultivisanog mesa i različitih alternativa proizvoda na biljnoj bazi kako bi se prevazišla potencijalna opasnost hrane u najgorim situacijama.

LITERATURA

1. Broughton J.P., Xianding D., Guixia Y., Fasching C.L., Servellita V., Singh J. et al. 2020. CRISPR-Cas12-Based Detection of SARS-CoV-2." *Nature Biotechnology*. 38(7):870-74. 2. Center for Disease Control and Prevention. (2020a). What food and grocery pick-up and

delivery drivers need to know about COVID-19. Atlanta: CDC Retrieved from <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/organizations/food-grocery-drivers.html> 3. Ceylan Z., Meral R., Cetinkaya T. 2020. Relevance of SARS-CoV-2 in food safety and food hygiene: potential preventive measures, suggestions and nanotechnological approaches. *Virus Disease*. Jun;31(2):154-60. 4. Chang L., Yan Y., Wang L.. 2020. Coronavirus disease 2019: coronaviruses and blood safety. *Transfusion medicine reviews*. 1;34(2):75-80. 5. Chen TM, Rui J, Wang QP, Zhao ZY, Cui JA, Yin L. 2020. A mathematical model for simulating the phase-based transmissibility of a novel coronavirus. *Infectious diseases of poverty*. 9(1):1-8. 6. Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara MI, El-Attar L, Gray J. 2004. The zoonotic potential of rotavirus. *Journal of Infection*. 1;48(4):289-302. 7. EFSA Coronavirus: No evidence that food is a source or transmission route EFSA news: European food safety authority; web document (2020) <https://www.efsa.europa.eu/en/news/coronavirus-no-evidence-food-source-or-transmission-route> access date 25-10-2020 8. Food and Agriculture Organization (FAO). OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029. (2020). Available online at: <http://www.fao.org/publications/oecd-fao-agricultural-outlook/2020-2029/en/#:~:text=This%20year%20edition%20of%20the,the%20food%20and%20agriculture%20system> (accessed December 29, 2020). 9. Galanakis C.M. 2020. The food systems in the era of the coronavirus (COVID-19) pandemic crisis. *Food*. 22;9(4):523. 10. Harapan H., Itoh N., Yufika A., Winardi W., Kean S., Te H. et al. 2020. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *Journal of infection and public health*. May 1;13(5):667-73. 11. Iwen P.C., Stiles K.L., Pentella M.A. 2020. Safety considerations in the laboratory testing of specimens suspected or known to contain the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *American journal of clinical pathology*. 15;153(5):567-70. 12. Jribi S., Ben Ismail H., Doggui D., Debbabi H. 2020. COVID-19 virus outbreak lockdown: What impacts on household food wastage? *Environment, Development and Sustainability*. 22(5):3939-55. 13. Kang S., Peng W., Zhu Y., Lu S., Zhou M., Lin W. et al. 2020. Recent progress in understanding 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated with human respiratory disease: detection, mechanisms and treatment. *International journal of antimicrobial agents*. 1;55(5):105950. 14. Kaul D. 2020. An overview of coronaviruses including the SARS-2 coronavirus - Molecular biology, epidemiology and clinical implications. *Cur. Med. Res. Pract*. 10, 54–64. doi: 10.1016/j.cmrp.2020.04.001 15. Lacombe A., Quintela I., Liao Y.T., Wu V.C. 2021. Food safety lessons learned from the COVID-19 pandemic. *Journal of Food Safety*. 41(2):e12878. 16. Miranda R.C., Schaffner D.W. 2019. Virus risk in the food supply chain. *Current Opinion in Food Science*. 1;30:43-8. 17. Oliveiros B., Caramelo L., Ferreira N.C., Caramelo F. 2020. Role of temperature and humidity in the modulation of the doubling time of COVID-19 cases. *MedRxiv*. Jan 1. 18. Spriggs C.C., Harwood M.C., Tsai B. 2019. How non-enveloped viruses hijack host machineries to cause infection. *Advances in virus research*. 1;104:97-122. 19. The Third Pole. India Must Rescue Farmers from Covid-19 Shock. 2020. Available online at: <https://www.thethirdpole.net/en/2020/05/01/india-must-rescue-farmers-from-covid-19-shock/> (accessed January 23, 2020). 20. Van Doremalen N., Bushmaker T., Morris D.H., Holbrook M.G., Gamble A, Williamson B.N. 2020. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *New England journal of medicine*. 16;382(16):1564-7. 21. Warnes S.L., Little Z.R., Keevil C.W. 2015. Human coronavirus 229E remains infectious on common touch surface materials. *MBio*. 10;6(6):e01697-15. 22. World Health Organization. 2020. COVID-19 and food safety: guidance for food businesses: interim guidance, 07 April 2020 (No. WHO/2019-nCoV/Food_Safety/2020.1). World Health Organization. 23. Yekta R., Vahid-Dastjerdi L., Norouzbeigi S., Mortazavian A.M. 2021. Food products as potential carriers of SARS-CoV-2. *Food control*. May 1;123:107754.

IMPAACT OF COVID-19 PANDEMIC ON FOOD SAFETY

**Nevena Grković, Milijana Babić, Nikola Čobanović, Ivan Vičić,
Neđeljko Karabasil, Branko Suvajdžić, Mirjana Dimitrijević**

Summary

The pandemic caused by the COVID-19 virus in 2020 has faced the world with a health crisis that left immeasurable health, social and economic consequences, threatened the national economy and attacked the security of the population. In response to the crisis, states initially undertook certain restrictive measures in order to prevent, control and stop the pandemic. The measures ranged from border closures, restrictions on interstate traffic, restrictions on the operation of certain facilities, to quarantines and curfews. The pandemic is not only a health disaster that needs to be overcome and repaired, but is also a serious factor in the destabilization of all social systems, all branches of the economy, and even food safety. Food safety organizations around the world, such as the European Food Safety Authority (EFSA) and the United States Food and Drug Administration (FDA) have announced that there is still no data on the transmission of this virus through food, although evidence of potential persistence of the virus on food is still being collected. The coronavirus can contaminate fresh food products or food packages through an infected person who sneezes or coughs directly on them. The negative impact of the COVID-19 pandemic on the state of hunger in the world was also recorded, with as many as 10 million more hungry people than in 2019. On the other hand, the reduced exposure of people to contaminated food, due to the closure of restaurants and reduced imports and exports, led to a drop in the number of reported foodborne epidemics by 47% compared to 2019. The biggest drop among reported foodborne pathogens in 2020 was recorded for Norovirus and Hepatitis A, where the number of reported cases decreased by 72% and 65%, respectively, according to EFSA data. The food consumer is still concerned about food safety, so understanding the hazard risks is essential to avoid potential negative impacts in the food production chain in the post-Covid-19 pandemic era.

Key words: Covid-19, food safety, pandemic, viruses

ISPITIVANJE ZAVISNOSTI IZMEĐU POJAVE FIBRINOZNOG PERIKARDITISA I DRUGIH PATOMORFOLOŠKIH PROMENA, INDEKSA PERFORMANSI I KVALITETA MESA I TRUPA ZAKLANIH SVINJA

Nikola Čobanović, Branko Suvajdžić, Dragan Vasilev, Nedjeljko Karabasil

Kratak sadržaj

Fibrinozni perikarditis može da dovede do direktnih ekonomskih gubitaka, kako u primarnoj proizvodnji, tako i u industriji mesa kao posledica negativnog uticaja na indekse performansi, odbacivanja promenjenih organa na liniji klanja i iznenadne smrti tokom stresnih postupaka na farmi i tokom perioda pre klanja. Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi zavisnost između prisustva fibrinoznog perikarditisa i drugih patomorfoloških promena, indeksa performansi i kvaliteta trupa i mesa zaklanih svinja. Utvrđena je pozitivna korelacija između prisustva fibrinoznog perikarditisa i pleuritisa i pneumonije. Pored toga, utvrđena je negativna korelacija između prisustva fibrinoznog perikarditisa i dnevnog prirasta, telesne mase, mase toplog trupa, mase hladnog trupa i randmana. Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđena je koegzistencija fibrinoznog perikarditisa i pneumonije i pleuritisa kod zaklanih svinja, što ukazuje na značajnu ulogu patomorfoloških promena na plućima u patogenezi lezija na srcu. Takođe je utvrđeno da pojava fibrinoznog perikarditisa ima negativan uticaj na indekse performansi i pokazatelje kvaliteta trupa zaklanih svinja.

Ključne reči: *fibrinozni perikarditis, kvalitet mesa, kvalitet trupa, pleuritis, pneumonija, tovne svinje*

UVOD

Uzgajivači svinja i industrija mesa imaju za cilj proizvodnju jedinki koje imaju veliki procenat mesa visokog kvaliteta. Međutim, intenzivna farmska proizvodnja svinja povećava rizik od pojave supkliničkih bolesti, koje predstavljaju jedan od najznačajnijih problema dobrobiti i zdravlja životinja (Čobanović i sar, 2019a). Imajući u vidu činjenicu da se supkliničke infekcije javljaju bez vidljivih simptoma bolesti, klinički pregled na farmi se ne može smatrati efikasnom me-

¹Dr sci. vet. med. Nikola Čobanović, docent; dr sci. vet. med. Branko Suvajdžić, docent; dr sci. vet. med. Dragan Vasilev, redovni profesor; dr sci. vet. med. Nedjeljko Karabasil, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: cobanovic.nikola@vet.bg.ac.rs

todom procene dobrobiti (Dalmau i sar., 2014). Pored toga, prilikom ocene dobrobiti svinja na farmi, značajno se povećava rizik od širenja infektivnih bolesti između objekata na farmi i između farmi. Uz to, sam postupak ocene dobrobiti svinja na farmi je veoma zahtevan i dugo traje (Dalmau i sar., 2014). Sa druge strane, ocena prisustva patomorfoloških promena na organima na liniji klanja omogućava mnogo jednostavnije i finansijski isplativije prikupljanje podataka u cilju sprovođenja epidemioloških istraživanja i uspostavljanja sistema praćenja bolesti farmskih životinja (Elbers i sar., 1992; Scollo i sar., 2017). Ispitivanje prisustva i stepena izraženosti patomorfoloških promena kod klinički zdravih svinja na liniji klanja se sprovodi prilikom redovnog postmortalnog pregleda pluća, pleure, srca, jetre i kože (Elbers i sar., 1992; Čobanović i sar., 2021).

Pored toga što su prevalencija i uticaj patomorfoloških promena na plućima i jetri na performanse i kvalitet trupa i mesa svinja dosta ispitivani poslednjih godina (Merialdi i sar., 2012; Dalmau i sar., 2016; Čobanović i sar., 2019b; Čobanović i sar., 2021), u svetu postoji relativno malo podataka o učestalosti pojave fibrinoznog perikarditisa kod zaklanih svinja, dok do sada prevalencija pojave ovog patomorfološkog stanja nije ispitivana u Republici Srbiji. Takođe, postoji veoma malo podataka o zavisnosti između pojave fibrinoznog perikarditisa i ostalih patomorfoloških promena na organima zaklanih svinja (Bottacini i sar., 2021). Fibrinozni perikarditis negativno utiče na zdravlje i dobrobit životinja i izaziva bol, pored odsustva specifičnih kliničkih simptoma (Bottacini i sar., 2021). Iako se obično ne dovodi u vezu sa velikim ekonomskim gubicima, fibrinozni perikarditis može da dovede do direktnih gubitaka za industriju mesa u slučaju kada dođe do odbacivanja srca ili celog kompleta organa na liniji klanja svinja (Ceccarelli i sar., 2018). U teškim stanjima, kao što je to slučaj kod pojave konstriktivnog perikarditisa, dolazi do smanjenja performansi tovnih svinja, što može da bude još jedan potcenjen i nedovoljno ispitan ekonomski gubitak za primarne proizvođače. Srčana insuficijencija kod svinja može da predstavlja rizik od iznenadne smrti tokom stresnih procedura na farmi (vakcinacija) i tokom perioda pre klanja (utovar, transport i istovar) (Bottacini i sar., 2021). U dostupnoj literaturi nema dovoljno podataka o povezanosti između pojave fibrinoznog perikarditisa i indeksa performansi, kvaliteta trupa i mesa svinja. Stoga je cilj ovog istraživanja bio da se utvrdi zavisnost između prisustva fibrinoznog perikarditisa i drugih patomorfoloških promena, indeksa performansi i kvaliteta trupa i mesa zaklanih svinja.

MATERIJAL I METODE

Ova ispitivanja su sprovedena na 1 086 komercijalnih, mesnatih belih svinja obeleženih ušnim markicama, koje su dobijene ukrštanjem dvorasnih priplodnih krmača [veliki jorkšir × švedski landras] sa nerastovima rase pijetren. Svinje su bile starosti oko šest meseci, prosečne telesne mase 115 kg.

Ispitivane svinje su poticale sa 41 komercijalne farme (kapaciteta 200 svinja godišnje). Sve farme su imale po dva objekta za tov od kojih je svaki imao tri boksa pri čemu je u svakom bilo oko 15 svinja. Farme sa kojih su poticale svinje

su se međusobno razlikovale u pogledu uslova smeštaja, mikroklimatskih uslova, ishrane i zoohigijenskih uslova. Prasad, poreklom sa drugih farmi, su ulazila u tov sa telesnom masom od 25 do 30 kg, a tov je trajao do postizanja telesne mase od oko 115 kg.

Uslovi pre i posle klanja su bili identični za sve jedinke i u skladu sa standardnom industrijskom praksom. Klanje svinja i obrada trupa sprovedeni su u klanici malog kapaciteta (dnevni kapacitet od 35 svinja).

Utvrđivanje makroskopskih patomorfoloških promena na organima zaklanih svinja

U cilju utvrđivanja prisustva i stepena makroskopskih patomorfoloških promena na unutrašnjim organima svinja, kompleti organa (pluća, srce i jetra) od svake jedinke su na liniji klanja pregledani adspekcijom i palpacijom na postojanje pneumonije, pleuritisa, perikarditisa i mlečnih pega na jetri.

Prisustvo patomorfoloških promena je ocenjivano na osnovu Welfare Quality® protocol (2009), na sledeći način: ocena 0 – nema vidljivih patomorfoloških promena na pregledanim organima; ocena 1 – prisustvo patomorfoloških promena na pregledanim organima.

Pokazatelji indeksa performansi svinja

Vrednost za telesnu masu svinja je dobijena korišćenjem poznate mase toplog trupa na osnovu sledeće formule (Vítek i sar., 2011): $Y = 1,27 \times X$, pri čemu je Y = telesna masa u kg, a X = masa toplog trupa u kg.

Prosečni dnevni prirast u toku celokupnog perioda tova dobijen je oduzimanjem prosečne telesne mase prasadi na rođenju (1,1 kg) od telesne mase zaklane svinje, nakon čega je dobijeni rezultat podeljen sa prosečnom starošću zaklanih svinja (180 dana) (Čobanović i sar., 2021).

Pokazatelji kvaliteta trupa svinja

Nakon rasecanja na polutke i finalnog pranja, trupovi su mereni kako bi se utvrdila masa toplog trupa. Masa hladnog trupa određena je korišćenjem poznate mase toplog trupa na osnovu sledeće formule (Burson i Berg, 2001): $b = 0,985 \times a$, pri čemu je b = masa hladnog trupa u kg, dok je a = masa toplog trupa u kg. Randman je određen prema sledećoj formuli: (masa toplog trupa/telesna masa) $\times 100$. Mesnatost je utvrđena na liniji klanja najkasnije 60 minuta postmortem na osnovu masa toplih polutki i zbira debljine slanine na leđima prema Pravilniku o kvalitetu zaklanih svinja i kategorizaciji svinjskog mesa (Službeni list SFRJ, 2/85, 12/85 i 24/86). Debljina masnog tkiva sa kožom određena je lenjirom na sredini leđa, gde je masno tkivo najtanje (međurebarni prostor između 13. i 15. leđnog pršljenja) i na krstima na mestu na kome *musculus gluteus medius* najviše urasta

u masno tkivo. Zbir tih mera označava debljinu masnog tkiva sa kožom na leđima. Za određivanje mesnatosti na osnovu obavljenih merenja koriste se tabele koje čine sastavni deo Pravilnika.

Pokazatelji kvaliteta mesa svinja

Merenje pH vrednosti ($\text{pH}_{45\text{min}}$) i temperature ($T_{45\text{min}}$) mesa sprovedeno je 45 minuta postmortem ručnim pH metrom (Testo 205, Testo AG, Lenzkirch, Germany), ubodom u *musculus longissimus dorsi, pars lumbalis*. Ručni pH metar je kalibrisan standardnim rastvorima $\text{pH } 7,00 \pm 0,01$ i $\text{pH } 4,00 \pm 0,01$ pri $20\text{ }^\circ\text{C}$ (Reagecon Biomedical, Ireland) prema uputstvu proizvođača. Kao rezultat je uzimana srednja vrednost tri određivanja pH vrednosti i temperature u istoj tački.

Statistička analiza podataka

Statistička analiza dobijenih rezultata je urađena u statističkom paketu SPSS 23.00 (SPSS Inc., Armonk, NY: IBM Corp., USA). Stepen zavisnosti fibrinoznog perikarditisa i drugih patomorfoloških promena, indeksa performansi i pokazatelja kvaliteta trupa i mesa utvrđen je *Pearson*-ovim koeficijentom korelacije (r_p). Signifikantnost razlika je utvrđena na nivou značajnosti od $P \leq 0,05$, dok su P vrednosti između $>0,05$ i $<0,10$ smatrane tendencijom.

REZULTATI

Fibrinozni perikarditis je utvrđen kod 119 od ukupno 1086 zaklanih svinja (10,96%). Stepen zavisnosti između prisustva fibrinoznog perikarditisa kod zaklanih svinja i ostalih patomorfoloških promena, indeksa performansi i kvaliteta trupa i mesa prikazan je u tabeli 1. Utvrđena je pozitivna korelacija ($P < 0,0001$) između prisustva fibrinoznog perikarditisa i pleuritisa ($r = 0,594$) i pneumonije ($r = 0,182$). Pored toga, utvrđena je negativna korelacija ($P < 0,0001$) između prisustva fibrinoznog perikarditisa i dnevnog prirasta ($r = -0,373$), telesne mase ($r = -0,275$), mase toplog trupa ($r = -0,313$), mase hladnog trupa ($r = -0,312$) i randmana ($r = -0,134$). Sa druge strane, nije utvrđena zavisnost ($P > 0,05$) između prisustva fibrinoznog perikarditisa i ispitivanih pokazatelja kvaliteta mesa svinja.

Tabela 1. Stepun zavisnosti između prisustva fibrinoznog perikarditisa kod zaklanih svinja i ostalih patomorfoloških promena, indeksa performansi, kvaliteta trupa i kvaliteta mesa

Parametri	Fibrinozni perikarditis		
	r_p	P - vrednost	Jačina
Patomorfološke promene			
Pneumonija (%)	0,182*	<0,0001	Slaba
Pleuritis (%)	0,594*	0,0001	Srednja
Mlečne pege na jetri (%)	0,092	0,200	-
Indeksi performansi			
Telesna masa (kg)	-0,373*	0,0001	Srednja
Dnevni prirast (g)	-0,275*	0,0001	Slaba
Pokazatelji kvaliteta trupa			
Masa toplog trupa (kg)	-0,313*	0,0001	Slaba
Masa hladnog trupa (kg)	-0,312*	0,0001	Slaba
Randman (%)	-0,134*	<0,0001	Slaba
Debljina slanine na ledjima (mm)	0,085	0,195	-
Debljina slanine na krstima (mm)	0,244	<0,0001	Slaba
Mesnatost (%)	-0,059	0,153	-
Pokazatelji kvaliteta mesa			
pH _{45min} vrednost	0,121	0,196	-
T _{45min} vrednost	0,022	0,478	-

*Statistička značajnost na nivou P<0,05

DISKUSIJA

U ovom istraživanju, fibrinozni perikarditis je zabeležen kod 10,96% zaklanih svinja, što ukazuje na nešto veću učestalost nego u prethodnim istraživanjima. U različitim delovima sveta prevalencija pojave fibrinoznog perikarditisa kod zaklanih svinja varira: od 9% (Bonde i sar., 2010) do 13% (Buttenschøn, 1991) u Danskoj, 5,66% u Italiji (Bottacini i sar., 2021;), 3,3% (prosečna vrednost) u Portugalu, Italiji, Finskoj, Brazilu i Španiji (Dalmau i sar., 2016) i 2,3% u Nemačkoj (Mathur i sar., 2018;).

Na osnovu *Pearson*-ovog koeficijenta korelacije, utvrđeno je da se sa povećanjem učestalosti pneumonija i pleuritisa povećava procenat zaklanih svinja sa fibrinoznim perikarditisom (tabela 1), što ukazuje na koegzistenciju fibrinoznog perikarditisa i patomorfoloških promena na plućima kod zaklanih svinja. Ovo se može objasniti činjenicom da fibrinozni perikarditis kod tovnih svinja može da

nastane kao posledica hematogene diseminacije bakterija ili usled limfogenog širenja infekcije sa susednih tkiva, kao što su pluća ili pleura (Bottacini i sar., 2021). Najčešće vrste bakterija koje se dovode u vezu sa perikardijalnom eksudacijom i deponovanjem fibrina su *Glaesserella parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus spp.* (uključujući *Streptococcus suis*) i *Mycoplasma spp.* (Leps i Fries, 2009; Correia-Gomes i sar., 2017). Takođe su utvrđene i sekundarne infekcije agensima kao što su *Pasteurella multocida* i *Bordetella bronchiseptica* (Bottacini i sar., 2021). Virusne infekcije (npr. encefalomiokarditis virus) i neadekvatni uslovi na farmi takođe mogu da dovedu do eksudacije i deponovanja fibrina, što značajno doprinosi razvoju perikarditisa (Čobanović i sar., 2019a; Bottacini i sar., 2021).

U ovom istraživanju je utvrđeno da se sa prisustvom fibrinoznog perikarditisa kod zaklanih svinja, smanjuju indeksi performansi (manji dnevni prirast i telesna masa) i kvalitet trupa (manja masa toplog i hladnog trupa, kao i manji randman) (tabela 1). Prethodna ispitivanja (Čobanović i sar., 2019b; Čobanović i sar., 2021) su dokazala da prisustvo patomorfoloških promena na organima dovodi do smanjenja telesne mase, mase trupa i mesnatosti svinja. Pomenuti rezultati se mogu pripisati smanjenoj stopi rasta, slabijoj konverziji hrane i smanjenom dnevnom prirastu kod svinja sa patomorfološkim promenama na organima (Čobanović i sar., 2019b). Pojava bolesti kod svinja, čak i u supkliničkoj formi, izaziva bol, nelagodnost i gubitak apetita i negativno utiče na digestiju, resorpciju i asimilaciju hranljivih materija u digestivnom traktu (Šoltésová i sar., 2015). Obolele svinje konzumiraju manje hrane nego što im je potrebno, pa samim tim nisu u mogućnosti da maksimalno iskoriste genetski potencijal za sintezu proteina koji su neophodni za izgradnju skeletnog mišićnog tkiva (Čobanović i sar., 2019b; Čobanović i sar., 2021). Umesto da se hranljive materije iskoriste u cilju povećanja telesne mase svinja tokom perioda tova, prisustvo bolesti dovodi do smanjene sinteze mišićnog i masnog tkiva i povećanja njihove razgradnje (Šoltésová i sar., 2015). Ovo dovodi do preusmeravanja hranljivih materija sa proizvodnih procesa, kao što su sinteza mišićnog i koštanog tkiva, na procese za kojim oboleli organizam ima veću potrebu – sinteza proteina plazme, obnavljanje i zamena patološkim procesom zahvaćenih tkiva (Čobanović i sar., 2019b; Čobanović i sar., 2021). Posledice prethodno pomenutih metaboličkih promena su duže trajanje tova u cilju postizanja željene telesne mase, manja završna telesna masa i značajno pogoršanje kvaliteta trupa, što rezultira velikim ekonomskim gubicima za primarne proizvođače (Čobanović i sar., 2019b; Čobanović i sar., 2021).

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđena je koegzistencija fibrinoznog perikarditisa i pneumonije i pleuritisa kod zaklanih svinja, što ukazuje na značajnu ulogu patomorfoloških promena na plućima u patogenezi lezija na srcu. Takođe je utvrđena zavisnost između pojave fibrinoznog perikarditisa i indeksa performansi (manji dnevni prirast i telesna masa) i pokazatelja kvaliteta trupa zaklanih

svinja (manja masa toplog i hladnog trupa, kao i manji randman). Sa druge strane, nije utvrđena zavisnost između prisustva fibrinoznog perikarditisa i pokazatelja kvaliteta mesa svinja. Neophodna su dalja istraživanja koja bi obuhvatila veći broj pokazatelja kako bi se sa većom sigurnošću utvrdila povezanost između pojave fibrinoznog perikarditisa i biohemijskih pokazatelja, indeksa performansi i kvaliteta trupa i mesa zaklanih svinja.

Zahvalnica:

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

LITERATURA

1. Bonde M., Toft N., Thomsen P.T., Sørensen, J.T. 2010. Evaluation of sensitivity and specificity of routine meat inspection of Danish slaughter pigs using Latent Class Analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 94:165-9.
2. Bottacini M., Scollo A., Contiero B., Mazzoni C., Pace V., Gottardo, F. 2021. Prevalence of fibrinous pericarditis in heavy pigs (170 kg) and its association with other pluck lesions at slaughter inspection. *The Veterinary Journal*, 273:105680.
3. Burson D., Berg E. 2001. Procedures for estimating pork carcass composition. *Pork quality facts*. National Pork Producers Council, Des Moines, IA.
4. Buttenschøn J. 1991. Statistical evidence for a link between bronchopneumonia and disseminated focal nephritis in pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 38:287-99.
5. Ceccarelli M., Leprini E., Sechi P., Iulietto M.F., Grispoldi L., Goretti E., Cenci-Goga B.T. 2018. Analysis of the causes of the seizure and destruction of carcasses and organs in a slaughterhouse in central Italy in the 2010-2016 period. *Italian journal of food safety*, 7:6899.
6. Correia-Gomes C., Eze J.I., Borobia-Belsué J., Tucker A.W., Sparrow D., Strachan D., Gunn, G. J. 2017. Voluntary monitoring systems for pig health and welfare in the UK: Comparative analysis of prevalence and temporal patterns of selected non-respiratory post mortem conditions. *Preventive Veterinary Medicine*, 146:1-9.
7. Čobanović N., Jamnikar-Cigle-
nečki U., Kirbiš A., Križman M., Štukelj M., Karabasil N. 2019a. Impact of various housing conditions on the occurrence of pathological lesions in slaughtered pigs. *Veterinarski glasnik*, 73(1):17-29.
8. Čobanović N., Janković L., Vasilev D., Dimitrijević M., Teodorović V., Kureljušić B., Karabasil N. 2019b. Slaughterline records of various postmortem pathological lesions and their influence on carcass and meat quality in slaughtered pigs. *Animal Science Journal*, 90:1475-83.
9. Čobanović N., Stajković S., Kureljušić J., Žutić J., Kureljušić B., Stanković S.D., Karabasil, N. 2021. Biochemical, carcass and meat quality alterations associated with different degree of lung lesions in slaughtered pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 188:105269.
10. Dalmau A., Fabrega E., Manteca X., Velarde A. 2014. Health and welfare management of pigs based on slaughter line records. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 1:73-78.
11. Dalmau A., Nande A., Vieira-Pinto M., Zamprogna S., Di Martino G., Ribas J.C. et al. 2016. Application of the Welfare Quality® protocol in pig slaughterhouses of five countries. *Livestock Science*, 193:78-87.
12. Elbers A.R.W., Tielen M.J.M., Snijders J.M.A., Cromwijk W.A.J., Hunneman W.A. 1992. Epidemiological studies on lesions in finishing pigs in the Netherlands. I. Prevalence, seasonality and interrelationship. *Preventive Veterinary Medicine*, 14:217-31.
13. Leps J., Fries R. 2009. Incision of the heart during meat inspection of fattening pigs—A risk-profile approach. *Meat science*,

81:22-7. **14.** Mathur P.K., Vogelzang R., Mulder H.A., Knol E.F. 2018. Genetic selection to enhance animal welfare using meat inspection data from slaughter plants. *Animals*, 8:16. **15.** Meriardi G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Gozio S., Pozzi P., Spaggiari B., Martelli P. 2012. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *The Veterinary Journal*, 193:234-9. **16.** Pravilnik o kvalitetu zaklanih svinja i kategorizaciji svinjskog mesa (Službeni list SFRJ, 2/85, 12/85 i 24/86). **17.** Scollo A., Gottardo F., Contiero B., Mazzoni C., Leneveu P., Edwards S.A. 2017. Benchmarking of pluck lesions at slaughter as a health monitoring tool for pigs slaughtered at 170 kg (heavy pigs). *Preventive Veterinary Medicine*, 144:20-8. **18.** Šoltéssová H., Nagyová V., Tóthová C., Nagy O. 2015. Haematological and blood biochemical alterations associated with respiratory disease in calves. *Acta Veterinaria Brno*, 84:249-56. **19.** Vítek M., Vališ L., David L., Pulkrábek J. 2011. Coefficients for the estimation of pig live weight. *Research in Pig Breeding (Czech Republic)*, 5:51-4. **20.** Welfare Quality®. Welfare Quality® assessment protocol for pigs (sow and piglets, growing and finishing pigs). Welfare Quality® Consortium 2009, Lelystad, The Netherlands.

LISTERIA MONOCYTOGENES – PARAMETAR BEZBEDNOSTI HRANE

**Jasna Kureljušić¹, Nikola Rokvić¹, Marija Pavlović¹,
Dragana Ljubojević Pelić², Suzana Vidaković Knežević²,
Jelena Vranešević², Nataša Kilibarda³**

Kratak sadržaj

Listeria monocytogenes se, kao patogena bakterija koja se prenosi hranom, smatra jednim od glavnih uzročnika pojave oboljenja kod ljudi i životinja. Hrana neophodna za održavanje homeostaze organizma i njena kontaminacija sa *Listeria* spp., posebno *L. monocytogenes*, može dovesti do infekcija opasnih po život kod određene populacije ljudi. Zdravi ljudi retko oboljevaju od infekcije listerijom, ali bolest može biti fatalna za još nerođene bebe, novorođenčad, trudnice, osobe starije od 65 godina i osobe sa oslabljenim imunskim sistemom. Kod osoba sa oslabljenim imunitetom, starijih osoba i trudnica, patogen može proći krvno-moždanu i placentnu barijeru, što dovodi do neurolisterioze i listerioze majke i fetusa. Najčešće je boles uzrokovana konzumacijom nepropisno obrađenog delikatesnog mesa i nepasterizovanih mlečnih proizvoda ali se bakterija takođe može naći i u povrću, klicama i i morskim plodovima. Hrana koja je uglavnom povezana sa listeriozom, uključuje "Ready to eat" (RTE) proizvode koji: podržavaju rast *L. monocytogenes*, konzumiraju se bez termičkog tretmana ili imaju dug rok trajanja tokom čuvanja na temperaturi frižidera (0-4 °C). Patogen se može naći u niskim ili umerenim nivoima u namirnicama, ali nivoi uključeni u izbijanje listerioze su relativno visoki i iznose oko 1 000 kolonija. *L. monocytogenes* je prvobitno klasifikovana u 13 serotipova, na osnovu aglutinacije somatskih (O) i flagelarnih (H) antigena, pri čemu su samo tri (1/2a, 1/2b i 4b) uzrokovala više od 90 procenata infekcija ljudi. Nakon kontaminacije prehrambenih materijala ovim patogenom, može doći do povećanja stope rezistencije na antibiotike usled izlaganja konzervansima, antibioticima i stresnim uslovima, što predstavlja jedan od većih problema javnog zdravlja danas. Pojavom mikrobne rezistencije naglašava se posebna potreba za kontrolom *L. monocytogenes* duž celog lanca ishrane, kao i pravilnog i odgovornog lečenja pacijenata. Primena dobre higijenske i proizvođačke prakse tokom proizvodnje hrane i akreditovani program implementacije HACCP je kod ove bolesti od velikog značaja.

Ključne reči: faktori rizika, kontaminacija hrane, *Listeria monocytogenes*

¹Dr sci. vet. med. Jasna Kureljušić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Nikola Rokvić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Marija Pavlović, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Dragana Ljubojević Pelić; dr vet. med. Suzana Vidaković Knežević, istraživač saradnik; dr sci. vet. med. Jelena Vranešević, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, R. Srbija

³Dr sci. vet. med. Nataša Kilibarda, profesor, Univerzitet Singidunum, Beograd, Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: jasnakureljusic@yahoo.com

UVOD

Listeria monocytogenes je prvi put izolovana početkom dvadesetog veka kao gram-pozitivni štapić u uzorcima tkiva inficiranih pacijenata. Hulphers je 1919. godine ovu bakteriju nazvao *Bacillus hepatis* zbog toga što je izolovana iz nekrotičnih žarišta u jetri zeca. Godine 1926., naziv vrste *monocytogenes* dali su Marej i njegove kolege da opišu novi bacil sa snažnom aktivnošću koja proizvodi monocitozu kod zečeva i zamorčadi (Jackson i sar., 2018). U čast lorda Džozefa Listera, Pirije je bakteriju nazvao *Listerella hepatolitica*. Ona je smatrana bacilom odgovornim za epizootiju među glodarima u regionu reke Tigar 1927. godine Nifeldt je 1929. godine obavio prve nedvosmislene izolacije ovih bakterija kod ljudi. Svoje definitivno ime, *Listeria monocytogenes*, ova bakterija je dobila 1940. godine.

ETIOLOGIJA

Porodica *Listeria* se sastoji od 10 različitih vrsta sa *L. monocytogenes* koja je najznacajna kod ljudi. *L. monocytogenes* ima 13 različitih serotipova zasnovanih na različitim flagelarnim i površinskim antigenima. Međutim, postoje samo tri serotipa (1/2a, 1/2b, 4a) koji izazivaju bolest kod ljudi.[2] Najmanja infektivna doza *L. monocytogenes* za ljude je nepoznata. Ona zavisi od imuniteta domaćina i koncentracije patogena u konzumiranoj namirnici. Podaci sakupljeni nakon nekoliko većih epidemija listerioze, upućuju na vrednosti od 10^7 do 10^{11} CFU po gramu namirnice (Dalton i sar., 1997.), ali je razvoj bolesti moguć i nakon unosa nižih infektivnih doza (Ooi i Lorber, 2005).

L. monocytogenes su sveprisutne bakterije koje se mogu naći u različitim sredinama kao što su zemljište i voda, a posebno u sredinama za proizvodnju hrane. Mnoge vrste *Listeria* su izolovane iz zemlje, vegetacije, kanalizacije, vode, stočne hrane, svežeg i smrznutog mesa uključujući živinu, klaničnog otpada i izmeta zdravih životinja, uključujući i ljude. Utvrđeno je da su životinje prenosioci *L. monocytogenes*, pa otuda i kontaminacija namirnica životinjskog porekla, kao što su meso i mlečni proizvodi.

Namirnice koje imaju najveću stopu infekcija povezanih sa *L. monocytogenes* uključuju:

1. Sirove klice,
2. Nepasterizovano mleko,
3. Meke sireve,
4. Hladno meso,
5. Hladne viršle i
6. Dimljene morske plodove.

“READY TO EAT” (RTE) PROIZVODI

Hrana RTE, koja se često čuva na niskim temperaturama, je tip koji je najpodložniji kontaminaciji sa *L. monocytogenes* zbog toga što je bakterija psihrotrofna i poseduje sposobnost da preživi i raste u prisustvu mnogih sistema za očuvanje hrane, kao što su nizak pH i visoka koncentracija soli (Kocot i Olszewska, 2017). Kontaminacija minimalno prerađenih proizvoda od voća i povrća sa *L. monocytogenes* često izaziva zabrinutost, s obzirom na to da ove namirnice, koje su atraktivne za potrošače, obično nisu podvrgnute tretmanu tokom prerade radi inaktivacije potencijalnih patogena (Choi i sar., 2018). Štaviše, način na koji se RTE povrće seče može uticati na opstanak listerije i efikasnost postupaka dekontaminacije u gotovim proizvodima.

L. monocytogenes može da raste na temperaturama frižidera. Niske temperature indukuju enzime kao što je RNK helikaza koja poboljšava aktivnost i replikaciju *L. monocytogenes* na niskim temperaturama. Sposobnost proizvodnje biofilma povećava sposobnost *L. monocytogenes* da preživi u teškim uslovima.

L. monocytogenes je u stanju da se vezuje za površine za preradu hrane i da se razmnožava da bi se formirao biofilm na nepristupačnim lokacijama u prerađivačkim objektima. Biofilm štiti bakteriju od antimikrobnog dejstva, omogućavajući joj da kolonizuje opremu za preradu hrane, transportne trake, cevi, podove i sisteme za odvodnjavanje i da opstane mesecima ili čak godinama, unakrsno kontaminirajući različite površine u postrojenjima za preradu hrane. Formiranje biofilma na različitim površinama u kontaktu sa hranom od strane *L. monocytogenes* otežava efikasnu kontrolu ovog patogena, posebno u prerađivačkim postrojenjima gde se vrši neadekvatno čišćenje.

Faktori virulencije *L. monocytogenes* uključuju, ali nisu ograničeni na intracelularnu mobilnost putem polimerizacije aktina i sposobnost replikacije na temperaturama u frižideru. Ovo otežava kontrolu u prehrambenoj industriji. Prenos bakterija se dešava fekalno-oralnim putem i najčešće uključuje hranu kao što su hladno meso i nepasterizovani mlečni proizvodi. Broj slučajeva koji uključuju *L. monocytogenes* se smanjio poslednjih godina zahvaljujući napretku u prevenciji, otkrivanju i lečenju. *L. monocytogenes* može da preživi nizak pH od 5,5 kroz fenomen poznat kao odgovor tolerancije kiseline (ATR), koji uzrokuje da ćelije budu otpornije u nepovoljnim kiselim uslovima. Bakterija, koja se odlikuje svojom postojanošću u okruženjima za proizvodnju hrane, je relativno otporna na so i sposobna je da raste na temperaturi u frižideru, pa se stoga često povezuje sa konzumacijom sirove ili minimalno obrađene i često ohlađene RTE hrane (meki i polumeki sirevi i dimljeni riblji proizvodi), koji se konzumiraju bez dalje prerade (Jordan i McAuliffe, 2018).

Prema Centru za kontrolu bolesti (CDC), otprilike 1 600 ljudi oboli od listerioze svake godine, a oko 260 ljudi umire od nje. Bolest je najčešća kod trudnica, odojčadi, imunokompromitovanih osoba i starijih (65 i više godina). Trudnice su takođe izložene riziku i one *L. monocytogenes* mogu preneti na nerođeni fetus.

METODE KOJE SE OBIČNO KORISTE ZA IDENTIFIKACIJU *L. Monocytogenes* U HRANI

Kultivacija

L. monocytogenes se može izolovati iz kontaminiranih uzoraka podvrgavanjem prethodnom obogaćivanju. Ovo podrazumeva mešanje uzoraka sa medijumom za obogaćivanje kao što je *Listeria Enrichment Broth* (Sigma), nakon čega se uzorci za obogaćivanje mogu kultivisati na specifičnim agar pločama za *L. monocytogenes* kao što je *Listeria Mono Differential Agar* (Sigma). Izolacija se može izvršiti korišćenjem raznih drugih medija i procedura (Rosimin i sar., 2016). Nakon toga se, čiste kulture *L. monocytogenes* koje će se koristiti za nizvodnu identifikaciju i analizu karakterizacije mogu pripremiti izolovanjem pojedinačnih kolonija sa agar ploča (Dwivedi i Jaykus., 2011). Metode zasnovane na kulturi se često koriste u kombinaciji sa metodama zasnovanim na imunoesejima ili molekularnim PCR metodama za precizno otkrivanje *L. monocytogenes* u uzorcima hrane (Liu i sar., 2015).

Imunološki test

Tokom imunotestiranja, monoklonska antitela specifična za *L. monocytogenes* se mogu ugraditi u različite tehnike za identifikaciju. Imunološki testovi obično imaju visoku specifičnost i brzi su i laki za upotrebu, ali ne dozvoljavaju identifikaciju na nivou vrste. Još jedan nedostatak ove metode je taj što prisustvo malog broja ćelija listerije u uzorku može dovesti do lažno pozitivnih rezultata (Capita i sar., 2001). Dostupne su različite varijante imunoeseja, uključujući enzimski imunosorbentni test tipa sendvič (S-ELISA) (Liu i sar., 2017) imunoesej nanočestica (Jaakohuhta i sar., 2007) i enzimski fluorescentni test (ELFA) (Sewell i sar., 2003).

PCR

Tehnike zasnovane na PCR metodologiji uključuju amplifikaciju specifičnog genskog segmenta *L. monocytogenes* kao što su HliA-, Iap-, PrfA i SsrA koristeći specifične prajmere, praćenjem amplifikovanog segmenta pomoću elektroforeze u agaroznom gelu ili drugih tehnika detekcije kao što je SIBR Green (Cheng i sar., 2017). Slično tome, 16S rRNA geni *L. monocytogenes* se mogu amplificirati, sekvencionirati i pretraživati u postojećim bazama podataka radi identifikacije. Nedostatak tehnika zasnovanih na PCR metodama je vezan za troškove vezane za kupovinu instrumenta i reagensa, kao i stručnost potrebnu za sprovođenje eksperimenata (Tabit FT., 2016).

PREVENCIJA I KONTROLA LISTERIA Monocytogenes

Prevenција i kontrola *L. monocytogenes* u RTE hrani je od najveće važnosti u zaštiti potrošača od listerioze. Svetska zdravstvena organizacija je dala smernice

koje se moraju pratiti da bi se smanjila verovatnoća pojave *L. monocytogenes* u RTE hrani. Mere bezbednosti hrane se moraju sprovoditi na različitim nivoima okruženja za proizvodnju hrane i one uključuju:

1. Uspostavljanje dizajna i adekvatnosti proizvodnog objekta: pravilna lokacija i raspored, i adekvatna oprema i objekti kao što su vodovod, drenaža, toaleti, kontrola temperature, skladištenje i umivaonici za pranje ruku.
2. Kontrola opasnosti po bezbednost hrane i sprovođenje higijenskih praksi u celoj liniji za proizvodnju hrane. Akreditovani program implementacije HACCP.
3. Uspostavljanje adekvatnih sanitarnih uslova i održavanje proizvodnih objekata; efikasni programi čišćenja; kontrola štetočina i pravilno upravljanje otpadom; i efikasno praćenje programa čišćenja.
4. Obezbeđivanje adekvatnih i funkcionalnih transportnih objekata; oni treba da budu dobro održavani i da odgovaraju svrsi.
5. Kontinuirana obuka osoblja koje radi u okruženju za proizvodnju hrane, uključujući obuku za osveženje znanja i dr.

LITERATURA

1. Capita R., Alonso-Calleja C., Moreno B., García-Fernández M.C. 2001. Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology*.65(1-2):75-82. 2. Cheng J-Q., Healey S., Regan P., Laksanalamai P., Hu Z. 2017. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*. 6(2):39-59. 3. Choi M.H., Park Y.J., Kim M., Seo Y.H., Kim Y.A., Choi J.Y. et al. 2018. Increasing Incidence of Listeriosis and Infection-associated Clinical Outcomes. *Ann Lab Med*. 38(2):102-9. 4. Dalton C.B., Austin C.C., Sobel J. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med*. 336, 100-5. 5. Dwivedi H.P., Jaykus L. 2011. Detection of pathogens in foods: The current state-of-the-art and future directions. *Critical Reviews in Microbiology*.37(1):40-63. 6. Jaakohuhta S., Härmä H., Tuomola M., Lövgren T. 2007. Sensitive *Listeria spp.* immunoassay based on europium (III) nanoparticulate labels using time-resolved fluorescence. *International Journal of Food Microbiology*.114(3):288-94. 7. Jackson K.A., Gould L.H., Hunter J.C., Kucerova Z., Jackson B. 2018. Listeriosis Outbreaks Associated with Soft Cheeses, United States, 1998-2014. *Emerg Infect Dis*. 24(6):1116-8. 8. Jordan K., McAuliffe O. 2018. *Listeria monocytogenes* in Foods. *Adv Food Nutr Res*. 86:181-213. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.02.006. Epub 2018 Apr 3. PMID: 30077222. 9. Kocot A.M., Olszewska M.A.. 2017. Biofilm formation and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* in a food-processing context. *LWT - Food Science and Technology*. 84:47-57 10. Liu A., Xiong Q., Shen L., Li W., Zeng Z., Li C. et al. 2017, A sandwich-type ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes* using the well-oriented single chain Fv antibody fragment. *Food Control*.79:156-61. 11. Liu H., Lu L., Pan Y., Sun X., Hwang C-A., Zhao Y. et al. 2015. Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. *Food Control*. 52:78-84.

- 12.** Ooi S.T., Lorber B. 2005. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. Clin. Infect. Dis. 40, 1327-32. **13.** Rosimin A.A., Kim M-J., Joo I-S., Suh S-H., Kim K.S. 2016; Simultaneous detection of pathogenic *Listeria* including atypical *Listeria innocua* in vegetables by a quadruplex PCR method. LWT - Food Science and Technology. 69:601-7. **14.** Sewell A.M., Warburton D.W., Boville A., Daley E.F., Mullen K. 2003. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria spp.* from foods. International Journal of Food Microbiology. 81(2):123-9. **15.** Tabit F.T. 2016. Advantages and limitations of potential methods for the analysis of bacteria in milk: A review. Journal of Food Science and Technology.53(1):42-9.

ZNAČAJ KONTROLE HIGIJENSKOG KVALITETA SIROVOG MLEKA

*Dragana Ljubojević Pelić¹, Dalibor Todorović¹, Miloš Pelić¹,
Jelena Vranešević¹, Suzana Vidaković Knežević¹,
Jasna Kureljušić², Marija Pajić³*

Kratak sadržaj

Mleko predstavlja izuzetno važnu namirnicu u ishrani ljudi. Međutim, zbog visokovredne nutritivne vrednosti, ono je pogodan medijum za razvoj različitih mikroorganizama koji mogu da prouzrokuju kvar i da negativno utiču na njegove tehnološke karakteristike. Prisustvo mikroorganizama u mleku ima izuzetno veliki značaj sa gledišta bezbednosti hrane i higijenskog kvaliteta mleka i mlečnih proizvoda. Povećanje broja somatskih ćelija u mleku je značajan pokazatelj poremećaja sekrecije mlečne žlezde koji ima velikog uticaja na higijensku ispravnost mleka. Cilj ovog rada je bio da se proceni higijenski kvalitet sirovog mleka praćenjem ukupnog broja aerobnih kolonija i broja somatskih ćelija. Uzimanje uzoraka sirovog mleka je izvršeno tri puta u periodu od mesec dana na gazdinstvima sa područja opštine Titel. Ukupno je uzorkovano 148 uzoraka sirovog mleka. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija i broja somatskih ćelija u uzorcima sirovog mleka izvršeno je standardnim metodama. Prosečan broj mikroorganizama varirao je od 100 CFU/ml do 2 990 000 CFU/ml, dok je broj somatskih ćelija bio u rasponu od 27 270 do 327 240 u 1 ml mleka. Prosečan broj aerobnih kolonija u uzorcima sirovog mleka iznosio je 31 300 CFU/ml u prvom uzorkovanju, 1 019 420 CFU/ml u drugom i 20 700 CFU/ml u trećem uzorkovanju. Ovako visoka varijabilnost, vezana za mikrobiološki kvalitet mleka koje potiče sa iste lokacije u različitim danima uzorkovanja, je posledica nestandardizovanih postupaka tokom muže, čuvanja i transporta sirovog mleka. Visok broj utvrđenih mikroorganizama ukazuje na neadekvatne higijenske mere tokom primarnih manipulacija sa mlekom. Kako bi se postiglo dobijanje mleka što boljeg mikrobiološkog kvaliteta, neophodna je kontinuirana edukacija vezana za dobru proizvođačku i dobru higijensku praksu i standardne sanitarne procedure svih učesnika u proizvodnji sirovog mleka.

Ključne reči: bezbednost hrane, dobra higijenska praksa, dobra proizvođačka praksa, somatske ćelije, ukupan broj mikroorganizama

¹Dr sci. vet. med. Dragana Ljubojević Pelić, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Dalibor Todorović, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Miloš Pelić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Jelena Vranešević, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Suzana Vidaković Knežević, istraživač saradnik; Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Jasna Kureljušić, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, Srbija

³Dr sci. vet. med. Marija Pajić, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: dragana@niv.ns.ac.rs

UVOD

Mleko je namirnica koja zbog svoje visoke nutritivne vrednosti zauzima značajno mesto u ishrani ljudi (Haug i sar., 2007). Činjenica je da mleko u velikoj meri konzumiraju deca, ali i stari ljudi, koji predstavljaju osetljive kategorije stanovništva. Sa druge strane, mleko je zbog obilja hranjivih materija pogodan medijum za razvoj različitih mikroorganizama koji mogu da prouzrokuju njegov kvar. Mikrobiološki kvalitet sirovog mleka je veoma značajan sa gledišta bezbednosti hrane i osnovni je preduslov za dobijanje proizvoda od mleka koji su bezbedni za ishranu ljudi. Posebno je značajna činjenica da u slučaju prisustva patogenih mikroorganizama u mleku, može doći do narušavanja zdravlja potrošača.

U savremenoj intenzivnoj proizvodnji mleka, veliki problem predstavljaju česte upale mlečne žlezde. Visokoproizvodne mlečne krave su po svojoj konstituciji predisponirane za nastanak različitih metaboličkih poremećaja (Obučinski i sar., 2019) koji dovode do smanjenja opšte otpornosti organizma, a posledično i do pojave sekundarnih infekcija prouzrokovanih fakultativno patogenim mikroorganizmima. Na higijenski kvalitet mleka, veliki uticaj ima i broj somatskih ćelija i dobro je poznato da je povećanje broja somatskih ćelija pokazatelj poremećaja sekrecije mlečne žlezde (Sharma i sar., 2011). Takođe je poznato da kvalitet sirovog mleka direktno utiče na kvalitet mlečnih proizvoda (De Silva i sar., 2016; Murphy i sar., 2016). Tehnološke karakteristike mleka, sa povećanim brojem mikroorganizama i somatskih ćelija, su pogoršane. Može se desiti čak i da je mleko neupotrebljivo za preradu, pri čemu su promene najizraženije u procesu proizvodnje sira i fermentisanih mlečnih proizvoda. Stoga je bitno da sirovina koja se koristi u proizvodnji bude kvalitetna.

Imajući u vidu sve navedeno izuzetno je značajna adekvatna primena svih neophodnih higijenskih mera od strane samih proizvođača mleka, a kasnije i prerađivača. Ispunjenje higijenskih propisa u pogledu ukupnog broja aerobnih kolonija i broja somatskih ćelija u sirovom mleku je veoma značajno sa aspekta proizvodnje pasterizovanog mleka i sireva, kao i svih ostalih proizvoda od mleka. Pravilnikom o kvalitetu sirovog mleka (Sl. glasnik RS 106/2017) propisani su uslovi u pogledu kvaliteta sirovog mleka pri otkupu, kao i način ocene kvaliteta sirovog mleka posle uzorkovanja. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama i broja somatskih ćelija su najvažniji pokazatelji higijenskog kvaliteta sirovog mleka. Otkup sirovog mleka mogu da vrše samo proizvođači koji redovno ispituju kvalitet sirovog mleka u ovlašćenoj laboratoriji. Sirovo mleko se otkupljuje samo ako je dobijeno od zdravih i obeleženih muznih grla. Cilj ovog rada je bio da se ispita ukupan broj mikroorganizama i broj somatskih ćelija u uzorcima sirovog mleka mleka poreklom od poljoprivrednih gazdinstava u tri različita dana i da se ukaže na neophodnost konstantnog održavanja dobre higijenske i proizvođačke prakse i sistema kvaliteta kako bi se sprečila pojava oscilacija higijenskog kvaliteta mleka.

MATERIJAL I METODE

Uzorkovanje sirovog mleka

Ispitivanja su obavljena na uzorcima koji su poreklom sa poljoprivrednih gazdinstava sa područja opštine Titel. Uzorkovanje je izvršeno u tri dana u jednakim razmacima u periodu od mesec dana. Ukupno je uzorkovano 148 uzoraka sirovog mleka. Transport uzoraka izvršen je u namenskom vozilu, sa hladnjačom, na temperaturi od 0 do 4 °C u roku do 2 sata od trenutka uzorkovanja.

Laboratorijsko ispitivanje uzoraka

Ispitivanje uzoraka sirovog mleka je urađeno odmah po dostavljanju uzoraka u laboratoriju. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u uzorcima sirovog mleka izvršeno je akreditovanim metodom prema standardu SRPS EN ISO 4833-1:2014. Broj somatskih ćelija je utvrđen na osnovu standardne operativne procedure "Određivanje broja somatskih ćelija u mleku", koja se zasniva na principu brojanja ćelija uz pomoć mikroskopa na obojenom razmazu.

REZULTATI I DISKUSIJA

Prema članu 19, „Pravilnika o kvalitetu sirovog mleka” (Sl. glasnik RS 106/2017) kravle sirovo mleko se, u zavisnosti od ukupnog broja mikroorganizama i somatskih ćelija, razvrstava na tri kategorije (tabela 1).

Tabela 1. Podela kravljeg sirovog mleka po klasama

Parametar	I klasa	II klasa	III klasa
Ukupan broj mikroorganizama	< 100.000 CFU/ml	100.001 - 400.000 CFU /ml	> 400.000 CFU/ml
Ukupan broj vsomatskih ćelija	< 400.000 /ml	< 400.000/ml;	< 400.000 /ml

Rezultati ispitivanja ukupnog broja mikroorganizama, kao i broja somatskih ćelija svih uzoraka mleka koji su uzorkovani u prvom uzorkovanju odgovarali su vrednostima koje su propisane za mleko I klase. Prosečan broj mikroorganizama i somatskih ćelija, po mestu porekla sirovog mleka u sva tri uzorkovanja, prikazan je u tabeli 2. Rezultati koji su dobjeni za broj somatskih ćelija su ukazali da su svi uzorci u sva tri uzorkovanja bili u saglasnosti sa članom 19. Pravilnika o kvalitetu sirovog mleka („Službeni glasnik RS“, broj 106/2017).

Tabela 2. Prosečan broj mikroorganizama i somatskih ćelija u uzorcima sirovog mleka po mestu porekla

Poreklo mleka i broj uzoraka (n)	I uzorkovanje		II uzorkovanje		III uzorkovanje	
	X _{mo}	X _{sć}	X _{mo}	X _{sć}	X _{mo}	X _{sć}
Mošorin n = 30 u 1. uzorkovanju; n = 29 u 2. i 3. uzorkovanju	31600 ± 27563.8	74689 ± 25394	722440 ± 811431.9	90912 ± 63556	33100 ± 86953.9	78675 ± 42464
Gardinovci n = 1 u sva tri uzorkovanja	33000	40905	1160000	45450	2000	45450
Vilovo n = 1 u sva tri uzorkovanja	47000	90900	2820000	227250	100	118170
Šajkaš n = 8 u sva tri uzorkovanja	49770 ± 33466.3	56812 ± 15744	1795350 ± 1149574.5	67037 ± 32568	950 ± 1596.4	122713 ± 38712
Đurđevo n = 7 u sva tri uzorkovanja	11407.14 ± 13012.7	101288 ± 29304	1023590 ± 1010933	87004 ± 22021	1490 ± 2105.1	103885 ± 83617
Žabalj n = 3 u sva tri uzorkovanja	20700 ± 5483.6	42420 ± 9461	275400 ± 199498	93930 ± 67464	1030 ± 950.4	110595 ± 22876
UKUPNO n = 50 u 1. uzorko- vanju; n = 49 u 2. i 3. uzorkovanju	31300 ± 27500	73265 ± 27739	1019420 ± 1008087.4	88495 ± 57301	20070 ± 68287.8	91548 ± 50321

Legenda: X_{mo} - Prosečan broj mikroorganizama (x ± SD), X_{sć} - Prosečan broj somatskih ćelija (x ± SD)

Rezultati ispitivanih mikrobioloških parametara su ukazali da je 6 (12,24%) ispitivanih uzoraka mleka koji su uzorkovani u drugom uzorkovanju odgovaralo parametrima koji su propisani za mleko I klase u pogledu ukupnog broja mikroorganizama. U istom uzorkovanju rezultati ispitivanih parametara 16 (32,65%) uzoraka su odgovarali parametrima koji su propisani za mleko II klase, dok su rezultati ispitivanih parametara 27 (55,1%) uzoraka odgovarali parametrima propisanim za mleko III klase u pogledu ukupnog broja mikroorganizama. U trećem uzorkovanju, rezultati ispitivanih parametara 46 (93,9%) uzoraka odgovarali su

parametrima koji su propisani za mleko I klase u pogledu ukupnog broja mikroorganizama. Rezultati ispitivanih parametara 2 uzoraka (4,08%) su odgovarali parametrima koji su propisani za mleko II klase, a rezultati ispitivanih parametara 1 uzorka (2,04%) su odgovarali parametrima koji su propisani za mleko III klase.

U istraživanju koje su sproveli Petrović i sar. (2006) na teritoriji opštine Gornji Milanovac utvrđeno je da je prosečan broj mikroorganizama iznosio 844 875/ml, a bio je u rasponu od 112 000 – 5 000 000/ml. Prosečan broj somatskih ćelija je u pomenutom istraživanju bio 357 850/ml i takođe je veoma varirao i kretao se od 98 000 do 696 000/ml što ukazuje na prisustvo kliničkog ili supkliničkog mastitisa kod muznih grla. Autori kao uzrok visoke varijabilnosti, kada je reč o ukupnom broju mikroorganizama u uzorcima sirovog mleka, navode nestandardizovani način muže i skladištenja mleka. Rezultati dugogodišnjih istraživanja higijensko-sanitarnog kvaliteta mleka u Vojvodini koje su sproveli Vujčić i sar. (1987) su dokazali da je ukupan broj bakterija bio u rasponu od 6×10^5 do 2×10^7 /ml. Prema tadašnjim zakonskim propisima, sirovo mleko koje je sadržavalo više od 3×10^6 CFU/ml mikroorganizama se smatralo higijenski neispravnim i oko 50 % uzoraka mleka je imalo veći broj mikroorganizama od propisanog. Pored toga, ustanovili su da je u mleku koje je poticalo od individualnih proizvođača broj bakterija bio preko 4×10^7 CFU/ml do bezbroj u razređenju 10^7 . U istom istraživanju, od 114 uzoraka zbirnog mleka u toku 1986. godine samo je 38 % uzoraka imalo broj somatskih ćelija ispod kritičnog nivoa koji je prema tadašnjem pravilniku bio 500 000/ml, odnosno 62 % uzoraka je bilo higijenski neispravno kada su somatske ćelije u pitanju, pri čemu je oko 47 % uzoraka od individualnih proizvođača sadržalo preko 10^6 /ml somatskih ćelija. Zanimirivanje pranja i sanitizacije opreme je tada prepoznato kao primaran problem kako u prošlosti tako i u budućnosti kako bi se postigao dobar mikrobiološki kvalitet mleka. Rezultati analiza broja somatskih ćelija u uzorcima sirovog mleka u toku različitih godišnjih doba koje je objavila Pešić Mikulec (2007) su dokazali da je broj neusaglašenih uzoraka bio 6 (12 %) u zimskim mesecima, 14 (25,4 %) u proleće, 17 (22,3 %) % leto i 25 (43,8 %) % u jesen. Bogdanovičová i sar. (2016) su ispitali mikrobiološki i higijenski kvalitet mleka krava, koza i ovaca u Češkoj i ustanovili da je ukupan broj mikroorganizama bio u rasponu od $8,3 \times 10^2$ do $1,2 \times 10^9$ CFU/ml, a somatskih ćelija između $1,6 \times 10^4$ i $6,8 \times 10^6$ ćelija/ml, pri čemu je 13 % uzoraka odstupalo od propisanih vrednosti u periodu od 2012 do 2014. godine. Rezultati istraživanja koje su objavili Ibtisam i sar. (2007) su dokazali da je u zemljama u razvoju, ukupan broj bakterija u sirovom mleku značajno veći (4×10^5 do $3,3 \times 10^{11}$ CFU/ml).

Bakteriološka kontaminacija sirovog mleka potiče iz tri glavna izvora: bakterijske kontaminacije sa površine sisa i vimena, kontaminacije sa površine ruku i opreme koja dolazi u dodir sa mlekom i od bakterija koje su povezane sa mastitisom (Elmoslemany i sar., 2010). Usitnjena proizvodnja je prepoznata kao vodeći razlog za odstupanja u higijenskim parametrima mleka, odnosno u ukupnom broju mikroorganizama i broju somatskih ćelija (Petrović i sar., 2006). Spa-

hić-Bajrić i sar. (2015) navode da je veliki problem, kada je proizvodnja mleka u BiH u pitanju, mala prosečna proizvodnja po kravi na godišnjem nivou i njegov higijenski kvalitet što dalje ima uticaja na otkupnu cenu mleka i samu ekonomičnost proizvodnje. Mlekare značajan udeo proizvedenog mleka otkupljuju sa farmi koje su malog kapaciteta ili od individualnih proizvođača i za njih je veoma značajno povećati i ujednačiti odnosno postići odgovarajući kvalitet mleka kako bi mogli dalje unaprediti proizvodnju i ostvariti veću finansijsku dobit. Pozitivan uticaj veličine farme i stepena edukovanosti proizvođača na higijenu proizvodnje i kvalitet proizvedenog mleka je utvrđen u BiH i u Makedoniji (Srbinovska, 2007; Spahić-Bajrić i sar. 2015). Postoji dugogodišnji trend smanjivanja broja proizvođača od kojih mlekare otkupljuju mleko i taj trend će se sigurno nastaviti, pri čemu će se broj grla po gazdinstvima, odnosno farmama, povećati.

Higijenski kvalitet mleka može biti uslovljen sa više faktora, među kojima su mlečnost, način držanja (organsko, konvencionalno) i godišnje doba. Istraživanje koje su sproveli Elmoslemany i sar. (2010) dokazuje da na ukupan broj mikroorganizama u uzorcima sirovog mleka utiču godišnje doba, kao i stepen zaprljanosti vimena i sisa. Veći broj bakterija tokom leta je povezan sa višom ambijentalnom temperaturom i mogućnošću bakterija da rastu. Međutim, rezultati istraživanja koje su sproveli Bogdanovičová i sar. (2016) su ukazali da godišnje doba nije značajno uticalo na prosečan broj bakterija u sirovom mleku krava. Razlika između organskog i konvencionalnog načina držanja je bila statistički značajna i u konvencionalnom sistemu je prosečan ukupan broj mikroorganizama bio niži u odnosu na organski. Spahić-Bajrić i sar. (2015) su ispitali povezanost rezultata higijenskog skora proizvodnog procesa na farmi i parametara kvaliteta sirovog mleka, odnosno ukupnog broja bakterija i broja somatskih ćelija i rezultati njihovog istraživanja ukazuju na značajan uticaj redovnog sprovođenja higijenskih mera u procesu proizvodnje na parametre higijenske ispravnosti, a time i na kvalitet sirovog mleka. Prljavština koja se nalazi na sisama i vimenu je važan izvor bakterija iz okruženja u mleku. Dodatni problem je i činjenica, da kada je povećan procenat krava sa prljavim vimenom i sisama, dolazi i do povećanja vremena koje je neophodno da se vime pripremi za mužu. Ovo može značajno da utiče na efikasnost muže i da dovede do toga da su vime i sise neadekvatno pripremljeni. Utvrđena je i veza između stepena zaprljanosti vimena i učestalosti pojave mastitisa, pa tako krave sa prljavim vimenom imaju 1,5 puta veću verovatnoću da budu inficirane sa patogenima koji izazivaju mastitis u odnosu na čiste krave (Schreiner i sar., 2003). Elmoslemany i sar. (2009) su utvrdili pozitivnu vezu između higijene vimena i broja bakterija u sirovom mleku. Ustanovili su da je potapanje sisa pre muže i naknandno brisanje i sušenje sa posebnom krpom bilo povezano sa smanjenim sadržajem bakterija u sirovom mleku. Potapanje sisa u adekvatan dezinficijens je najefikasniji način da se one dezinfikuju, a sušenje sisa pre izmuzanja je ustanovljeno kao najvažniji korak prilikom pripreme sisa za mužu. Samo pranje sisa bez sušenja bilo je povezano sa povećanim sadržajem bakterija. Korišćenje jedne krpe za sušenje vimena više krava nakon pranja je rezultiralo većim ukupnim brojem bakterija u odnosu na krave kod kojih je korišće-

na posebna krpa za svaku kravu. Takođe, korišćenje istog peškira povećava i rizik od transmisije patogena izazivača mastitisa među kravama i smanjuje efikasnost sušenja sisa. Rezultati do kojih su došli Wattenburger i sar. (2020) su potvrdili da ribanje krajeva sisa alkoholom, nakon dezinfekcije pre muže sa dezificijensom na bazi joda, uz sušenje sisa minimalizuje kontaminaciju mleka. Kontaminacija mleka se dešava i u toku skladištenja i transporta usled neadekvatne čistoće uređaja i sudova. Ručno čišćenje tanka za mleko je povezano sa povećanim rizikom za povećan broj bakterija usled činjenice da je povezano sa manjom upotrebom deterdženata, kiselina i sa nižom temperaturom rastvora za pranje. Neadekvatno skladištenje sredstava za pranje i dezinfekciju može značajno uticati na smanjivanje njihove efikasnosti. Takođe, nedaekvatno hlađenje ima veliki uticaj na porast broja bakterija. Početni broj bakterija u mleku ima uticaja na brzinu njihovog porasta. Pored toga, ne treba zanemariti ni nepovoljno dejstvo lošeg higijenskog kvaliteta mleka na tehnološka svojstva mleka, kao i na kvalitet mleka i mlečnih proizvoda (De Silva i sar., 2016; Murphy i sar., 2016). Mikrobiološki kvalitet pasterizovanog mleka u velikoj meri zavisi od mikrobiološkog kvaliteta sirovog mleka (Sarkar, 2015). Ukoliko se mleko, koje je slabog mikrobiološkog kvaliteta, odnosno mleko sa visokim sadržajem mikroorganizama upotrebljava u proizvodnji mlečnih proizvoda, takvi proizvodi su lošijeg randmana, lošijeg kvaliteta i samim tim im je i ekonomska vrednost manja u odnosu na proizvode koji se proizvedu od mleka visokog mikrobiološkog kvaliteta. Nesumnjivo je da je veoma važno da se kontroliše higijenski kvalitet sirovog mleka kako ne bi došlo do problema tokom proizvodnje, ali i da bi se zaštitili potrošači. Mlekare će u budućnosti sve više davati prednost otkupu mleka kvaliteta prve klase, čime će povećati pritisak na proizvođače da povećaju kvalitet sirovog mleka i da pre svega osiguraju da on bude ujednačen. Potrebno je naglasiti da proizvodnja mleka koje je visokog higijenskog kvaliteta, počinje na poljoprivrednom gazdinstvu i da je direktno povezana sa procedurama, a pre svega higijenskim navikama i dobrom proizvođačkom praksom na gazdinstvu. Za proizvođače mleka je veoma važno, ne samo da povećaju količinu sirovog mleka koje proizvode, nego i da povećaju njegov kvalitet, kao i da omoguće da on bude konstantan. Svakako da postoji mnogo prostora za poboljšanje celokupnog procesa proizvodnje sirovog mleka, higijene muže i drugih radnih operacija i da se na taj način doprinese poboljšanju kvaliteta sirovog mleka ali i boljem ekonomskom poslovanju farmi, odnosno proizvođača mleka.

ZAKLJUČAK

Kada se uzme u obzir značaj koji mleko zauzima u ishrani ljudi, a posebno osetljivih kategorija stanovništva, veoma je važno ukazati na neophodnost primene dobre higijenske i proizvođačke prakse kako bi se obezbedilo snabdevanje mlekom dobrog higijenskog kvaliteta. Potrebno je kontinuirano ukazivati na neophodnost konstantne primene kontrole mleka i proizvoda od mleka. Preduslovi za dobijanje mleka koje je zadovoljavajućeg kvaliteta, odnosno mleka bezbednog

za konzumaciju, su adekvatna zdravstvena zaštita i dobro zdravstveno stanje muznih grla, dobri uslovi držanja uz adekvatnu izbalansiranu ishranu, higijena štale, higijena muže i higijena osoblja.

Zahvalnica:

Ovaj rad je rezultat istraživanja po Ugovoru sa Ministarstvom prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIV-NS u 2022. godini, broj 451-03-68/2022-14/200031.

REFERENCE

1. Bogdanovičová K., Vyletěllová-Klimešová M., Babák V., Kalhotka L., Koláčková I., Karpíšková R. 2016. Microbiological quality of raw milk in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Science*, 34: 189–196. doi: 10.17221/25/2016-CJFS
2. De Silva S.A.S.D., Kanugala K.A.N.P., Weerakkody N.S. 2016. Microbiological quality of raw milk and effect on quality by implementing good management practices. *Procedia food science*, 6: 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2016.02.019>
3. Elmoslemany A.M., Keefe G.P., Dohoo I.R., Jayarao B.M. 2009. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 2. Bacteria count specific risk factors. *Journal of Dairy Science*, 92: 2644–2652. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1812>
4. Elmoslemany A.M., Keefe G.P., Dohoo I.R., Wichtel J.J., Stryhn H., Dingwell R.T. 2010. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive veterinary medicine*, 95(1-2): 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.03.007>
5. Haug A., Høstmark A.T., Harstad O.M. 2007. Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids in health and disease*, 6(1): 25.
6. Ibtisam E., El Zubeir M., Ahmed Mahbora I.A. 2007. The hygienic quality of raw milk produced by some dairy farms in Khartoum State, Sudan. *Research Journal of Microbiology*, 2: 988–91.
7. Murphy S.C., Martin N.H., Barbano D.M., Wiedmann M. 2016. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. *Journal of Dairy Science*, 99(12): 10128–10149.
8. Obućinski D., Soleša D., Kučević D., Prodanović R., Tomaš Simin, M., Ljubojević Pelić D., Puvača, N. 2019. Upravljanje lipidnim profilom i oksidacijskim statusom kod krava holstein i simentasko pasmine tijekom laktacije. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 69(2): 116–124. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2019.0206>
9. Pešić Mikulec D. 2007. Značaj broja somatskih ćelija u mleku u odnosu na HACCP princip. 2007. Zbornik naučnih radova, 13 (3-4): 77–84.
10. Petrović M.D., Petrović M.M., Nenadović G., Kurčubić V., Marinkov G. 2006. Hemijski-mikrobiološki parametri kvaliteta sirovog kravljeg mleka. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 22(5-6): 109–119.
11. Pravilnik o kvalitetu sirovog mleka (Sl. glasnik RS 106/2017)
12. Sarkar S. 2015. Microbiological Considerations: Pasteurized Milk. *International Journal of Dairy Science* 10 (5): 206–218.
13. Schreiner D.A., Ruegg P.L. 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86: 3460–3465. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030203739502>
14. Sharma N., Singh N.K., Bhadwal M.S. 2011. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(3): 429–438.
15. Spahić-Bajrić A., Pračić N., Savić Đ., Jahić S. 2015. Higijenski skor proizvodnog procesa na farmi i njegov odnos sa kvalitetom sirovog mlijeka: 1. Broj somat-

skih ćelija i ukupan broj mikroorganizama. *Агрознање*, 16 (4): 491-503. **16.** Srbinovska S. 2007. Higijena i kvaliteta mleka u Republici Makedoniji u suglasnosti sa legislativom. *Savremena poljoprivreda*, 56(5): 61-68. **17.** SRPS EN ISO 4833-1:2014. https://iss.rs/sr_Cyrl/project/show/iss:proj:47948. **18.** Vujčić I.F., Bačić B., Škrinjar M, Maslovarić B., Vulić M., Stojanović E. 1987. Higijenski kvalitet mleka u Vojvodini. *Mljekarstvo*, 37(10): 299-304. **19.** Wattenburger K., Schmidt R., Placheta L., Middleton J.R., Adkins P.R.F. 2020. Evaluation of 4 different teat disinfection methods prior to collection of milk samples for bacterial culture in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(5): 4579-4587. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17338>

NALAZ HEMIJSKIH KONTAMINENATA U HRANI ANIMALNOG POREKLA

Aleksandra Tasić¹, Ivan Pavlović¹, Đorđe Radojičić¹, Milan Baltić²

Kratak sadržaj

Dugotrajana izloženost hemijskim zagađivačima je uzrok hroničnih oboljenja, ali i povećanog rizika za kancerogeni efekat. Uobičajeno je mišljenje potrošača da je hrana biljnog porekla, koja se direktno tretira pesticidima jedini problem, ali i hrana animalnog porekla može predstavljati rizik po zdravlje ljudi. Izvori kontaminacije hrane animalnog porekla su mnogobrojni: hrana biljnog porekla u toku ishrane životinja, voda, dezinfekcija prostora za gajenje životinja, tretiranje životinja veterinarskim lekovima, dodatak prehrambenih aditiva i sveprisutni industrijski zagađivači, kao što su teški metali, polihlorovani bifenili i dioksini. Hemijski kontaminanti uglavnom ne dovode do promena koje se mogu zapaziti senzornim ispitivanjem hrane. Načini kontaminacije zavise od porekla hrane, lokacije i njene upotrebe. Od namirnica animalnog porekla, najveći akcenat je na mesu čija je poštrosnja u velikom porastu od 1980-te godine. Zbog toga je praćenje hemijske bezbednosti i utvrđivanje prisustva kontaminenata, pre svega perzistentnih zagađivača u hrani animalnog porekla, obavezno i neophodno. Maksimalne dozvoljene količine hemijskih zagađivača propisane su zakonskom regulativom Republike Srbije, koja je u velikoj meri usklađena sa regulativom Evropske unije i prati smernice kontrole Svetske zdravstvene organizacije. U radu su prikazani rezultati hemijskih ispitivanja hrane animalnog porekla u periodu od 2018. do 2021. godine. Cilj rada je bio da se, sa aspekta bezbednosti, sagleda stanje hrane animalnog porekla na području Republike Srbije kroz kontrolu kako domaćih tako i proizvoda koji se uvoze.

Ključne reči: *animalni proizvodi, pesticidi, teški metali*

UVOD

Proizvodnja hrane je kompleksan proces na koji utiče niz faktora sa glavnim ciljem u ostvarivanju nutritivno korisnih i zdravstveno bezbednih proizvoda. Sistem kontrole hrane je koncipiran u svrhu sprečavanja opasnosti po zdravlje stanovništva, kroz kontrolu kvaliteta i bezbednosti sirovina i gotovih proizvo-

¹Dr sci. vet. med. Aleksandra Tasić, naučni saradnik; Akademik Dr sci. vet. med. Ivan Pavlović, naučni savetnik; Msc. chem. Đorđe Radojičić, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, Srbija

²Dr sci. vet. med. Milan Baltić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija
e-mail adresa autora za korespondenciju: alekstasic79@gmail.com

da (Verhagen i sar., 2021). Iako od svih opasnosti koje preovlađuju u hrani animalnog porekla, one koje su biološke prirode u najvećem broju slučajeva dovode do najvećeg kratkoročnog rizika po zdravlje potrošača, javnost generalno percipira hemijske kontaminante kao najvažnije bezbednosno pitanje. Sledstveno tome, kriterijum kojim se određuje prihvatljivost proizvoda ili serije proizvoda na tržištu obuhvata podjednako i mikrobiološku i hemijsku bezbednost hrane. Intenzivni tehnološki razvoj procesa proizvodnje namirnica animalnog porekla zahteva kontrolu proizvedenih namirnica, čime se obezbeđuje poštovanje standarda o bezbednosti hrane, uslovljavajući odgovornost industrije i proizvođača u snabdevanju bezbednom hranom, a time se postiže adekvatna zdravstvena zaštita potrošača (Baydan i sar., 2017; Singh, 2021). U proceni hemijskog rizika karakterišu se različiti potencijalno toksični efekti koji nastaju usled izlaganja određenoj identifikovanoj opasnosti. Procena rizika obuhvata: 1) procenu efekta identifikovane hemijske opasnosti i određivanje doze, 2) procenu izloženosti i 3) karakterizaciju rizika, što obuhvata određivanje učestalosti izlaganja i ozbiljnost negativnih efekata koje može izazvati kod ljudi. Pri određivanju rizika osnovni, ali ne i jedini parametar, je procena prekoračenja maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK). Pri definisanju režima monitoringa, prate se osnovni elementi koji utiču na rizik, odnosno usaglašenost sa datom vrednošću MDK (Panseri i sar, 2013). Agencije za bezbednost hrane širom sveta oslanjaju se na formalnu analizu rizika kako bi utvrdile koje hemijske opasnosti zaista predstavljaju rizike, takozvanu procenu rizika i koje mere treba preduzeti da se efekti umanje i/ili spreče (upravljanjem rizikom). Za procenu rizika, na nacionalnom nivou, u Srbiji je zaduženo nacionalno telo za bezbednost hrane, odnosno Stručni savet u oblasti bezbednosti hrane, kao i nacionalne institucije koje se usaglašavaju na regionalnom i globalnom nivou sa Evropskom agencijom za bezbednost hrane (EFSA), Svetskom zdravstvenom organizacijom i Organizacijom za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih Nacija.

Glavni izvori hemijskih opasnosti u hrani animalnog porekla (meso, mleko, riba, jaja, med) obuhvataju kategoriju „opasnosti koje se mogu izbeći“ (tj. ostatke veterinarskih lekova, pesticide, aditive za hranu ili hranu za životinje, materijale u kontaktu sa hranom) i kategoriju „neizbežnih opasnosti“ (perzistentni organski zagađivači, teški metali, zagađivači koji se pojavljuju u prirodi i zagađivači nastali tokom obrade hrane) (Antary i sar, 2021). Upotreba veterinarskih lekova, kao što su antimikrobni lekovi, hormoni, stimulatori rasta i sredstva za smirenje, može dovesti do štetnih efekata po ljudsko zdravlje. Ostaci lekova mogu biti prisutni u hrani životinjskog porekla i mogu dovesti do trenutne toksičnosti kao što su alergijske reakcije ili do dugoročnih zdravstvenih problema kao što su kancer ili poremećaji ljudske mikrobiote. Veterinarski lekovi u hrani animalnog porekla, mogu se pojaviti kroz legalnu i zabranjenu upotrebu i mogu biti posledica direktnog davanja leka životinji, kroz životnu sredinu ili na druge načine. Većina zemalja, pa tako i Srbija, utvrđuje dozvoljene nivoe ostataka lekova i pesticide u hrani životinjskog porekla i prati rezidue putem rutinskog i ciljanog nadzora. Kontaminacija hemijskim supstancama iz životne sredine je značajan globalni

problem bezbednosti hrane, zbog toga što one pripadaju različitim grupama, uključujući metale/metaloide, policiklične aromatične ugljovodonike (PAH), perzistentne organske zagađivače (POPs), farmaceutske proizvode i mnoge druge. Neki od njih se prirodno javljaju u životnoj sredini, dok su drugi poreklom iz antropogenih izvora. Praćenje nivoa kontaminacije i razmatranje puteva i prisustva hemijskih kontaminanata je od vitalnog značaja za uspostavljanje i unapređenje dobijanja bezbedne hrane na globalnom nivou. Tako na primer, Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA), sumiranjem rezultata ispitivanih uzoraka, pre svega na prisustvo pesticida, na godišnjem nivou, ukazuje na stanja bezbednosti hrane i kritične tačke, a istovremeno daje smernice o kontroli i praćenju pesticida u odgovarajućim matriksima. Zbog prirode kontaminacije, neki proizvodi animalnog porekla mogu biti više kontaminirani od drugih. Uzroci su: različita izloženost pesticidima i ostalim kontaminantima, način gajenja životinja i dobijanja proizvoda, kao i način pakovanja u amabalažu.

Cilj ovog rada je prikaz i sumiranje rezultata četvorogodišnjeg praćenja prisustva određenih kontaminanata u proizvodima animalnog porekla, mesu, ribi, mleku, jajima i medu, poreklom iz Srbije i iz uvoza.

MATERIJALI I METODE

Analizirano je 300 uzoraka mesa i 50 uzoraka proizvoda od mesa. Obrađeni su podaci analizirane ribe (250 uzoraka sveže i 50 konzerviranih), mleka i proizvodi od mleka (50 uzorka), jaja (48 uzoraka) i meda (24 uzoraka) u periodu od 2018. do 2021. godine. Ispitani uzorci ribe su bili poreklom iz Hrvatske, Španije, Tajlanda, Maroka, Vijetnama i drugih zemalja. Ispitivana jaja su bila sa teritorije Beograda ili uvežena iz Austrije. Ispitivanje olova, kadmijuma i žive sprovedeno je atomskom apsorpcionom spektrometrijom na instrumentu PinAAcle 900T proizvođača Perkin Elmer (Radojičić, 2021). Ispitivanje pesticida i polihlorovanih bifenila analizirano je gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (Knudsen i Tasić, 2021). U analiziranim uzorcima je ispitivano prisustvo sledećih grupa pesticida: insekticida (fenoksikarb, fipronil, fipronil sulfone, karbaril, karbofuran, hlорfenapir, hlорpirifos, propoksur, piridaben), fungicida (azoksistrobin, boskalid, fludioksonil, imazalil, kresoksim metil, metalaksil, spiroksamine, paklobutrazol, propikonazol, trifloksistrobin), organofosfatnih jedinjenja (acefate, diazinon, dihlорvos, dimetoate, fosmet, malation, metil paration, paration), piretroida (bifentrin, ciflutrin, cipermetrin, etoprofos, etofenproks, permetrin, praletrin) i organohlornih jedinjenja (aldrin, endosulfan I, alfa HCH, beta HCH, lindan, delta HCH, endosulfan II, dieldrin, endrin, endrin keton, endosulfan sulfat, heptahlor, heptahlor epoksid (trans, isomer A), metoksihlor, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, heksahlobenzen, cis i trans hlordan). U svim analiziranim uzorcima je, istovremeno sa pesticidima, praćeno prisustvo i polihlorovanih befenila (PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 180).

REZULTATI ISPITIVANJA

U tabeli 1 su prikazani rezultati ispitivanih riba i proizvoda ribarstva uvezenih u Republiku Srbiju. Najveći procenat ispitanih riba su bile sardine (42%), skuše (28%) i tune (14%), dok su ostale analizirane ribe bile različitih vrsta u manjem procentu i karakteriše ih znatno manja zastupljenost ispitanih metala.

Tabela 1. Sadržaj teških metala u uzorcima riba

Parametar	Tuna (n=55)		
	Pb	Cd	Hg
< LOQ (%)	41 (74,5)	41 (74,5)	17 (31,0)
min - max vred., mg/kg	0,02-0,19	0,005-0,044	0,020-1,12
sr. vred ± SD, mg/kg	0,07±0,08	0,012±0,005	0,327±0,355
Skuša (n=110)			
Parametar	Pb	Cd	Hg
< LOQ (%)	62 (56,4)	61 (55,5)	77 (70,0)
min - max vred., mg/kg	0,02-0,14	0,005-0,070	0,020-0,089
sr. vred ± SD, mg/kg	0,05±0,04	0,018±0,023	0,051±0,027
Sardina (n=165)			
Parametar	Pb	Cd	Hg
< LOQ (%)	107 (64,8)	84 (50,9)	91 (55,2)
min - max vred., mg/kg	0,02-0,06	0,005-0,087	0,020-0,131
sr. vred ± SD, mg/kg	0,06±0,05	0,028±0,023	0,072±0,035

LOQ - limit kvantifikacije, (olovo 0,020 mg/kg; kadmijum 0,005 mg/kg; 0,020 mg/kg)

Tabele 2 i 3 prikazuju sumarno opseg određenih koncentracija pesticida i PCB u analiziranim uzorcima i učestalost pojavljivanja u odgovarajućoj vrsti hrane animalnog porekla.

Tabela 2. Učestalost i opseg koncentracija organohlornih pesticida i sume PCB dobijenih u uzorcima animalnog porekla, izraženi u µg/kg

Namirnice	Učestalost pojavljivanja broj uzoraka	Σaldrin i dieldrin, µg/kg	ΣHeptahlor, µg/kg	ΣHCH, µg/kg	ΣDDT, µg/kg	ΣPCB, µg/kg
Mlečni proizvodi	3;3;2	n.d.	11,0-25,1	25,2-36,8	10,0-15,4	n.d.
Meso	3;4	n.d.	10,0-28,4	30,3 -35,0	n.d.	n.d.
Jaja	3	22,3 -23,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Riba	25;33	n.d.	n.d.	n.d.	40,7-45,8	15,1-28,2
Konzervirana riba	4;15	n.d.	22,3 -36,0	n.d.	n.d.	21,6-29,5

n.d.- nije detektovano

Tabela 3. Sadržaj organohlornih pesticida, fungicida, piretroida i organofosfata u uzorcima hrane

Namirnice	Broj uzoraka >LOQ (%)	Organohlorni pesticidi, mg/kg	Fungicidi, mg/kg	Piretroidi, mg/kg	Organo-fosfati, mg/kg
Mlečni proizvodi	6	0,005-0,015	n.d.	n.d.	0,005-0,030
Meso	7	0,005-0,022	0,005-0,015	n.d.	0,005-0,055
Živinsko meso	2	0,005-0,008	n.d.	0,005-0,045	0,005-0,029
Jaja	5	n.d.	n.d.	n.d.	0,005-0,010
Riba	15	0,005-0,010	n.d.	0,006-0,018	0,008-0,025
Konzervirana riba	13	0,005-0,012	n.d.	0,005-0,042	0,004-0,021
Med	5	n.d.	0,012-0,050	0,020-0,030	0,008-0,032

n.d.- nije detektovano

LOQ - limit kvantifikacije svakog pojedinačnog ostataka pesticida je 0,005 mg/kg

DISKUSIJA

Nalaz teških metala

U Srbiji je potrošnja ribe relativno mala što se objašnjava nedostatkom navika vezanih za ovaj način ishrane. Takođe, našu zemlju karakterišu neznatni kapaciteti prerade ribe, zbog čega se potrebe tržišta za proizvodima ribe podmiruju iz uvoza pa je obim uvoza praktično veći od domaćeg ulova, odnosno proizvodnje ribe u akvakulturi. Konzumacija ribe se smatra važnim izvorom esencijalnih elemenata i jedinjenja kao što su selen, jod, vitamin D i esencijalne masne kiseline. S tim u vezi su i preporuke o konzumiranju minimalno dva obroka ribe nedeljno (Krauss i sar. 2000). Istovremeno, poznato je da riba može biti jedan od glavnih puteva izloženosti za živu i perzistentne organske zagađivače. Nivoi kontaminacije ribe zavise od vrste ribe i sadržaja masti (posebno za zagađivače rastvorljive u mastima) (Fromberg et al. 2011), područja gde žive ribe, starosti ribe i načina prerade.

Na osnovu dobijenih rezultata, riba i proizvodi od ribe, koji se sa jedne strane smatraju zdravom hranom zbog prisustva omega masnih kiselina, sa druge strane se mogu smatrati i najviše kontaminiranom hranom animalnog porekla zbog prisustva različitih kontaminanata. Riba i proizvodi od ribe iz uvoza zadovoljile su propise u smislu MDK vrednosti osim prekoračenja koncentracije Hg u tuni (tabela 1). Studija o ispitivanju ribe i ribljih proizvoda u Srbiji (Vitošević i sar, 2007) za uvežene proizvode ribarstva u toku 2007. godine u Srbiji, dokazala je da su koncentracije metala bile ispod dozvoljenih MDK vrednosti, što se donekle slaže sa našim rezultatima za posmatrani period sa Hg u tuni kao izuzetak. Meso i proizvodi od mesa su namirnice visoke nutritivne vrednosti koje su u srpskoj kuhinji tradicionalno najzastupljenije na meniju. Ispitivanje proizvoda od mesa na teritoriji Srbije u periodu od 2018. do 2021. godine, kada je analizirano 50 uzo-

raka na prisustvo metala i pesticida, nije dalo zabrinjavajuće rezultate sa vrednostima iznad maksimalno dozvoljenih koncentracija. U uzorcima mleka i mlečnih proizvoda, tokom kontrole, akcenat je stavljen na prisustvo olova i organohlornih pesticida. U 4 uzorka mleka detektovano je olovo na nivou maksimalno dozvoljene vrednosti od 0,02 mg/kg. Koncentracije ispitanih metala u uzorcima meda su bile ispod granice kvantifikacije.

Nalaz rezidua pesticida

Rezidue pesticida u hrani animalnog porekla su najčešće rezultat ostataka pesticida u hrani za životinje. Termin pesticid se koristi za proizvode kao što su insekticidi, fungicidi, rodenticidi, repelenti insekata, herbicidi ili sredstva za ubijanje korova, kao i za neke lekove koji su dizajnirani da spreče, unište, suzbiju ili smanje broj različitih vrsta štetočina.

U uzorcima svinjskog mesa u tri, odnosno četiri uzorka, detektovani su heptahlor i izomeri lindana u opsegu od 10,0 do 28,4 µg/kg, odnosno 30,3-35,0 µg/kg, respektivno, dok su nivoi ostalih pesticida bile ispod maksimalno dozvoljenih koncentracija propisanih regulativom Republike Srbije. Takođe, dobijeni rezultati su u skladu sa podacima drugih autora da su izomeri lindana i DDT najčešće detektovani u uzorcima mesa (Panseri i sar, 2013). Sve više se u uzorcima animalnog porekla prate i pesticidi novije generacije, pri čemu su u mesu, iznad limita kvantifikacije, detektovani hlorspirifos i fenitrotion, dok u ispitanim uzorcima mleka pesticidi nisu detektovani (Kang i sar, 2020). U ispitanim uzorcima ribe, detektovani su p,p' DDT, endrin aldehyd, α-endosulfan i endosulfan sulfat u koncentracionom opsegu od 10,0 - 45,8 µg/kg. U jednom od objavljenih ispitivanja za pasterizovano i sterilizovano mleko, HCH izomeri i metoksihlor nisu detektovani ni u jednom od analiziranih uzoraka, dok je alfa-endosulfan detektovan u nekim UHT uzorcima mleka, ali je njegova količina bila ispod granice kvantifikacije. S druge strane, različiti nivoi heptahlor (do 65,42 µg/kg), heptahlor epoksida (do 2,62 µg/kg), aldrina (do 3,86 µg/kg), p,p' -DDE (do 4,28 µg/kg) i dieldrina (do 4,85 mg/kg) su kvantifikovani u uzorcima mleka (Özdemir i sar, 2019). U izveštaju Evropske agencije za bezbednost za 2015. godinu, u 616 uzoraka putera, iznad limita kvantifikacije je detektovano prisustvo DDT, heksahlorbenzena i dieldrina (EFSA, 2017). Od ispitanih uzoraka u 12,8 % je detektovan jedan ili više rezidua pesticida. Pomenuti pesticidi su detektovani ispod MDK vrednosti. Takođe, u izveštaju agencije za 2019. godinu, kada su u pitanju organohlorni pesticidi koji su i najveći zagađivači hrane životinjskog porekla, najučestalije je pojavljivanje u animalnim proizvodima zabranjenih pesticida DDT i heksahlorbenzena. Od ostalih pesticida najzastupljenija je kontaminacija jaja insekticidom fipronilom i bubrega životinja organofosfatnim pesticidom hlorspirifosom (EFSA, 2021). Heksahlorbenzen je primenjivan u poljoprivredi za zaštitu biljaka i to pšenice, ovsa, ječma i raži, dok u industriji nastaje u proizvodnji hlorovanih rastvarača. Kada su u pitanju rezultati ispitivanja riba, koje se najčešće smatraju indikatorima zagađenja životne sredine, rezultati istraživanja riba iz reke Dunav (Srbija), krupatice

i mrene potvrdili su prisustvo heksahlorbenzena, izomera DDT i polihlorovanih bifenila. Vrednosti za ukupnu količinu izomera DDT su od 2,57 ng/g za mreću, odnosno 13,80 ng/g za krupaticu, a evidentno najveći doprinos ukupnom DDT daje metabolit p,p'-DDT što je u saglasnosti sa istraživanjima i drugih autora (Đinović-Stojanović i sar, 2013).

U analiziranim uzorcima jaja, uveženim sa područja Evrope, nisu detektovani hemijski kontaminanti u značajnim koncentracijama, što se objašnjava intenzivnom kontrolom, strogim merama i poboljšanim menadžmentom u proizvodnji nakon slučajeva kontaminacije jaja fipronilom u toku 2017. godine.

Jedan od većih problema kontaminacije hrane animalnog porekla je i proizvodnja takozvanih mešoviti proizvoda, odnosno proizvoda sa dodatkom voća ili povrća. Primeri ovih proizvoda su mlečni napici sa voćem, konzerve ribe sa povrćem ili limunom, kao i panirani proizvodi od ribe, mesa ili sira. Podaci, u nama dostupnoj naučnoj i stručnoj literaturi o rezultatima ispitivanja prisustva pesticida u ovakvim mešovitim proizvodima, su veoma oskudni. U dugogodišnjim ispitivanjima organohlornih pesticida u hrani animalnog porekla u dostupnoj literaturi je ukazano na prisustvo organohlornih pesticida u uzorcima hrane što govori o njihovom prisustvu u životnoj sredini. Tako su u studiji o praćenju uzoraka u toku 2019 i 2020. godine u Jordanu (Antary i sar., 2021), u jajima i mesu, koncentracije dieldirina i DDT bile u opsegu od 0,01 do 0,08 mg/kg masti. Objavljeni rezultati istraživanja drugih, za sadržaj organohlornih pesticida u konzerviranoj ribi, odnosno tunjevini i sardini u marketima u Srbiji, dokazuju da je srednja vrednost za zbir endosulfana (endosulfan I, endosulfan II i endosulfan sulfat) u uzorcima konzerviranih sardina bila 85,0 µg/kg, što je iznad MDK. Najveći deo pripada endosulfanu II (78,0 µg/kg). U konzerviranoj tuni, najveće detektovane koncentracije su bile za δ-HCH (60,6±97,0 µg/kg) i p,p'-DDT (55,0±25,1 µg/kg). Heptahlor i izomerni eposkid nisu detektovani u ispitanim uzorcima (Kartalović i sar. 2016), dok su najniže srednje vrednosti dobijene za cis-hlordan (1,3±0,1 µg/kg) i trans-hlordan (1,8±2,7 µg/kg). Najučestalije detektovani su bili sledeći pesticidi u uzorcima konzervirane tune: metoksihlor (63,2%), lindan (45,6%) i delta-HCH (43,8%), dok je delta-HCH (51,6%) kvantifikovan u konzerviranoj sardini. Ispitivanju meda i proizvoda od meda pridaje se mnogo na značaju s obzirom da je Srbija jedna od deset zemalja sa najvećom proizvodnjom i treća po obimu izvoza u Evropi. S obzirom da se pri izvozu meda prati prisustvo preko 500 različitih hemijskih kontaminenata, zahvaljujući trudu pčelara i dobroj pčelarskoj praksi, prisustvo pesticida u medu ne predstavlja potencijalni rizik. Prisustvo insekticida, fungicida i akaricida je detektovano u proizvodima od meda, ali su vrednosti bile ispod dozvoljenih koncentracija. Ispitivani uzorci nisu imali zabrinjavajuće vrednosti hemijskih kontaminenata. U zaključku se može konstatovati da je pojava ostataka organohlornih pesticida u svežem mesu, ribi i mlečnim proizvodima i dalje evidentna, ali da je koncentracija ovih perzistentnih jedinjenja niska, pa i potencijalni rizik nije zabrinjavajući.

Nalaz polihlorovanih bifenila i drugih kontaminenata

Polihlorovani bifenili, polihlorovani dibenzo-p-dioksini (PCDD), dibenzofurani (PCDF) i polihlorovani bifenili slični dioksinu (dl-PCB), su jedinjenja čija analiza spada u najizazovnije zadatke u analitičkoj hemiji. To su toksična jedinjenja koja opstaju u životnoj sredini i akumuliraju se u lancu ishrane (Đinović Stojanović i sar, 2013). Dioksini nemaju tehnološku ili drugu primenu, ali nastaju u nizu termičkih i industrijskih procesa kao neželjeni i često neizbežni sporedni proizvodi. PCB-i su imali široku upotrebu u brojnim industrijskim primenama i proizvodili su se u velikim količinama nekoliko decenija sa procenjenom ukupnom svetskom proizvodnjom od 1,2-1,5 miliona tona, sve dok nisu bili zabranjeni u većini zemalja (do 80-ih godina prošlog veka). Dioksini i PCB se nalaze na niskim nivoima u mnogim namirnicama. Dugotrajna izloženost ovim supstancama izaziva niz štetnih efekata na nervni, imuni i endokrini sistem i narušava reproduktivne funkcije. Njihova otpornost i činjenica da se akumuliraju u lancu ishrane, posebno u životinjskoj masti, izaziva određenu bezbednosnu zabrinutost. Dioksini i neki PCB, koji se nazivaju PCB slični dioksinu (zbog njihovih sličnih toksikoloških svojstava), se često razmatraju zajedno u kontekstu javnog zdravlja. Drugi PCB koji se nazivaju „PCB koji nisu slični dioksinu“ imaju drugačiji mehanizam toksičnosti, ali takođe mogu izazvati štetne efekte na zdravlje (Janković i sar, 2011). Rezultati ispitivanja PCB koji nisu slični dioksinu (ndl PCB) (28, 52, 101, 138, 153 i 180) za deset različitih slatkovodnih vrsta riba iz reke Dunav potvrdila je njihovu u opsegu od 2,7 do 98,1 ng/g i od 4,9 do 68,3 ng/g u 2001. i 2006. godini. Tokom 5 godina, sadržaj ndl PCB se u određenim regijama značajno povećao i ndl PCB je varirao od 13,7 do 46,1 ng/g i od 14,4 do 107,2 ng/g u 2001. i 2006. godini, tim redom. PCB 138 i 180 su bili dominantni kongeneri u 2001. godini, dok su u 2006. najzastupljeniji PCB kongeneri bili 138 i 153 (Janković i sar, 2011). U našim ispitivanjima dominantni kongeneri PCB bili su 118 i 153, a najučestaliji nalaz je bio kod sardina.

ZAKLJUČAK

Hemijska kontaminacija hrane predstavlja ozbiljnu potencijalnu opasnost po zdravlje. Kontaminacija hrane je posledica zagađene životne sredine, ali nastaje i tokom obrade, pakovanja, pripreme, skladištenja i transporta hrane. Iako se veliki naponi ulažu kako bi se smanjila izloženost zagađivačima hrane, još uvek postoje mere koje treba preduzeti da bi se smanjili zdravstveni rizici i bolesti koje nastaju usled hemijske kontaminacije hrane. Može se istaći da je poslednjih godina došlo do značajnog napredka u analizi hemijskih kontaminenata, a pre svega ostataka pesticida. Različite metode pripreme rezidua pesticida kao i primenjene tehnike detekcije u analizi pesticida se sve više usavršavaju i daju zadovoljavajuće rezultate. Veliki pomak u analizi pesticida je postignut razvojem savremenih tehnika gasne i tačne hromatografije sa masenom detekcijom. Na osnovu iznetih rezultata, može se reći da i uprkos dugom vremenu zabranjene upotrebe organohlorinskih pesticida, oni i dalje figuriraju u životnoj sredini i posledično u hrani.

U vezi sa tim, potrebno je i dalje sprovesti rigorozne mere kontrole pesticida, teških metala i PCB, a takođe je neophodno i povećavati obim ispitivanja rezidua pesticida u hrani. Obzirom, da je prisutvo teških metala iznad LOQ, najučestalije kvantifikovano kod riba, potreban je stalan monitoring i nadzor, ali i kod ostalih matriksa animalnog porekla, koji su i našem ispitivanju imali vrednosti koncentracije teških metala na granici kvantifikacije.

Zahvalnica:

Studiju je finansiralo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor br. 451-03-68/2022-14/200030).

LITERATURA

1. Antary T, Alawi M, Kiwan R, Haddad N. 2021, Residues of Organochlorine Pesticides in Food of Animal Origin from Northern Governorates of Jordan in 2019 and 2020. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30, 2326-32. 2. Besil N, Pequeño F, Garcia N.G., Angulo P, Pareja P, Heinzen H. et al. 2020, 13th European Pesticide Residue Workshop, Spain, 274. 3. Djinović-Stojanović J, Spasić J, Popović A, Vranić D, Nikčević M., Hegediš A. et al. 2013. Distribucija organohlorinih pesticida i polihlorovanih bifenila u dve vrste riba iz Dunava. *Tehnologija hrane* 54 (1), 69-78. 4. Ferreira V, Estrella L, Alves M., Gallistl C., Vetter V, Silva T. et al. 2019, Residues of legacy organochlorine pesticides and DDT metabolites in highly consumed fish from the polluted Guanabara Bay, Brazil: distribution and assessment of human health risk. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 5. Fromberg A, Granby K, Højgård A, Fagt S, Larsen J.C. 2011. Estimation of dietary intake of PCB and organochlorine pesticides for children and adults. *Food Chemistry*, 125 (4):1179–1187. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.10.025. 6. Gawel M., Kiljanek T, Niewiadowska A., Semeniuk S, Goliszek M, Burek O, Posyniak A. 2019. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 282, 36-47. 7. Harada M. 1995. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by Environmental Pollution, *Critical Reviews in Toxicology*, 25 (1), 1-24. 8. Janković S., Ćurčić M., Radičević T. et al. 2011. Non-dioxin-like PCBs in ten different fish species from the Danube River in Serbia. *Environ Monit Assess* 181, 153–63. 9. Kang H.S., Kim M., Kim E.J., Choe W. 2020. Determination of 66 pesticide residues in livestock products using QuEChERS and GC-MS/MS. *Food Science and Biotechnology*, 29, 1573–86. 10. Kartalović B, Novakov N.J., Mihaljev Ž., Petrović J., Prica N., Babić J. et al. 2016, Organochlorine pesticides in canned tuna and sardines on the Serbian market, *Food Additives & Contaminants: Part B*. 11. Knudsen T.Š., Tasić A. 2021. Multiclass Multipesticide Residue Analysis in Hake on the Market in Serbia. EMEC 2021, 21st European Meeting on Environmental Chemistry, Novi Sad, Serbia, Knjiga apstrakta, 170. 12. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ et al. 2000. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation*. 2000 Oct 31;102(18):2284-99. 13. Novakov N.J., Mihaljev Ž.A., Kartalović B.D., Blagojević B.J., Petrović J., Ćirković M.A. et al. 2017. Heavy metals and PAHs in canned fish supplies on the Serbian market, *Food Additives & Contaminants: Part B*, 10:3, 208-15. 14. Oliveira L., Kurz M., Guimarães M., Martins M., Prestes O., Zanella R. et al. 2019. Development and

validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC–MS. *Food Chemistry* 297, 124944. **15.** Özdemir C., Özdemir S., Oz E., Oz F. 2019. Determination of organochlorine pesticide residues in pasteurized and sterilized milk using QuEChERS sample preparation followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Food Processing and Preservation* <https://doi.org/10.1111/jfpp.14173>. **16.** Panseri S., Biondi P.A., Vigo D., Communod R., Chiesa L.M. 2013. Occurrence of organochlorine pesticides residues in animal feed and fatty bovine tissue. *Food industry*, DOI: 10.5772/54182. **17.** Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje (“Sl. glasnik RS”, br. 132/2020). **18.** Radojičić Đ. 2021. Determination of heavy levels in sardine samples. 2nd International UNIfood Conference. Beograd, Knjiga apstrakata, 102. **19.** Singh S. 2021. Global footprints of organochlorine pesticides: a pan-global survey. *Environ Geochem Health*, <https://doi.org/10.1007/s10653-021-00946-7>. **20.** European Food Safety Authority. 2017. The 2015 European Union report on pesticide residues in food, *EFSA Journal*, 15(4), 4791. **21.** European Food Safety Authority. 2021, The 2019 European Union report on pesticide residues in food, doi: 10.2903/j.efs.a.2021.6491, www.efsa.europa.eu/efsajournal. **22.** Verhagen H., Alonso-Andicoberry C., Assunção R., Cavaliere F., Eneroth H., Hoekstra J. et al. 2021, Risk-benefit in food safety and nutrition – Outcome of the 2019 Parma Summer School, *Food Research International*, 141, 110073. **23.** Vitošević B., Samardžić S., Antonijević V. Jakovljević V. 2007. Teški metali u životnim namirnicama uvoznog porekla i njihove eventualne toksikološke implikacije. *Medicus*, 8(2): 62-66, UDK 614.31:669.018.674.

DERIVATI CELULOZE KAO MATERIJAL NA BIOBAZI ZA STRUKTURISANJE OLEOGELOVA

*Milica Glišić¹, Marija Bošković Cabrol¹, Milan Ž. Baltić¹,
Vladimir Drašković¹, Zoran Maksimović²*

Kratak sadržaj

Svest o ljudskom zdravlju i održivosti kontinuirano raste poslednjih 20 godina čime se javila potreba za promenom navika potrošača, koji sa rastom ekonomije i kupovne moći sve više zahtevaju visoko kvalitetnu hranu, naročito meso i proizvode od mesa. Sa razvojem koncepta „clean label“ i poboljšanjem nutritivnog sastava hrane, naročito sa aspekta sadržaja zasićenih masti, industrija hrane počinje da se okreće novim tehnologijama kojima bi se donekle zadovoljile pomenute potrebe potrošača. Oleogelacija, odnosno strukturisanje jestivih ulja i formulisanje oleogelova, poslednjih godina naročito privlači pažnju proizvođača hrane. Postoji nekoliko strategija za strukturisanje ulja koje podrazumevaju korišćenje različitih gelatora (trigliceridi, masne kiseline, fitosteroli, voskovi, proteini, polisaharidi). Gelatori bi trebalo da su bezbedni i odobreni za korišćenje, ekonomični, prilagodljivi različitim matriksima i sa osobinama sličnim lipidima, kao i fizičkim svojstvima koja omogućavaju njihovu adekvatnu primenu u hrani. Celulozni derivati, kao jeftini materijali koji su generalno prepoznati kao bezbedni (GRAS), imaju veliki potencijal za korišćenje u farmaceutskoj industriji i industriji hrane. Nakon ekstrakcije celuloze iz biljnog materijala, korišćenjem različitih metoda modifikacije, dobijaju se forme celuloze sa poboljšanim fizičkim i hemijskim svojstvima kao što su: etil celuloza, celulozni acetat, hidroksipropil metil celuloza, karboksimetil celuloza (CMC), mikrokristalna celuloza (MCC) i nanoceluloza. U ovom radu su sumirane aktuelne strategije za razvoj oleogelova, upotreba modifikovane celuloze kao polimernog gelatora i potencijal primene modifikovane celuloze i oleogela na bazi celuloze u proizvodima od mesa.

Ključne reči: *celulozni hidrokoloide, dijetna vlakna, oleogelovi, proizvodi od mesa, zamene za mast*

UVOD

Sa porastom životnog standarda ljudi, rastu i potrebe za zdravijom hranom i promenom životnih navika. U domenu kvaliteta i zdravlja, konkretno proizvoda

¹Dr sci. vet. med. Milica Glišić, naučni saradnik; dr sci. vet. med. Marija Bošković Cabrol, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Milan Ž. Baltić, redovni profesor u penziji; dr vet. Vladimir Drašković, asistent, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

²Dr Zoran Maksimović, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: glisic.mica@gmail.com

od mesa, tokom poslednje dve decenije, najviše pažnje je bilo posvećeno izučavanju nutritivnog sastava (proteini, masti, holesterol, kolagen, sastav esencijalnih amino-kiselina itd.), smanjenju prisustva potencijalno nezdravih jedinjenja (holesterol, policiklični aromatični ugljovodonici (PAH), nitrati, natrijum), obogaćenju bioaktivnim komponentama (pre- i probiotici, konjugovana linolna kiselina, fitosteroli, vitamini, selen, dijetna vlakna, fenolna jedinjenja itd.) i unapređenju bezbednosti proizvoda (mikrobiološki i hemijski hazardi) (Ursachi i sar., 2020). Među zdravim proizvodima, najveću pažnju naučne javnosti i industrije privlače proizvodi od mesa sa smanjenim sadržajem masti i funkcionalni proizvodi od mesa. Smatra se da su proizvodi od mesa primarni izvor zasićenih masti u ishrani ljudi (Zhou i sar., 2022). Dugotrajno konzumiranje visokokalorične hrane, bogate zasićenim i *trans* mastima, povećava rizik od nastajanja različitih metaboličkih poremećaja kao što su gojaznost, koronarne bolesti i dijabetes (Martins i sar., 2020). U cilju smanjenja, generalno negativnog uticaja hrane bogate mastima, nekoliko zdravstvenih organizacija je razvilo strategiju i uputilo apel vladinim i nevladinim sektorima za preduzimanje akcija na globalnom, regionalnom i lokalnom nivou kojima će se podržati zdrava ishrana i fizička aktivnost, odnosno poboljšati masnokiselinski sastav hrane, smanjiti sadržaj zasićenih i *trans* masti u ishrani (WHO, 2020).

Jedna od strategija u formulisanju funkcionalnih proizvoda podrazumeva povećanje sadržaja dijetnih vlakana u proizvodima od mesa (Das i sar., 2020). Evropsko društvo kardiologa (European Society of Cardiology) je 2021. godine izdalo preporuku da bi dnevni unos dijetnih vlakana za odraslu osobu trebalo da bude od 35-40 g (Visseren i sar., 2021). Poslednjih godina, u brojnim publikacijama su opisane mogućnosti dodavanja različitih dijetnih vlakana, sa celulozom kao glavnom komponentom, u proizvodima od mesa: vlakna šećerne trske, kokosovog jezgra, ananasa, banane, kožice grožđa, pirinčanih mekinja, ovsu i pšenice (Zhou i sar., 2022; Pereira i sar., 2021; Pereira i sar., 2020; Talukder i Sharma, 2010). Naime, smanjenje sadržaja masti i povećanje sadržaja dijetnih vlakana u proizvodima od mesa predstavlja novi pravac u proizvodnji zdravih, funkcionalnih, proizvoda od mesa, gde je dokazano da celuloza ima odličan potencijal (Zhou i sar., 2022).

MODIFIKOVANE FORME CELULOZE

Hidrokoloidi predstavljaju grupu strukturno različitih dugolančanih polimera (polisaharidi ili proteini) sa brojnim hidrosilnim grupama koji mogu da se ponašaju kao polielektroliti (Jimenez-Colmenero i sar., 2013). Među njima, celuloza predstavlja makromolekularni polimer koji se sastoji od β -D-glukopiranozil grupa vezanih β -1,4 glikozidnim vezama. Celuloza je najzastupljeniji biopolimer u prirodi koji se kroz fotosintezu na godišnjem nivou proizvede u količini od 10^{11} do 10^{12} tona (Rol i sar., 2019). Supramolekularne strukture celuloze uključuju kristalne i amorfne regione. Naime, u molekulu celuloze kristalne strukture su razdvojene amornim regionima, a istovremeno su kristalne strukture i povezane

velikim brojem vodoničnih veza. Vodonične veze u molekulu u velikoj meri ograničavaju upotrebu celuloze. Celuloza nije rastvorljiva u vodi, ali se, raskidanjem većine vodoničnih veza ili supstitucijom grupa, može konvertovati u jedinjenje rastvorljivo u vodi (Zugenmaier, 2021). Tako je neophodno celulozu modifikovati korišćenjem različitih metoda kako bi se poboljšala fizička i hemijska svojstva i omogućila njena lakša primena u različitim proizvodima. Metode modifikacije se mogu podeliti na: fizičke, hemijske, biološke i kombinovane. Naročito su se kombinovane metode pokazale efikasnijim i bez štetnog uticaja na životnu sredinu tokom procesa dobijanja modifikovane celuloze (MC). Nakon primene ovih metoda, mogu se dobiti sledeće forme MC: etil celuloza, celulozni acetat, metil celuloza, hidroksipropil metil celuloza, karboksimetil celuloza (CMC), mikrofibriarna celuloza, mikrokristalna celuloza (MCC) i nanoceluloza (Zhou i sar., 2022).

Tako su primenom fizičke metode ekstruzije dobijena modifikovana vlakna bambusa sa značajno većom sposobnošću bubrenja, vezivanja ulja i vode (Yang i sar., 2021). Nakon tretmana ultrazvučnim talasima, dobija se forma celuloze koja povećava stabilnost emulzija sa dodatim nanokristalnim partikulama (Meirelles i sar., 2020). Karboksimetilacija molekula celuloze povećava bubrenje, kapacitet zadržavanja vode i adsorpcije glukoze (Zhang i sar., 2019). Prisustvo etarskih grupa u molekulima metil celuloze, hidroksipropil metil celuloze i etil celuloze omogućava njihovu primenu kod stabilizacije emulzija i pene. Metilceluloza obezbeđuje karakteristike slične mastima i smanjuje adsorpciju ulja kod pržene hrane (Fennema, 1996). Zhang i sar. (2019) su dokazali da enzimska hidroliza vlakana pšeničnih mekinja primenom celulaza i ksilanaza, poreklom od mikroorganizama povećava sposobnost zadržavanja ulja, kapacitet adsorpcije glukoze i nitritnih jona.

PRIMENA MODIFIKOVANE CELULOZE U INDUSTRIJI MESA

U industriji hrane, hidrokoloide imaju brojne primene, kao zgušnjivači, zamene za mast, za pravljenje filmova i pakovanja (Zhang i sar., 2022). Modifikovani celulozni materijali su svoju primenu najviše našli u prezervaciji mesa i proizvoda od mesa. Poslednjih godina, veliki broj studija je bio posvećen upravo proizvodnji filmova za pakovanje, indikator filmova, celuloznih jastučića i podmetača i površinskih celuloznih prevlaka. Glavna funkcija ovih proizvoda, na bazi MC, među kojima se naročito izdvajaju filmovi za pakovanja na bazi nanoceluloze i CMC, je poboljšanje kvaliteta i produžavanje održivosti mesa i proizvoda od mesa tokom skladištenja (Zhou i sar., 2022). MCC i CMC su i veoma efikasni inhibitori heterocikličnih aromatičnih amina (HAA) u dimljenim i grilovanim proizvodima od mesa (Zhang i sar., 2022). S druge strane, manje je podataka u literaturi posvećeno direktnoj primeni MC u proizvodima od mesa. Ona se smatra dobrim izvorom vlakana za povećanje nutritivne vrednosti proizvoda od mesa (Younes i sar., 2018). Može se na dva načina dodavati u proizvode od mesa: direktno ili nakon emulzifikacije sa biljnim uljima (oleogelovi). Takođe se koristi i u proizvodnji analoga mesa na biljno-proteinskoj bazi (Zhou i sar., 2022).

Direktna primena MC u proizvodima od mesa

Direktno dodavanje MC na različite načine utiče na fizičko-hemijske karakteristike proizvoda od mesa. U frankfurterima sa smanjenim sadržajem masti i soli, CMC je poboljšala sposobnost zadržavanja vode (WHC - Water Holding Capacity), stabilnost emulzije, čvrstoću i viskoznost nadeva (Lim i sar., 2015). Zhang i sar. (2022) su dokazali da dodavanje CMC povoljno utiče na karakteristike miofibrilarnog gela. Kao dobre zamene za mast u junećim paštetama bez uticaja na senzorsku prihvatljivost proizvoda ističu se MCC i CMC (Gibis i Weiss, 2017; Gibis i sar., 2015). U niskomasnim fermentisanim kobasicama, sa smanjenim sadržajem soli, dodavanje 2% MCC u nadev je povećalo broj bakterija mlečne kiseline, dok je MCC u kombinaciji sa vlaknima ovsu inhibirala razvoj oksidativnih procesa i poboljšala čvrstoću i žvakljivost proizvoda (Dos Santos i sar., 2021). Međutim, Pematilleke i sar. (2021) ističu da CMC u fino usitnjenim proizvodima od mesa dovodi do smanjenja čvrstoće. Naime, pored forme MC, koncentracija u kojoj se ona dodaje bitno utiče na krajnje karakteristike proizvoda. Tako je u studiji Gibis-a i saradnika (2017) dokazano da se dodavanjem 0,5% CMC uspešno može smanjiti sadržaj masti u junećim paštetama, dok 1% CMC onemogućava formiranje strukturne mreže proteina u nadevu. Suprotno tome, sa porastom koncentracije MCC (0,5-3%) uočene su poboljšane teksturalne i senzorske karakteristike paštete, gde je dokazano da je MCC izuzetno kompatibilna sa mesnim matriksom (Gibis i sar., 2015). Na karakteristike mesnog matriksa značajno utiču interakcije između celuloze i proteina. Dodavanjem MC, menjaju se molekulske veze i sile u protenima mesa (disulfidne veze, hidrofobna interakcija, elektrostatička interakcija i vodonične veze) koje na kraju i određuju kvalitet novog višekomponentnog sistema (Zhou i sar., 2022).

Oleogelovi

Razvoj svesti o brizi zdravlja ljudi i održivosti, kontinuirano dovodi do promena u navikama potrošača i podstiče razvoj novih materijala na bio-bazi koji su ekološki prihvatljivi i koji se mogu koristiti u reformulisanju postojećih i osmišljavanju novih proizvoda. U takve materijale, naročito poslednjih 15 godina, ubrajaju se organogelovi i oleogelovi. Organogelovi su polučvrsti materijali koji sadrže frakcije organskih rastvarača zarobljenih u mreži strukturnih molekula, a ukoliko su ti organski rastvarači tečna ulja, onda se radi o oleogelovima. Ovi materijali izgledaju kao gelovi, imaju čvrstu strukturu i predstavljaju izazov, kako sa naučnog, tako i sa tehnološkog aspekta, kada se govori o njihovoj primeni u formulisanju inovativnih proizvoda (Pinto i sar., 2021). Različita polja istraživanja u oblasti oleogelacije usmerena su ka: razumevanju procesa geliranja u zavisnosti od vrste rastvarača; interakciji gela sa drugim sastojcima i ponašanju prilikom procesa prerade; interakciji i ponašanju bioaktivnih jedinjenja koja se dodaju u oleogelove. U poslednjih 10 godina, može se naći veliki broj publikacija vezanih za razvoj, proizvodnju, karakterizaciju i primenu organogelova i oleogelova naj-

više u oblasti hrane, dok su nešto manje zastupljeni u farmaceutskoj industriji (Cerqueira i sar., 2022; Pinto i sar., 2021).

Oleogelovi na bazi biopolimernih gelatora imaju primenu u industriji hrane kao zamene za mast. Kada se dodaju u usitnjenim proizvodima od mesa, glavno svojstvo koje treba da ispolje je stabilnost prilikom mehaničke degradacije. Tokom procesa proizvodnje oleogelova, gelator indukuje formiranje trodimenzionalne mreže u uljanom medijumu, pri čemu zamena za mast dobija karakteristike slične gelu, odnosno odgovarajuća reološka svojstva slična čvrstom masnom tkivu. Na taj način se sprečava gubitak uljanih komponenti oleogela tokom tehnološkog procesa prerade proizvoda od mesa, kao i prodiranje drugih sastojaka mesnog matriksa u oleogel (Glisic i sar., 2021). Pored zamene za mast, jedna od interesantnijih primena sistema na bazi oleogelova je inkorporacija jedinjenja rastvorljivih u mastima, gde oni predstavljaju nosače za funkcionalne supstance. Pri tome se, ovakva primena oleogelova može vršiti i na mikro i na nano nivou, čime se dodatno modifikuju načini otpuštanja aktivnih supstanci (Pinto i sar., 2021). Dodatno, kako bi se zadovoljile potrebe i zahtevi potrošača, industrija hrane mora da obezbedi visoku stabilnost i bolju prezervaciju proizvoda, naročito kod reformulisanih niskomasnih proizvoda obogaćenih polinezasićenim masnim kiselinama. U prevazilaženju ovih problema, oleogelovi sa jedinstvenim viskoelastičnim, termalnim, mehaničkim i optičkim svojstvima su bili dobra opcija (Cerqueira i sar., 2022).

Celuloza kao oleogelator

Poznato je da poslednjih godina raste interesovanje za upotrebom prirodnih sastojaka u različitim industrijskim sektorima zbog generalne tendencije ka promovisanju zamene neobnovljivih sirovina, sirovinama iz obnovljivih izvora i minimiziranju štetnog uticaja na životnu sredinu izazvanim otpadnim materijalom od industrije (Sánchez i sar., 2011a). Iz ovog razloga se brzo razvija novo tržište bazirano na "eco-friendly" proizvodima, dok su potrošači istovremeno vrlo voljni da probaju nove proizvode i čak da plate veću cenu za proizvod koji nudi alternativu i smanjuje se negativni uticaj na životnu sredinu (Sánchez i sar., 2011a). Korišćenjem biorazgradivih polimera, mogu se prevenirati problemi životne sredine u različitim oblastima s obzirom da su mali troškovi njihove proizvodnje i laka prerada u velikim količinama. Među biopolimerima, celuloza i njeni derivati su godinama atraktivna opcija zbog različitih mogućnosti primene, gde ovi materijali imaju bitnu ulogu (Hong i sar., 2010). Trenutno na tržištu postoji velika potražnja za proizvodima kao što su oleogelatori koji su otporni prema visokim i niskim temperaturama i izlaganju visokom pritisku. Takođe je veliko interesovanje i za potpuno novim biorazgradivim materijalima sa istim ili sličnim fizičko-hemijskim karakteristikama koji su ekološki prihvatljiviji u odnosu na konvencionalne gelatore (Sánchez i sar., 2011b).

Reološke karakteristike i ostala funkcionalna svojstva oleogelova zavise, kako od samih sastojaka, tako i od procesa proizvodnje. Dobru mehaničku, ter-

mičku i reološku stabilnost su imali oleogelovi napravljeni sa mešavinom etil celuloze i/ili metil celuloze i α -celuloze (Sánchez i sar., 2011b; 2011c). Mehanička svojstva oleogelova su predodređena hemijskim karakteristikama celuloznih materijala. Tako je dokazano da postoji određena kritična vrednost molekularne mase etil celuloze ($MW < 70\ 000$) ispod koje se ne uočava promena mehaničkih svojstava oleogelova, dok se, korišćenjem etil celuloze veće molekulske mase od kritične, uočava značajno poboljšanje mehaničkih svojstava dobijenih oleogelova (Sánchez i sar., 2011c). Sa druge strane su oleogelovi na bazi celuloznih derivata dosta osetljivi prema visokim temperaturama ($>60\ ^\circ\text{C}$) i uz tendenciju otpuštanja uljane komponente, što se dovodi u direktnu vezu sa uticajem temperature na termoreverzibilni prelazak etil celuloze iz sol u gel stanje (Sánchez i sar., 2011c). Međutim, reološke karakteristike oleogelova su određene i hemijskim karakteristikama rastvarača i interakcijom polimer-rastvarač (ulje). Tako da, ukoliko biljno ulje koje se koristi za proizvodnju oleogela ima veći sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, dolazi do većeg razdvajanja polimernih lanaca i manjeg broja vezivnih tačaka u polimernoj mreži.

Oleogelovi na bazi MC u proizvodima od mesa

U oleogelovima, MC povećava viskoznost i formira mrežu koja sprečava kretanje i koalescenciju kapi ulja i na taj način omogućava stabilnost emulzije. Dodavanjem emulzije biljnih ulja koje sadrže MC, ne samo da se povećava sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, već i sadržaj dijetnih vlakana u proizvodima od mesa (Zhou i sar., 2022). Wang i sar. (2018) su dokazali da se zamenom 50% masti u viršlama oleogelom na bazi nanoceluloze i palminog ulja, povećavaju parametri teksture, WHC i L^* vrednost, dok ukupna senzorska prihvatljivost proizvoda nije bila izmenjena. Slično su utvrdili Qi i sar. (2020) i Hu i sar. (2017) korišćenjem oleogelova sojinog ulja stabilizovanih nanocelulozom i regenerisanom celulozom kao zamene za mast u kobasicama. U studiji Oh i sar. (2019), ukupna prihvatljivost burgera nije bila značajno promenjena nakon zamene 50 % masti oleogelom na bazi hidroksipropil metil celuloze i ulja uljane repice. Imajući u vidu da se radi o fiziološki inertnom jedinjenju bez mirisa, ukusa i kalorijske vrednosti koje je rastvorljivo u uljima, etil celuloza je modifikovana forma celuloze koja je najviše primenjivana u oleogelovima kao zamenama za mast u različitim proizvodima od mesa (Frankfurter i sar., 2020; Gómez-Estaca i sar., 2019; Barbut i sar., 2016). Međutim, dodavanje emulzija različitih ulja (laneno, maslinovo, sojino, riblje ulje) stabilizovanih etil celulozom kao gelatorom imalo je negativni efekat na senzorske karakteristike burgera i pašteta (Zhou i sar., 2022; Adili i sar., 2020; Gómez-Estaca i sar., 2019).

BEZBEDNOSNI ASPEKT MC

Bezbednost i nutritivna vrednost modifikovanih formi celuloze nakon ingestije reevaluirana je od strane *European Food Safety Authority* (EFSA) na zahtev Evropske komisije 2018. godine (Younes i sar., 2018). U izveštaju je navedeno da

MCC, metil celuloza, etil celuloza, hidroksipropil celuloza, hidroksipropil metil celuloza, etil metil celuloza i CMC pokazuju nisku aktivnu toksičnost bez ispoljavanja genotoksičnosti. Od navedenih formi celuloze, MCC može da fermentiše mikrobiota kolona ljudi, dok ostale forme ne podležu fermentaciji i intaktne se izlučuju putem fecesa. Mikro forme celuloze i njeni derivati su bezbedni i odobreni za korišćenje u hrani kao stabilizatori i zgušnjivači. Takođe, prihvaćeni su i kao materijali generalno prepoznati kao bezbedni (*“Generally Recognized as Safe”* - GRAS), izuzev nanoceluloze koja nije priznata kao bezbedna u oblasti hrane. Nanoceluloza je jedino u SAD-u od strane Agencije za hranu i lekove (*Food and Drug Administration* - FDA) dozvoljena da se koristi kao materijal za pakovanje hrane (Mu i sar., 2019).

ZAKLJUČAK I DALJA PERSPEKTIVA

Pored brojnih strategija i istraživanja poslednjih godina posvećenih razvoju oleogelova i različitim načinima reformulisanja, postoji niz prepreka, najčešće sa tehnološkog i senzorskog gledišta, koje i dalje onemogućavaju laku zamenu čvrstog masnog tkiva i dobijanje zdravijih, funkcionalnih proizvoda od mesa. Kada se govori o primeni MC u ove svrhe, dodatno je potrebno da se pronađu načini da se prevaziđu problemi promene ukusa niskomasnih proizvoda sa dodatkom MC i razumevanje interakcije različitih formi MC, jestivih ulja i proteina mesa kako bi se definisali mehanizmi koji utiču i menjaju kvalitet reformulisanih proizvoda od mesa. Pored efekta dodavanja MC u reformulisanim proizvodima od mesa na fizičko-hemijske, senzorske, teksturalne i tehnološke karakteristike, nedovoljno je saznanja o konkretnom efektu takvih proizvoda nakon ingestije na zdravlje ljudi. Neophodna su i dodatna saznanja prilikom proizvodnje celuloznih oleogelova vezana za mogućnosti sprečavanja migracije uljanih faza, kontrolisano otpuštanje funkcionalnih sastojaka, kao i pronalaženje prirodnih i efikasnih sastojaka kojima bi se povećala vrednost i kvalitet proizvoda na bazi modifikovane celuloze. Dalja istraživanja bi trebalo da budu usmerena i ka pronalaženju mogućnosti dobijanja i primene modifikovanih formi celuloze iz novih, nedovoljno iskorišćenih izvora, kao što su žetveni ostaci, primenom novih, ekološki prihvatljivih postupaka.

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Fonda za nauku Republike Srbije, broj 7752847, “Value-Added Products from Maize, Wheat and Sunflower Waste as Raw Materials for Pharmaceutical and Food Industry – PhAgroWaste” i sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj: 451-03-68/2022-14/200143).

LITERATURA

Kompletan spisak referenci (38) se može dobiti na zahtev od autora za korespondenciju.

PRIHVATLJIVOST OD STRANE POTROŠAČA MESA RIBA GAJENIH U OTPADNOJ VODI IZ KLANICE

**Miloš Pelić¹, Nikolina Novakov², Dušan Lazić¹, Nenad Popov¹,
Milica Živkov Baloš¹, Jelena Vranešević¹, Dragana Ljubojević Pelić¹**

Kratak sadržaj

Upotreba prečišćenih otpadnih voda u akvakulturi se primenjuje širom sveta, a uslov je da se proces prečišćavanja odvija uz sve mere predostrožnosti i da je efikasan i strogo kontrolisan. Gajenje ribe na ovaj način nosi i određene rizike koji se uglavnom odnose na bezbednost mesa ribe. Da bi se riba, proizvedena na ovaj način, plasirala na tržište, neophodno je izvršiti istraživanja vezana za stavove potrošača prema ovakvom tipu proizvoda. Najčešći razlozi zbog kojih će se potrošači opredeliti za ribu gajenu u ribnjacima u koje se ispušta prečišćena otpadna voda su na prvom mestu bezbednost mesa ribe, svežina, ukus i način pakovanja. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, faktori koji značajno utiču na potrošače da se odluče za kupovinu ribe iz ovakvog sistema gajenja su „udaljenost“ ribnjaka od sistema za prečišćavanje otpadnih voda, cena ribe, navike potrošača, religija i kulturološke navike. Razlozi koji mogu dodatno uticati na potrošače su velika potražnja za ribom u određenom periodu godine i njihova svest o proizvodu ili mišljenje o toj vrsti hrane. Socioekonomski faktori kao što su prihodi članova domaćinstva, nivo obrazovanja i veličina porodice značajno određuju kupovnu moć potrošača, a takođe i prihvatljivost određene hrane. Rezultati dosadašnjih istraživanja su potvrdili da ispitani potrošači uglavnom prihvataju ribu uzgajanu u prečišćanoj otpadnoj vodi, ako se ponudi niža cena.

Kako bi se uticalo na povećanje prihvatljivosti potrošača prema mesu ribe, gajene u prečišćenoj otpadnoj vodi, potrebno je da se oni edukuju o samom procesu prečišćavanja otpadnih voda i postupcima koji se primenjuju kako bi se povećao kvalitet i bezbednost mesa ribe. Ovo bi se moglo postići izdavanjem različitih edukativnih materijala sa akcentom na bezbednost mesa ribe. Ono što je obavezno i što bi u najvećoj meri uticalo na prihvatljivost od strane potrošača, je adekvatno i efikasno prečišćavanje otpadnih voda, koje je potrebno obezbediti pre ispuštanja vode u ribnjak. U ovom radu su sumi-

¹Dr sci. med. vet. Miloš Pelić, naučni saradnik; dr vet. Dušan Lazić, istraživač pripravnik; dr Nenad Popov, istraživač saradnik; dr sci. med. vet. Milica Živkov Baloš, naučni savetnik; dr sci. med. vet. Jelena Vranešević, naučni saradnik; dr sci. med. vet. Dragana Ljubojević Pelić, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, R. Srbija

²Dr sci. med. vet. Nikolina Novakov, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: milosp@niv.ns.ac.rs

rani rezultati dosadašnjih istraživanja vezanih za bezbednost mesa ribe proizvedene u prečišćenoj otpadnoj vodi, kao i rezultati istraživanja stavova potrošača širom sveta vezanih za ribu proizvedenu u ovakvom sistemu gajenja.

Ključne reči: *Cyprinus carpio*, gajenje šarana, otpadna voda, prečišćavanje vode, šaranski ribnjaci

UVOD

Činjenica je da se u klaničnoj proizvodnji koriste velike količine vode i da se posledično stvaraju velike količine otpadne vode koja značajno utiču na zagađenje životne sredine. Veliki problem, kako za životnu sredinu, a posledično i za zdravlje ljudi predstavlja ispuštanje takve otpadne vode u prirodne vodotokove a da se pri tome ne izvrši njeno adekvatno prečišćavanje. Jedno od rešenja za iskoristićavanje otpadne vode iz klanice može biti njena upotreba u akvakulturi zbog činjenice da ona predstavlja, ne samo izvor vode, nego i izvor hranjivih materija za ribu (Ljubojević Pelić i sar., 2019). Ovakav način proizvodnje doprinosi, kako održivosti klanične industrije, tako i razvoju akvakulture i zaštiti životne sredine. Upotreba otpadne vode, koja je prečišćena za gajenje ribe je značajna i sa ekološkog i sa ekonomskog aspekta i ovakav integrisani sistem predstavlja ekološko rešenje odlaganja organski opterećene vode iz klanične industrije (Pelić i sar., 2021a). Svakako se ne sme zanemariti činjenica da ovakav integrisani sistem nosi i određene rizike vezane za bezbednost mesa ribe proizvedene u njemu (Brooks i Conkle, 2019).

Kada se razmatra mogućnost plasmana ovako proizvedene ribe na tržište, neophodno je utvrditi stav potrošača prema ovakvoj vrsti proizvodnje, odnosno prema ribi koja se na ovakav način proizvodi. Do sada je u Republici Srbiji, kao i u zemljama iz okruženja, sprovedeno nekoliko istraživanja vezanih za stavove o potrošnji mesa ribe (Tomić i sar., 2015; Đorđević i sar., 2016; Ostojić i sar., 2017), ali prema našim saznanjima nije sprovedeno nijedno istraživanje o percepciji potrošača prema ribi proizvedenoj u prečišćenoj otpadnoj vodi iz klanice. Imajući u vidu sve navedeno, smatramo da je potrebno ispitati percepciju potrošača, odnosno utvrditi njihove stavove i mišljenje u odnosu na potencijalnu kupovinu i potrošnju ribe koja je proizvedena u ribnjaku koji se puni prečišćenom otpadnom vodom iz klanice. Nakon popunjavanja upitnika i analize odgovora potrošača, potrebno je sagledati sve faktore koji imaju značajan uticaj da se oni opredele da kupe i konzumiraju ovako proizvedenu ribu. Prikupljeni podaci bi omogućili da se dobiju bitne informacije pomoću kojih će se sagledati faktori koji doprinose da se potrošači opredele za ovako proizvedenu ribu što će omogućiti da se donese odgovarajuća strategija za marketing ribe koja se proizvodi u prečišćenoj vodi iz klanice, a to bi doprinelo njenom plasmanu na tržište. Neophodno je definisati najbitnije karakteristike koje doprinose da se potrošači opredele za ovako proizvedenu ribu. Takvo istraživanje bi bilo veoma značajno zbog toga što bi se promovisala proizvodnja ribe u prečišćenoj otpadnoj vodi iz klanice, a to doprinosi zaštiti životne sredine i održivosti klanične industrije kroz uspostavljanje

integrisanog sistema klanice i ribnjaka. Rezultati koji bi se dobili nakon analize anketa bili bi korišćeni za pravljenje marketing strategije za ribu proizvedenu u prečišćenoj otpadnoj vodi iz klanice.

Rezultati dosadašnjih istraživanja o bezbednosti mesa ribe proizvedene u prečišćenoj otpadnoj vodi

Dosadašnja istraživanja su dokazala da korišćenje prečišćenih otpadnih voda iz klanice nije imalo negativnih efekata na zdravlje ribe, kao i da kvalitet mesa ribe proizvedene u ovakvom sistemu proizvodnje nije odstupao od kvaliteta ribe proizvedene u konvencionalnom načinu proizvodnje (Pelić i sar., 2021b). Pored toga, riba koja je proizvedena u ribnjaku, koji se snabdevalo prečišćenom otpadnom vodom, nije predstavljala rizik za zdravlje potrošača u pogledu sadržaja teških metala i mikrobiološke kontaminacije (Mark i sar., 2019), kao ni u pogledu sadržaja pesticida (Pelić i sar., 2019, 2020). Phan i sar. (2010) su ustanovili da je rizik od parazita koji se prenose konzumiranjem mesa ribe iz ribnjaka sa otpadnom vodom veoma nizak i da je čak ustanovljena prevalenca bila niža u odnosu na istraživanja koja su sprovedena u istom području, a vezana su za ribu koja nije bila gajena u ribnjaku sa otpadnom vodom.

Rezultati dosadašnjih istraživanja vezanih za prihvatljivost potrošača ribe proizvedene u tretiranoj otpadnoj vodi

Riba predstavlja namirnicu koja je visoko pozicionirana na lestvici zdrave ishrane. Ona je veoma važan izvor proteina, esencijalnih aminokiselina, masti, esencijalnih masnih kiselina, vitamina i minerala (Khalili i Sampels, 2018). Preporuke su da se riba konzumira dva do tri puta nedeljno, ali treba uzeti u obzir činjenicu da je konzumacija ribe u Srbiji ispod preporučenih količina (Đorđević i sar., 2016). Svakako ne treba zanemariti činjenicu da su potrošači sve više zainteresovani za zdravu ishranu, ali i da raste njihova zabrinutost vezana za bezbednost hrane u smislu prisustva različitih kontaminanta, kao i mikroorganizama i parazita. Ovakva zabrinutost se povećava ukoliko se riba gaji u ribnjacima koji se pune tretiranom otpadnom vodom. Netretirana otpadna voda predstavlja rizik po zdravlje jer sadrži štetne materije koji imaju negativan efekat na zdravlje ljudi, kao što su patogeni mikroorganizmi, paraziti, teški metali, pesticidi, antibiotici, hormoni i drugi kontaminanti (Khalid i sar., 2018). Sa druge strane, upotreba tretirane otpadne vode u ribarskoj proizvodnji ima veliki ekonomski i ekološki značaj i na ovaj način se vrši njeno adekvatno iskorišćavanje. Prihvatljivost mesa ribe, gajene u prečišćenoj otpadnoj vodi, je neophodno istražiti kako bi se omogućio plasman ovakve ribe na tržište. Generalno, riba koja se uzgaja u dobro kontrolisanoj i prečišćenoj otpadnoj vodi je bezbedna, ali postoji zabrinutost u pogledu bezbednosti takvih proizvoda za ishranu ljudi. U nekim zajednicama, postoji generalno mišljenje potrošača, da ribu dobijenu u takvim sistemima ne treba konzumirati. Kao glavni razlozi za odbijanje konzumiranja ribe iz prečišćene

otpadne vode navode se zabrinutost za bezbednost ovako proizvedene ribe, ali i navike potrošača i kulturološki obrasci. Prema rezultatima istraživanjima koja su sprovedena u Egiptu (Mancy i sar., 2000) potrošači nisu prihvatili ribu koja je proizvedena u ribnjaku koji je punjen tretiranom vodom iz kanalizacije bez obzira na činjenicu da je ona bila bezbedna za konzumiranje. Istraživanje koje je sprovedeno u Gani (Suzette i sar., 2021) je ukazalo da su faktori koji su uticali na stavove potrošača prema ribi uopšte, obuhvatali bezbednost (63%), svežinu ribe (51%), ukus (44%), pakovanje (41%), cenu, veličinu i vrstu ribe. Pored toga, navedeno je da su faktori koji su uticali na percepciju potrošača vezanu za ribu koja je proizvedna u prečišćenju otpadnoj vodi bili blizina potrošača postrojenju za prečišćavanje otpadnih voda, cena, religija, starost potrošača i da li oni inače konzumiraju određenu vrstu ribe. Prema rezultatima istraživanja Gebrezgabher-a i saradnika (2015) potrošači su prihvatili ribu gajenu u tretiranoj otpadnoj vodi ukoliko je ona prodavana po nižoj ceni u odnosu na ribu iz konvencionalne proizvodnje. U Vijetnamu su potrošači želeli da znaju da li je otpadna voda korišćena u proizvodnji ribe i da li je takva riba bila sertifikovana od strane državnih organa (Danso i sar., 2017). U navedenom istraživanju je naglašena potreba da državni organi obezbede adekvatnu kontrolu bezbednosti i kvaliteta ovako proizvedene ribe. Napomenuto je da na našem području nije vršeno istraživanje vezano za percepciju potrošača o ribi koja je proizvedena u ovakvom načinu gajenja, ali je interesantno pomenuti da je, prema rezultatima ankete 100 ispitanika vezanih za konzumiranje ribe u Banja Luci (Ostojić i sar., 2017), svežina ribe bila primarni faktor. Poreklo ribe, cena i vrsta ribe su takođe bili značajni sa aspekta potrošača da bi se opredelili za kupovinu ribe. U pomenutom istraživanju, 41% ispitanika je odgovorilo da nije dovoljno informisano o ribi kao hrani što uz navedenu nisku konzumaciju ribe na našem području, nedvosmisleno ukazuje na značaj promocije ribe u ishrani ljudi na ovom podneblju.

Potrebno je prepoznati motive koji bi bili važni za potrošače da se odluče da kupuju i konzumiraju ribu proizvedenu u integrisanim sistemima proizvodnje, kako bi se uticalo na njih i što bi doprinelo razvoju tržišta za ovakav tip proizvoda. Ono što bi se moglo izdvojiti kao najvažniji faktor je uticaj mesa ribe na zdravlje potrošača. Pored toga, bitno je da oni imaju poverenja u verodostojnost informacija o bezbednosti ovako proizvedene ribe. Važno je da imaju informaciju da je voda koja se koristi prethodno podvrgnuta procesima prečišćavanja i da u ovako proizvedenoj ribi nisu detektovani iznad dozvoljenih granica pesticidi, teški metali, antibiotici, radionuklidi, niti mikroorganizami koji bi mogli uticati na njihovo zdravlje (Pelić, 2020). Pored toga, potrebno im je približiti senzorne karakteristike ovako proizvedene ribe i prikazati eventualna odstupanja u odnosu na ribu koja se proizvodi u konvencionalnoj akvakulturi.

Ovaj način proizvodnje je prilično nepoznat za većinu potrošača iako se integrisani sistemi proizvodnje u akvakulturi koriste dugi niz godina. Kako bi se razvilo tržište ribe proizvedene u prečišćenju otpadnoj vodi iz klanične industrije, potrebno je da potrošači dobiju osnovne informacije o ovakvom načinu proizvodnje kako bi se povećao stepen prihvatljivosti ovako proizvedene ribe od

strane potrošača. Za ostvarivanje uspeha na tržištu je neophodno da potrošači steknu sliku o bezbednosti i kvalitetu tih proizvoda. Veoma je važno raditi na promeni svesti potrošača i njihovog načina ishrane. Potrebno je da potrošači jasno razumeju da je ovako proizvedena riba pre svega bezbedna za konzumiranje. Ovo bi se moglo realizovati kroz dobro osmišljene zdravstvene poruke vezane za konzumiranje ribe poroizvedene u prečišćenoj vodi iz klanične industrije koje bi bile jasne, razumljive, ali u isto vreme i naučno utemeljene. Bez adekvatnih istraživanja stavova potrošača, teško je doneti dobru marketinšku strategiju. Rezultati stavova potrošača su važni, kako za proizvođače, naučnu i stručnu javnost, tako i za stručnjake za marketing kako bi se omogućio razvoj prodaje i tržišta za proizvode ribarstva iz prečišćene vode. Prihvatanje proizvoda od strane potrošača je ključni faktor da se proizvod plasira i pozicionira na tržištu.

Anketni upitnik

Da bi se izvršilo istraživanje stavova potrošača i njihova percepcija i da bi se definisao profil potrošača ribe proizvedene u ribnjaku koji se puni prečišćenom vodom iz klanice neophodno je osmisliti anketni upitnik. Ovakav anketni upitnik treba da pruži što više informacija o stavovima potrošača, učestalosti kupovine, njihovog poverenja u bezbednost ovako proizvedene ribe iz kojih bi se izvukli adekvatni zaključci.

ZAKLJUČAK

Upotreba prečišćene otpadne vode u proizvodnji riba predstavlja inovativni pristup sa ciljem održivosti klanične industrije i očuvanja životne sredine. *Primena ovakve tehnologije je veoma značajna sa aspekta očuvanja životne sredine i doprinosi smanjivanju zagađenja.* Odgovarajući tretman otpadne vode je neophodan preduslov kako za proizvodnju ribe tako i za ispitivanje prihvatljivosti potrošača ribe gajene u prečišćenoj otpadnoj vodi. Analizom dobijenih podataka, nakon popunjavanja ankete, utvrdiće se smernice za *markentinšku strategiju za plasman ovako proizvedene ribe na tržištu.* Veoma je važno istražiti i razumeti stavove potrošača prema ribi proizvedenoj u *prečišćenoj otpadnoj vodi* iz klanice kako bi se omogućilo plasiranje ovako proizvedene ribe na tržište i njen nesmetan promet. Neophodna je edukacija potrošača o ovakvom načinu proizvodnje i o njenom značaju za održivost kako klanične industrije tako i za očuvanje životne sredine. Takođe je neophodno izvršiti edukaciju potrošača u pogledu bezbednosti ovako proizvedene ribe na njihovo zdravlje i uticati na eventualne promene u njihovim prehrambenim navikama.

Zahvalnica:

Ovaj rad je rezultat istraživanja po Ugovoru sa Ministarstvom prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada NIV-NS u 2022. godini, broj 451-03-68/2022-14/200031.

LITERATURA

1. Brooks B.W., Conkle J.L. 2019. Commentary: Perspectives on aquaculture, urbanization and water quality. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 217:1-4. doi: 10.1016/j.cbpc.2018.11.014.
2. Danso G.K., Otoo M., Linh N.D., Madurangí G. 2017. Households' willingness-to-pay for fish product attributes and implications for market feasibility of wastewater-based aquaculture businesses in Hanoi, Vietnam. *Resources*, 6(3):30. <https://doi.org/10.3390/resources6030030>.
3. Đorđević V., Petronijević R., Šarčević D., Janković V., Lakićević B., Velebit B. et al. 2016. The attitudes and habits of serbian preschool children in consumption of meat and fish. *Scientific journal. Meat Technology*, 57(1).
4. Gebrezgabher S.A., Amewu S., Amoah P. 2015. Consumer preference and willingness to pay for fish farmed in treated wastewater in Ghana. In the Selected Paper Prepared for Presentation at the 2015 AAAEA& WAEA Joint Annual Meeting, San Francisco California, 26-28 July 2015.
5. Khalid S., Shahid M., Bibi I., Sarwar T., Shah A.H., Niazi N.K. 2018. A review of environmental contamination and health risk assessment of wastewater use for crop irrigation with a focus on low and high-income countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5):895. doi: 10.3390/ijerph15050895.
6. Khalili Tilami S., Sampels S. 2018. Nutritional value of fish: lipids, proteins, vitamins, and minerals. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(2):243-253. <https://doi.org/10.1080/23308249.2017.1399104>.
7. Ljubojević Pelić D., Pelić M., Djordjevic V., Ćirkovic M. 2019. Food safety aspects of common carp produced in wastewatered fish ponds. In the 60th International Meat Industry Conference (MeatCon2021). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 333:012027. doi:10.1088/1755-1315/333/1/012027.
8. Mancy K.H., Fattal B., Kelada S. 2000. Cultural implications of wastewater reuse in fish farming in the Middle East. *Water science and technology*, 42(1-2):235-239. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0319>.
9. Mark Y.A., Philip A., Nelson A.W., Muspratt A., Aikins S. 2019. Safety assessment on microbial and heavy metal concentration in *Clarias gariepinus* (African catfish) cultured in treated wastewater pond in Kumasi, Ghana. *Environmental Technology*, 40(3):302-311. doi: 10.1080/09593330.2017.1388851.
10. Ostojić A., Savić N., Vaško Ž. 2017. Consumer attitudes on buying fish in Banja Luka. *Ekonomika Poljoprivrede*, 64(1):129-140.
11. Pelić M.M. 2020. Ispitivanje uticaja korišćenja otpadnih voda iz klanice na zdravlje i proizvodnju mesa šarana (*Cyprinus carpio*) bezbednog za ishranu ljudi. Doctoral dissertation. Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine.
12. Pelić M.M., Živkov Baloš M., Popov N., Knežević S.V., Novakov N. et al. 2021a. Quality of carp meat (*Cyprinus carpio*) produced in a pond with the addition of purified wastewater originating from the slaughterhouse. *Archives of Veterinary Medicine*, 14(1):25-36. <https://doi.org/10.46784/eavm.v14i1.260>.
13. Pelić M., Kartalović B., Đorđević V., Puvača N., Teodorović V., Ćirković M. et al. 2019. Occurrence and dietary exposure of organochlorine pesticides in common carp obtained from integrated production systems. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 12(4):303-309. doi: 10.1080/19393210.2019.1663372.
14. Pelić M., Kartalović B., Živkov-Baloš M., Mirilović M., Đorđević M., Teodorović V. et al. 2020. Health Risks associated with residual pesticide levels in fish reared in purified wastewater from slaughterhouse. *Journal of The Hellenic Veterinary Medical Society*, 71(1):1991-1996. <https://doi.org/10.12681/jhvms.22941>.
15. Pelić M., Novakov N., Đorđević V., Ljubojević Pelić D. 2021b. Health status and microbial quality of common carp reared in a pond fed with treated wastewater from a slaughterhouse. In the 61st International Meat Industry Conference (MeatCon2021), IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 854:012070. doi:10.1088/1755-1315/854/1/012070.
16. Phan V.T., Ersbøll A.K., Bui

T.Q., Nguyen H.T., Murrell D., Dalsgaard A. 2010. Fish-borne zoonotic trematodes in cultured and wild-caught freshwater fish from the Red River Delta, Vietnam. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(9):861-866. doi: 10.1089/vbz.2009.0134. **17.** Suzette S.E., Nelson A.W., Regina E., Philip A., Mark Y.A., Raphael N.G., Shabana A. 2021. Consumer preference, growth and profitability of African catfish (*Clarias gariepinus*) grown in treated and aerated wastewater fed ponds in Kumasi, Ghana. *Heliyon*, 7(3):e06424. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06424>. **18.** Tomić M., Matulić D., Jelić M. 2015. What determines fresh fish consumption in Croatia, *Appetite*: 1-10; doi:10.1016/j.appet.2015.12.019.

KONTROLA KVALITETA PREGLEDA NA PRISUSTVO LARVI *TRICHINELLA*

**Saša Vasilev, Ljiljana Sabljic, Ivana Mitić, Nataša Ilić,
Marija Gnjatović, Ljiljana Sofronić Milosavljević**

Kratak sadržaj

U zemljama članicama Evropske unije (EU), Nacionalne referentne laboratorije za trihinelu vrše proveru kvaliteta pregleda uzoraka mesa na prisustvo larvi Trichinella. Obavezne su da učestvuju sve laboratorije koje vrše ovaj pregled. U zemljama EU nije dozvoljena upotreba metoda kompresije, za razliku od naših propisa koji ovu metodu i dalje dozvoljavaju. Evropska referentna laboratorija za parazite u Rimu, Italija, organizuje jednom godišnje kontrolu kvaliteta rada nacionalnih referentnih laboratorija za trihinelu zemalja EU, ali i zemalja kandidata za članstvo u EU. Nacionalna referentna laboratorija za trihinelozu Srbije, INEP, Beograd uspešno učestvuje u ovim PT (engl. proficiency tests – PT). Akreditaciono telo Srbije zahteva samo od akreditovanih laboratorija potvrdu o učešću u eksternim kontrolama kvaliteta rada na ovom polju. Prvu ovakvu proveru za Veterinarske specijalističke institute organizovao je INEP 2017. godine, a rezultati su objavljeni u Veterinarskom glasniku. Sledeća je bila 2021. godine, a rezultati objavljeni u časopisu Meat Technology, dok je prva ovakva provera izvoznih klanica urađena 2022. godine. Iskustvo dokazuje da učešće u eksternim kontrolama kvaliteta dovodi do postizanja boljih rezultata kroz vreme i time do bolje zaštite potrošača. Poželjno je i potrebno da sve laboratorije koje rade na otkrivanju larvi Trichinella u mesu učestvuju u ovakvim proverama najmanje jednom godišnje, a ta- kodje, i vanredno kad god dobiju novog člana tima.

Ključne reči: *Srbija, PT, Trichinella*

Zahvalnica:

MPNTR broj ugovora 451-03-68/2022-14/200019

¹Dr sci. vet. med. Saša Vasilev, naučni saradnik; dr vet. med. Ljiljana Sabljic, istraživač saradnik; dr Ivana Mitić, naučni saradnik; dr Nataša Ilić, viši naučni saradnik; dr Marija Gnjatović naučni saradnik; dr Ljiljana Sofronić Milosavljević, naučni savetnik, Institut za primenu nuklearne energije – INEP, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: svasilev@inep.co.rs

NATIONAL QUALITY CONTROLS OF EXAMINATIONS FOR THE TRICHINELLA

**Saša Vasilev, Ljiljana Sabljić, Ivana Mitić, Nataša Ilić,
Marija Gnjatović, Ljiljana Sofronić Milosavljević**

Summary

National Reference Laboratories for Trichinella (NRLT) in all member states of the European Union organize Trichinella proficiency tests (PTs). All laboratories are required to participate. The use of compression methods is not allowed in EU countries, unlike our regulations, which still allow this method. European Reference Laboratory for Parasites (EURLP), Rome, Italy, organize once a year Trichinella PTs for all NRLTs. The Serbian Reference Laboratory for Trichinellosis, INEP, Belgrade, successfully participate in these PTs. The Accreditation Body of Serbia requires only from accredited laboratories a certificate of participation in Trichinella PTs. The first external quality control for Trichinella testing in Serbia was organized by INEP in 2017. The results were published in the Veterinarski Glasnik. Next EQA was in 2021, and results were published in the Meat Technology. The first external quality control for Trichinella testing for Serbian export slaughterhouses was organized by INEP in 2022. European and our own results shows that participation in PTs leads to better laboratory results over time and better consumer protection. It is desirable and necessary that all Serbian laboratories working on the detection of Trichinella larvae in meat participate in PT at least once a year, and also whenever they have a new team member.

Keywords: Serbia, PT, Trichinella

PROCENA HIGIJENSKIH USLOVA MUŽE MAGARICA

*Jasna Đorđević, Tijana Ledina, Marija Kovandžić, Lazar Marković,
Milica Kovačević Filipović, Snežana Bulajić*

Kratka sadržaj

U poslednje vreme postoji povećano interesovanje za mleko magarica, pre svega kao alternativom za majčino mleko kod dojenčadi sa alergijom na proteine kravljeg mleka, ali i s obzirom da postoji grupa potrošača koja ga konzumira zbog proklamovanih pozitivnih efekata po zdravlje. Takođe, interesovanje naučne zajednice je usmereno i na očuvanje autohtonih rasa kopitara u cilju zaštite biodiverziteta i genetičkih resursa. Higijena muže može da ima važan uticaj na kvalitet i bezbednost mleka magarice, a naročito zbog toga što se mleko magarica konzumira sirovo i da ne postoji smanjenje ili eliminacija kontaminacije primenom termičkih tretmana. U cilju procene higijenskih uslova muže magarica, u okviru ovog istraživanja su praćena tri parametra: ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija, broj Enterobacteriaceae (pri 37 °C i 44 °C) i broj koagulaza pozitivnih stafilokoka. Ispitivanja su izvršena primenom standardnih ISO metoda koje se koriste u mikrobiologiji hrane. Materijal su predstavljala 33 uzorka mleka magarica, prikupljena sa 6 farmi muznih magarica u Srbiji. Sve farme sa kojih su uzorci prikupljeni, su porodična gazdinstva na kojima se životinje gaje u ekstenzivnim uslovima ili poluintenzivnim uslovima. Na svim farmama se primenjuje ručna muža i prilikom pripreme životinja za mužu, vime se ne dezinfikuje, već samo pere mlakom vodom i zatim osuši papirnim ubrusom. Nakon muže, mleko se procedi kroz gazu i prelije u plastičnu ambalažu, a zatim čuva pri temperaturama hladnog lanca ili se zamrzava do prodaje i kao sirovo se konzumira. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju na nizak nivo kontaminacije mleka magarica. Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (pri 30 °C) kretao se od 0,54 do 4,77 log CFU/ml mleka. Enterobacteriaceae nisu utvrđene u 29 uzoraka pri temperaturi od 37°C, dok je u četiri uzorka bilo utvrđeno od 1,06 do 2,25 log CFU/ml mleka. Pri temperaturi od 44 °C, prisustvo Enterobacteriaceae je utvrđeno u dva uzorka u broju 1,68 i 1,15 log CFU/ml. Koagulaza pozitivne stafilokoke su bile utvrđene u dva uzorka mleka magarica i to u broju od 0,70 i 1,79 log CFU/ml mleka. Prema podacima brojnih istraživanja, anatomski položaj i fiziološke karakteristike vimena magarice odgovorne su za niske vrednosti mikrobioloških parametara higijene muže. Takođe, u mleku magarice lizozim predstavlja jednu od glavnih frakcija proteina mlečnog seruma. Lizozim, u sinergističkom dejstvu sa ostalim komponentama

¹Dr sci. vet. med. Jasna Đorđević, asistent; dr sci. vet. med. Tijana Ledina, docent; dr vet. Marija Kovandžić, istraživač-pripravnik; dr vet. Lazar Marković, asistent; dr sci. vet. med. Milica Kovačević Filipović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Snežana Bulajić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

*e-mail autora za korespondenciju: jasna.djordjevic@vet.bg.ac.rs

mleka magarice, kao što su: laktoferin, laktoperoksidaza, N-acetil-β-d-glukoaminidaza, imunoglobulini i nekih niže masne kiseline, ispoljava snažno antibakterijko dejstvo u mleku magarica. S obzirom da na farmama obuhvaćenim ovim istraživanjem ne postoje posebne higijenske mere prilikom muže magarica, rezultati ovog istraživanja govore u korist navedenih činjenica. Epidemiološka istraživanja koja bi obuhvatila i patogene mikroorganizme, dala bi celovitu sliku mikrobiološkog profila mleka magarica. S obzirom da sirovo mleko može da predstavlja rizik po zdravlje potrošača, bez obzira na nisku primarnu kontaminaciju, neophodno je standardizovati termičke tretmane koji bi bili adekvatni za obradu mleka magarica ili razviti druge tehnološke postupke kojima bi se osigurala bezbednost mleka magarice.

Ključne reči: *Enterobacteriaceae, mleko magarica, ukupan broj aerobnih mezo-filnih bakterija*

Zahvalnica:

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

UTICAJ VITAMINA C I RANOG TERMALNOG KONDICIONIRANJA NA KVALITET MESA BROJLERA TOKOM TOPLNOTNOG STRESA

Zoran Ružić¹, Zdenko Kanački¹, Zorana Kovačević¹, Dragoljub Marić¹, Srđan Todorović¹, Slobodan Knežević², Dušan Lazić²

Kratak sadržaj

Toplotni stres (TS) predstavlja jedan od najvećih problema u savremenom tovu pilića i sa sobom nosi značajne ekonomske gubitke u vidu smanjenog prirasta, slabije iskoristivosti hrane, oslabljenog imunskog odgovora, promena u crevnoj mikroflori, povećanog mortaliteta kao i narušavanja kvaliteta mesa. Vitamin C (Vit. C) je jedan od najznačajnijih antioksidanasa, koji se normalno sintetise u organizmu ptica, predominantno u bubrezima. Uključen je u nastanak leukocita, a time poboljšava imunski odgovor ptica. Njegova sinteza tokom TS je nedovoljna, a osim toga, stresni uslovi ometaju resorpciju Vit. C u digestivnom traktu. Zbog toga su povećane potrebe za ovim vitaminom u stresnim uslovima držanja. Izlaganje visokoj temperaturi u trajanju od 24h sa 5. dana starosti u literaturi je opisano kao rano termalno kondicioniranje (RTK) i predloženo je kao tehnika potenciranja termotolerancije kod pilića u završnim fazama tova koji su izloženi TS. Mehanizam ovog dejstva se ogleda u tome da ovaj vid temperaturne manipulacije kasnije smanjuje telesnu temperaturu posredstvom hormona štitaste žlezde u krvi i smanjenjem nivoa kortikosterona. U našim ranijim studijama, zapaženo je blagotvorno dejstvo suplementacije Vit. C i primene modifikacije temperature u ranom periodu života na potenciranje termotolerancije. Cilj ovog rada je bio da se ispita uticaj RTK, suplementacije Vit.C, kao i njihova zajednička primena, na pojedine parametre kvaliteta mesa tovnih pilića koji su uzgajani u uslovima hroničnog TS. U ogledu je korišćeno 400 jednodnevnih tovnih pilića (Cobb 500), oba pola, koji su bili podeljeni u 4 eksperimentalne grupe. Grupa C je od 22. dana do kraja tova dobijala kroz vodu Vit. C (2g/l). Grupa T je petog dana tova podvrgnuta RTK u trajanju od 24h na temperaturi od 38±1°C i RH 40-60 %. Grupa TC je bila kombinacija grupa T i C, dok je grupa K je bila kontrolna. Sve četiri grupe su bile izložene hroničnom TS u dve poslednje nedelje uzgoja, koji je bio posledica prirodnih ambijentalnih uslova. Tokom celog perioda tova, pilići su dobijali komercijalnu hranu za brojlere i vodu ad libitum. Sa 42 dana uzgoja

¹Dr sci. vet. med. Zoran Ružić, docent; dr sci. vet. med Zdenko Kanački, redovni profesor; dr sci. vet. med Zorana Kovačević, vanredni profesor; dr vet. Dragoljub Marić; dr vet. Srđan Todorović, student doktorskih studija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

²Dr vet. Slobodan Knežević, istraživač saradnik; dr vet. Dušan Lazić, stručni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: ruzicvet@gmail.com

pilići su upućeni na liniju klanja i uzeto je po 24 jedinice iz svake grupe, metodom slučajnog uzorka, pazeći pri tome da bude jednak broj muških i ženskih. Pilići su mereni živi, neposredno pre klanja kao i nakon iskrvarenja. Nakon čerupanja i evisceracije, merena je masa „grill“ pileta, a zatim se pristupilo rasecanju na anatomske delove kako bi se utvrdio prinos i kvalitet trupa. Od svake jedinice je uzet uzorak belog mesa, kako bi se odredila boja mesa i pH vrednost. Boja mišića i određivanje vrednosti pH grudne muskulature je izmerena 24h post mortem (približno vreme za koje se sveža piletina nađe u prodaji nakon klanja). Instrumentalni parametri boje belog mesa određivani su upotrebom kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400 (Osaka, Japan) u d-65 osvetljenju, sa standardnim uglom zaklona od 2° i sa otvorom od 8 mm na mernoj glavi. Određivanje pH vrednosti je vršeno prema referentnoj metodi SRPS ISO 2917 prenosnim pH-metrom Testo 205 (AG, USA). Kada se posmatraju rezultati pojedinih klaničnih osobina prikazanih u procentualnim vrednostima u odnosu na ukupnu telesnu masu živih pilića, može se zapaziti da ispitivani tretmani deluju tako da povećavaju udeo ($p < 0,05$) pojedinih anatomskih delova (trup pileta, batak sa karabatkom i leđa) i to predominantno u grupi TC. Sa aspekta kvaliteta mesa određivanog preko kriterijuma za pH vrednost, najbolje rezultate je takođe ostvarila grupa TC (5,69), a zatim grupe T i C, dok je K grupa (5,61) ostvarila najlošije rezultate sa prisutnom statističkom značajnošću. Razmatranjem pokazatelja boje (CIEL*a*b*) na preseku mm. pectorales pilića uočava se da su najsvetliji mišići grudi grupe K sa svetloćom (L^*) od 58,71, dok su prosečno najtamniji mišići grupe TC sa svetloćom (L^*) od 57,08 sa statistički značajnom razlikom u poređenju sa kontrolom. Može se zaključiti da Vit. C i RTK deluju tako da povećavaju udeo pojedinih anatomskih delova (trup pileta, batak sa karabatkomi leđa) u odnosu na ukupnu telesnu masu, kao i da poboljšavaju kvalitet mesa u pogledu pH vrednosti i boje grudne muskulature. Ovakvi rezultati, opravdavaju upotrebu Vit. C i RTK u letnjim uslovima, kada se može očekivati TS, ali se najbolji rezultati mogu ostvariti kombinovanjem ove dve metode usled postizanja sinergističkog efekta.

Ključne reči: belo meso, kvalitet mesa, pilići, termalno kondicioniranje, toplotni stres, vitamin C

ŽIVA U RIBI I RIBLJIM PROIZVODIMA KAO POTENCIJALNA OPASNOST PO ZDRAVLJE LJUDI

Biljana Pećanac, Radovan Jeftenić, Dragana Rujević

Kratak sadržaj

Upotreba toksičnih metala u savremenoj industrijskoj proizvodnji dovodi do zagađivanja čovjekove okoline i danas je nemoguće izbjeći izloženost ovim supstancama. Jedan od tih metala je i živa (Hg) koja se u vodenim ekosistemima pretežno u formi metilžive nakuplja u aktivnim organizmima. S obzirom da su u današnje vrijeme, riba i riblji proizvodi sve više zastupljeni u ljudskoj ishrani, zbog dokazanih neželjenih efekata postoji potencijalna opasnost po zdravlje ljudi.

Cilj istraživanja je bio utvrđivanje količine žive u 230 uzoraka ribe i ribljih proizvoda sa tržišta Republike Srpske i BiH u periodu od marta 2016. do marta 2022. godine i usaglašenost sa maksimalno dozvoljenim količinama prema važećem Pravilniku o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani. Količina žive je određivana metodom direktnog spaljivanja na analizatoru žive AMA-254.

Utvrđene količine žive su bile ispod maksimalno dozvoljene. Najveće prosječne vrijednosti žive utvrđene su u tuni ($0,306 \pm 0,1635$ mg/kg) i šarpini ($0,227 \pm 0,122$ mg/kg), a najveća količina u proizvodu od tune od $0,618$ mg/kg, tuni $0,521$ mg/kg i pangasijusu $0,427$ mg/kg. Najniže prosječne vrijednosti su zabilježene u ribi Alaška kolja ($0,007 \pm 0,0014$ mg/kg) i dagnjama ($0,008 \pm 0,0064$ mg/kg), a najniže količine u pangasijusu i šaranu (<LOQ).

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem sadržaja žive u ribi i proizvodima od ribe, utvrđena je usklađenost sa zahtjevima propisa. Najveće količine su utvrđene u tunama, organizmima više vrste u prehrambenom lancu morskog sistema. S obzirom da je metilživa od strane IARC klasifikovana u grupu 2B kao mogući kancerogen za ljude, neophodno je stalno praćenje koncentracije žive i utvrđivanje stepena kontaminacije ribe zbog potencijalne opasnosti po zdravlje ljudi.

Ključne reči: opasnost po zdravlje, riba, živa

¹Dr Biljana Pećanac, rukovodilac Laboratorije za hemijska ispitivanja i rezidue; Radovan Jeftenić, stručni saradnik, mag. Dragana Rujević, viši stručni saradnik, JU Veterinarski institut Republike Srpske "Dr Vaso Butozan" Banja Luka, Republika Srpska, BiH
e-mail autora za korespondenciju: biljana.pecanac@virs-vb.com

TEMATSKO ZASEDANJE IX
PLENARY SESSION IX

SLOBODNE TEME
FREE TOPICS

ZNAČAJ MAGISTRALNE IZRADE LEKOVA U VETERINARSKOJ PRAKSI

Zorana Kovačević^{1*}, Sara Mučibabić², Zoran Ružić¹,
Nadežda Tešin¹, Ivan Stančić¹

Kratak sadržaj

Magistralna izrada lekova se najčešće definiše kao manipulisanje odobrenom farmaceutskom formulacijom leka za upotrebu na način koji nije opisan na uputstvu leka s obzirom da je poznato da se ovoj vrsti izrade veterinarskog leka najčešće pristupa u slučajevima kada primenom lekova koji su registrovani za primenu kod određene životinjske vrste nije moguće obezbediti adekvatnu terapiju. Danas su, zbog sve veće zainteresovanosti vlasnika životinja, na tržištu veterinarskih lekova sve zastupljeniji lekoviti preparati koje je moguće izraditi neposredno pre primene, odnosno *ex tempore*, kako zbog mogućnosti individualizacije doze za pojedinačnog pacijenta, usled odabira farmaceutskog oblika pogodnog za datu životinjsku vrstu, ali i zbog mogućnosti uticaja na povećanje njegove palatabilnosti kod ciljne vrste. Zakonom o lekovima i medicinskim sredstvima Srbije, je definisano da je *magistralni lek* (engl. *compounded drug*) lek izrađen u apoteci po receptu (formuli) za određenog pacijenta, odnosno korisnika, te da se izrada ovih lekova ne smatra proizvodnjom. Pored toga, ovaj zakon definiše da se aktivne supstance za koje postoji karenca ne mogu koristiti za izradu galenskih i magistralnih lekova za upotrebu u veterinarskoj medicini za tretiranje životinja namenjenih ishrani ljudi ili proizvodnji hrane za ishranu ljudi. Predmet istraživanja u okviru ovog rada predstavlja značaj primene magistralnih lekova u savremenoj veterinarskoj farmakoterapiji, odnosno svi propisi koji regulišu ovu oblast. Iz tog razloga je neophodno izdvojiti prednosti primene magistralnih lekova, kao i moguće rizike prilikom njihove primene. Bezbedni i efikasni magistralni veterinarski lekovi mogu biti od suštinskog značaja za održavanje zdravlja i produktivnosti životinja, posebno za lečenje niza bolesti gde za primenu kod određenih životinjskih vrsta nisu odobreni i registrovani neophodni lekovi.

Ključne reči: magistralni lek, terapija, veterinarska medicina

¹Dr sci. vet. med. Zorana Kovačević, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Zoran Ružić, docent; dr vet. med. Nadežda Tešin, doktorand; dr sci. vet. med. Ivan Stančić, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

²Dr vet. Sara Mučibabić, Mim-coop d.o.o., Banja Luka, Republika Srpska

*e-mail adresa autora za korespondenciju: zorana.kovacevic@polj.edu.rs

UVOD

Magistralna izrada lekova je iz više razloga već duži niz godina prisutna u veterinarskoj medicini. Pored uticaja na mogućnost primene ove vrste lekova na najpogodniji način za datu životinjsku vrstu, potrebno je istaći i značaj upotrebe magistralnih lekova u savremenoj veterinarskoj praksi radi individualizacije terapijskog pristupa određenoj životinjskoj vrsti, a sa ciljem postizanja željenog terapijskog efekta leka. Iz tog razloga je neophodno izdvojiti prednosti, kao i moguće rizike prilikom njihove primene u savremenoj veterinarskoj farmakoterapiji. Terminologija koja opisuje magistralnu izradu lekova varira širom sveta, te se ova praksa u zavisnosti od nacionalnih direktiva u pojedinim zemljama naziva „trenutnom proizvodnjom“, „vanrednom pripremom“, „povremenom magistralnom izradom“ ili jednostavno „magistralnom izradom“ (Davison, 2017). Definicije magistralne izrade lekova, date u zakonskim propisima širom sveta, su često nespecifične. Magistralna izrada lekova se najčešće definiše kao manipulisanje odobrenom farmaceutskom formulacijom leka za upotrebu na način koji nije opisan na uputstvu za upotrebu leka (Allen, 2003). Poznato je da se magistralnoj izradi veterinarskog leka najčešće pristupa u slučajevima kada primenom lekova koji su registrovani za primenu kod određene životinjske vrste nije moguće obezbediti adekvatnu terapiju za ciljnu životinjsku vrstu. Ovaj način izrade lekova može uključivati aktivnosti poput mešanja dva ili više lekova odobrenih i registrovanih za primenu kod životinja u jedan doziran oblik (npr. mešanje dva anestetika u istoj brizgalici), potom menjanje vrste doziranog farmaceutskog oblika (npr. drobljenje tableta za oralnu upotrebu u cilju dobijanja tečne suspenzije) ili dodavanje određenog korigensa ukusa, u zavisnosti od ciljne životinjske vrste za koju se lek izrađuje. U slučajevima kada na tržištu jedne zemlje ne postoji odgovarajući registrovani lek za postizanje željene terapije, izrada magistralnog leka može da uključuje aktivne hemijske supstance, pomoćne supstance, sredstva za suspendovanje i arome potrebne za izradu datog leka (Davidson, 2017). Izrada veterinarskih magistralnih lekova predstavlja granu farmacije koja se prilično brzo razvija. Ona iziskuje određeno vreme, znanje i iskustvo, kako bi kao krajnji rezultat nastali lekovi koji su izrađeni za individualnu terapiju jedinki određene životinjske vrste. Do nedavno, veterinari su sami izrađivali i izdavali lekove pripremljene na ovaj način, međutim, danas pored veterinara i farmaceuti učestvuju u izradi veterinarskih magistralnih lekova (Allen, 2003). Izrada i primena magistralnih lekova su sve popularnije kako kod veterinara, tako i kod vlasnika i odgajivača životinja. Naime, u istraživanju, koje su sprovedli Bennett i saradnici (2018), je utvrđeno da i vlasnici kućnih ljubimaca i sami veterinari vide veliku prednost u izradi i primeni magistralnih lekova u veterinarskoj praksi.

PROPISI KOJI REGULIŠU OBLAST IZRADA MAGISTRALNIH VETERINARSKIH LEKOVA

U našoj zemlji je Zakonom o lekovima i medicinskim sredstvima Srbije (Sl. Glasnik RS, 30/2010 i 107/2012) regulisano da za lečenje odgovarajuće životinj-

ske vrste može da se upotrebi samo veterinarski lek, za koji je izdata dozvola za lek i koji je namenjen lečenju ili sprečavanju bolesti, poboljšanju ili promeni fizioloških funkcija ili postizanju drugih medicinski opravdanih ciljeva kod određene životinjske vrste. Međutim, u slučaju da za lečenje određene životinjske vrste ne postoji odgovarajući veterinarski lek, tada je moguće pristupiti korišćenju principa tzv. kaskadne reakcije. Ovaj princip podrazumeva upotrebu leka sličnih ili istih svojstava koji je namenjen za upotrebu kod drugih životinjskih vrsta, ako je za takav lek izdata dozvola za lek i ako ne postoji kontraindikacija za njegovu primenu (engl. *extra label use*). Pored toga, princip kaskadne reakcije podrazumeva da je u slučaju da za lečenje određene životinjske vrste ne postoji veterinarski lek sa izdatom dozvolom za lek moguće upotrebiti lek namenjen za upotrebu u humanoj medicini, ukoliko je za taj lek izdata dozvola za lek i ako ne postoji kontraindikacija za njegovu primenu. Takođe, ovaj Zakon definiše da je, ukoliko za lečenje određene životinjske vrste ne postoji ni veterinarski ni humani lek sa izdatom dozvolom, moguće upotrebiti odgovarajući galenski ili magistralni lek i to u slučaju da ne postoji kontraindikacija za njihovu primenu. Poznato je da isti lek, primenjen u terapijskoj dozi i u istoj formulaciji, kod različitih životinjskih vrsta može ispoljiti razlike u pogledu farmakokinetičkog profila, nezavisno od načina primene leka, bilo da se primenjuje enteralno ili pareneteralno (Linn, 1995). Razlozi za različit stepen reakcije različitih životinjskih vrsta na isti lek su, pored anatomsko-histoloških razlika i fiziološki i genetski razlozi (odsustvo ili smanjena aktivnost određenih enzima odgovornih za metabolizam lekova, kao i različita osetljivost receptorskih sistema) (Jezdimirović i sar., 2015). Tako i magistralni lekovi nalaze sve značajnije mesto u savremenoj veterinarskoj farmakoterapiji.

Nadzor nad izradom magistralnih lekova u Republici Srbiji, sprovodi Ministarstvo zdravlja (farmaceutski inspektor) u skladu sa Zakonom o zdravstvenoj zaštiti, koje može zabraniti izradu, odnosno izdavanje magistralnih lekova ukoliko se ne izrađuju u skladu sa zakonom, kao i povlačenje iz prometa na malo i uništavanje magistralnog leka u slučajevima predviđenim zakonom (Smernice Dobre proizvođačke prakse, Službeni glasnik RS, br. 86/2010). Obzirom na to, da poslednjih godina postoji trend individualizacije terapije tj. prilagođavanje terapije pojedinačnim potrebama svakog pacijenta ponaosob, u Sjedinjenim Američkim Državama se godišnje izradi 30-40 miliona magistralnih lekova (Allen i sar., 2011). Naime, obim izrade magistralnih lekova beleži značajan rast, obzirom na to da povećanje potreba za magistralnom izradom lekova nastaje iz različitih razloga (Đekić i sar., 2013). Među ovim razlozima se izdvaja potreba za prilagođavanjem terapije/doze individualnim potrebama pacijenta odnosno životinje (inter- i intraspecijske razlike kod životinja), kao i kada životinja zbog neodgovarajućeg ukusa odbija lek, te se tada vrši korekcija ukusa i mirisa.

Zakonom o lekovima i medicinskim sredstvima Srbije (Sl. Glasnik RS, 30/2010 i 107/2012) je definisano da je magistralni lek (engl. *compounded drug*) lek izrađen u apoteci po receptu (formuli) za određenog pacijenta, odnosno korisnika, te da se izrada magistralnih lekova ne smatra proizvodnjom. Pored toga, ovaj zakon definiše da se aktivne supstance za koje postoji karenca ne mogu

koristiti za izradu galenskih i magistralnih lekova za upotrebu u veterinarskoj medicini za tretiranje životinja namenjenih ishrani ljudi ili proizvodnji hrane za ishranu ljudi. Pored toga, na osnovu člana 51. stav 3. ovog Zakona, u našoj zemlji je usvojen Pravilnik o obrascu i sadržini veterinarskog recepta (Sl. glasnik RS, 48/17), kao i načina propisivanja i izdavanja veterinarskih lekova. Ovim Pravilnikom je regulisano propisivanje na recept lekova namenjenih za primenu u veterinarskoj praksi, odnosno definisano je da se veterinarskim receptom propisuju svi gotovi veterinarski lekovi na kojima piše „izdaje se na recept“, kao i većina lekova koji se izrađuju u apotekama i galenskim laboratorijama (magistralni i galenski lekovi). Naime, pored načina propisivanja magistralnih lekova, ovim Pravilnikom je definisan i izgled pakovanja za magistralne, odnosno galenske lekove namenjene za primenu u veterinarskoj praksi.

Obzirom da veterinarska apoteka može da obavlja poslove iz oblasti veterinarske delatnosti ukoliko ispunjava uslove koji su u skladu sa Pravilnikom o uslovima u pogledu objekata, opreme, sredstava za rad, kao i u pogledu stručnog kadra koje mora da ispunjava veterinarska apoteka (Sl. glasnik RS, 91/2009), definisano je da ukoliko se u veterinarskoj apoteci izrađuju galenski i magistralni lekovi, ona mora da ima i sledeće prostorije: 1. za prijem i skladištenje ambalaže i lekovitih supstanci i sirovina koje se koriste za izradu magistralnih i galenskih lekova; 2. za pranje laboratorijske opreme, laboratorijskog posuđa i ambalaže; 3. za izradu i pakovanje galenskih i magistralnih lekova; 4. za kontrolu kvaliteta galenskih i magistralnih lekova i 5. za smeštaj i čuvanje gotovih galenskih i magistralnih lekova.

Za razliku od fabričkih lekova, koji se proizvode u skladu sa standardima Dobre proizvođačke prakse (DPP ili engl. *Good Manufacturing Practices*, GMP) (Sl. glasnik RS, 28/2008) i stoga moraju da zadovolje stroge standarde da bi dobili dozvolu za stavljanje u promet, za magistralne lekove se ne primenjuje GMP, te su za njih manje razvijeni standardi za obezbeđenje kvaliteta, što bi kao posledicu moglo imati ugrožavanje zdravlja životinje. Međutim, izrada i izdavanje magistralnih preparata u apoteci se vrši u skladu sa standardima Dobre apotekarske prakse (DAP) (Sl. glasnik RS, 86/2010) koja takođe obezbeđuje izradu kvalitetnog i bezbednog magistralnog leka u apoteci, s obzirom na to da se moraju obezbediti određeni uslovi.

PREDNOSTI PRIMENE MAGISTRALNIH LEKOVA U VETERINARSKOJ PRAKSI

Razlozi za sve veću proizvodnju i upotrebu magistralnih lekova su mnogobrojni, a neki od njih su: ograničeni oblici doziranja, ograničena farmakološka aktivnost lekova, nedostupni lekovi (usled povlačenja sa tržišta i usled nestašice na tržištu), lekovi za lečenje retkih bolesti i izrada magistralnih lekova u veterinarskoj praksi (Lloyd i Allen, 2015). Obim izrade magistralnih lekova beleži značajan rast, s obzirom na to da potreba izrade magistralnih lekova nastaje iz različitih potreba: 1. za prilagođavanjem terapije/doze individualnim potrebama pacijen-

ta odnosno životinja (inter i intraspecijske razlike kod životinja); 2. za prevazilaženjem alergijskih i toksičnih reakcija na neke pomoćne supstance, koje su u sastavu gotovih registrovanih lekova (npr. konzervansi, zaslađivači, emulgatori, boje) obzirom da je poznato da za određenu vrstu životinja određeni korigens ukusa ili emulgator može biti toksičan, dok kod druge vrste ne izaziva toksične reakcije; 3. kada životinja zbog neodgovarajućeg ukusa odbija lek, te se tada vrši korekcija ukusa, mirisa i dr.; 4. ukoliko na tržištu nije dostupan registrovan lek u odgovarajućem obliku i/ili jačini; 5. kada postoji potreba za izradom lekova sa kombinacijom dve ili više lekovitih supstanci u pogodnom farmaceutskom obliku; 6. kada ne postoji farmaceutski ekvivalentan fabrički proizveden lek (Đekić i sar., 2013); 7. za lečenje retkih bolesti, s obzirom na to da industrijska proizvodnja lekova za lečenje retkih bolesti nije isplativa zbog malog broja obolelih, kao i kada treba izraditi lekove za koje postoje pouzdani dokazi da su efikasni u terapiji određene retke bolesti, iako ona nije obuhvaćena indikacijama za koje su oni registrovani (eng. *Off-label use*) (Dooms i sar., 2013); 8. za izradom leka koji je nestabilan i nije pogodan za industrijsku proizvodnju (lekovi kratkog roka upotrebe); 9. za prevazilaženjem problema vezanog za nestašicu registrovanih lekova, kao privremeno rešenje do ponovnog uspostavljanja proizvodnje i normalizacije snabdevanja tržišta i 10. kada je trajno obustavljena proizvodnja registrovanog leka.

Lekovi odobreni za upotrebu kod određenih životinjskih vrsta se mogu naći u prodaji u farmaceutskim oblicima koji nisu pogodni za upotrebu kod drugih životinjskih vrsta (npr. velike tablete za žvakanje kod mačaka ili egzotičnih životinja). Takođe, lekovi odobreni za upotrebu u veterinarskoj medicini, mogu da budu dostupni u ukusima koje određene životinjske vrste ne mogu da podnesu. U takvim slučajevima, pristupa se magistralnoj izradi leka, da bi se doza ili ukus prilagodili određenoj životinjskoj vrsti (Davidson, 2017). Pored toga što omogućavaju terapijski pristup koji odgovara potrebama pojedinačnog pacijenta, magistralni lekovi se koriste kada na tržištu lekova jedne zemlje ne postoji registrovan, odnosno lek odobren za primenu (ni kod ljudi, ni kod životinja), a koji sadrži željene aktivne sastojke. Veterinari takođe često navode ekonomske prednosti izrade magistralnih lekova. Regulatorna tela i profesionalne veterinarske organizacije navode da upotreba magistralnih lekova isključivo zbog ekonomske isplativosti nije primerena. Međutim, poznato je da veliki procenat vlasnika životinja nema mogućnost ili ne želi da plaća preporučenu skupu terapiju za svoje ljubimce. Naime, veterinari uglavnom imaju dva izbora: propisivanje skupih, registrovanih proizvoda ili propisivanje magistralnih oblika odgovarajućeg leka (Davidson, 2017).

RIZICI VEZANI ZA PRIMENU I IZRADU MAGISTRALNIH VETERINARSKIH LEKOVA

Bez obzira na sve prednosti izrade magistralnih lekova, neophodno je prilikom same izrade, a i kasnije tokom primene ovih lekova obratiti pažnju na opa-

snosti i rizike izrade datih lekova, kako za potrebe lečenja ljudi, tako i životinja. Ukoliko uzmemo u obzir da velike farmaceutske kompanije potroše milione dolara da bi ispitale i napravile idealan lek u smislu stabilnosti, palatabilnosti i rastvorljivosti, nemoguće je očekivati da će lekovi napravljeni u apoteci imati jednako dobar kvalitet (Papich, 2005). Pored toga, neki od slučajeva primene magistralnih lekova doveli su do neželjenih efekata, pa čak i fatalnog ishoda prilikom primene kod različitih životinjskih vrsta. Uginuća i oboljenja životinja izazvana korišćenjem magistralnih lekova u terapiji, mogu biti izazvana različitim faktorima, kao što su: greške u izradi magistralnog leka, kontaminacija, fizička i hemijska nestabilnost i nedostatak ispitivanja bioraspoloživosti datog leka za ciljnog pacijenta (Cook i sar., 2012; Umstead i sar., 2012; Scott-Moncrief i sar., 2012; Stanley i sar., 2003). Trenutno u svetu ne postoji zakon kojim se zahteva provera efikasnosti magistralnih lekova koja je naznačena na signaturi proizvoda. Iako se sprovode opsežna istraživanja radi provere efikasnosti, sigurnosti i bioraspoloživosti za lekove koji su dozvoljeni u veterinarskoj praksi, ne sprovode se slična istraživanja za potvrđivanje datih osobina kod magistralnih lekova. Takođe, postoje dokazi koji govore da mnogi magistralni lekovi nisu bioekvivalentni sa lekovima koji su odobreni za upotrebu u veterinarskoj praksi, čak i ako se aplikuju na isti način. Suočavanje sa rizicima upotrebe magistralnih lekova u terapiji kod životinja je takođe prisutno i kod ljudi. Ovde se prvenstveno misli na rezidue lekova kojima ljudi mogu biti izloženi upotrebom životinjskog mesa u ishrani, kao i upotrebom različitih proizvoda od životinja (npr. mleko, jaja, med) u ishrani (Davidson, 2017). Čak i terapija rastvaranjem lekova u vodi i hrani, gde životinja sama određuje dozu koju uzima, predstavlja veliku odgovornost za veterinare, zato što su oni ti koji pripremaju terapiju.

Koncept farmakoterapije u humanoj medicini se u mnogome razlikuje od koncepta u veterini i farmaceut mora biti svestan anatomskih, metaboličkih, fizioloških, genetskih razlika, ali i navika u ishrani između različitih životinjskih vrsta (Davidson, 2017). Iz tog razloga je saradnja između veterinara i farmaceuta koji u apoteci izrađuju magistralne lekove namenjene za primenu kod životinja veoma važna. Anatomske razlike među životinjskim vrstama su značajan faktor u veterinarskoj farmakoterapiji. Većina životinjskih vrsta ima horizontalnu orijentaciju tela, za razliku od ljudi koji imaju vertikalnu, pa gravitacija nema ulogu u lakšoj pasaži čvrstih oblika lekova u želudac. Na primer, magistralni lekovi u obliku velikih kapsula, pri prolasku kroz jednjak pasa i mačaka, mogu da izazovu erozije sluzokože, na putu do želuca, gde nastupa njihovo rastvaranje. Čvrsti lekovi se daju isključivo sa 5-6 ml tečnosti ili sa manjom količinom hrane, koja je kompatibilna sa datim lekom. Metaboličke razlike među životinjskim vrstama, takođe su značajan faktor pri izradi magistralnih lekova. Postoje značajne razlike u glomerularnoj filtraciji, među enzimima jetre, nosačima proteina i dr. kod različitih životinjskih vrsta (Baggot, 2001). Poznato je da mačke imaju ograničenu sposobnost metabolisanja lekova u procesu konjugacije sa glukuronskom kiselinom. Iz navedenog razloga se paracetamol iz organizma uklanja drugim metaboličkim putevima, što može da rezultira stvaranjem izrazito toksičnih me-

tabolita. Prema tome, bilo koji lek, pomoćno sredstvo, korigens ukusa ili boja ili konzervans, moraju biti pažljivo ispitani pre upotrebe u terapiji kod mačaka (Davidson, 2017). Kod pasa postoji relativni deficit enzima koji vrše acetilaciju lekova, a taj nedostatak treba pažljivo istražiti i proceniti pre izrade magistralnih lekova namenjenih za primenu kod ovih životinja. Iako je veštački zaslađivač ksilitol označen kao siguran za upotrebu kod većine rasa pasa, brzo se resorbuje, prolazi gastrointestinalno-krvnu barijeru i delujući poput glukoze, izaziva oslobađanje insulina i konačno dovodi do hipoglikemije koja može biti fatalna. Hronična upotreba ksilitola kod pasa, može da dovede do ozbiljne nekroze jetre. Mnogi lekovi iz humane palete sadrže ksilitol u neaktivnom obliku, pa se od farmaceuta često zahteva da napravi alternativu komercijalnog leka koja ne sadrži ksilitol (Lorenz i sar., 1977).

Poznato je da rizici mogu da potiču od različitih uzroka, kao što su: neodgovarajuća formulacija leka, mikrobiološka kontaminacija i toksičnost određenih sastojaka lekova za određene životinjske vrste. Kako uzrok nestabilnosti magistralnog leka može biti neodgovarajuća formulacija leka, u idealnom slučaju sve formulacije treba da imaju podatke o stabilnosti (izvori: farmakopeje, publikovani radovi, ekspertski izveštaji iz industrije i dr.). Međutim, evidentan je nedostatak standardizovanih farmaceutskih formulacija, odnosno preskripcija za ove formulacije. U slučajevima kada farmaceutska formulacija nije adekvatno validirana, rezultat može biti subdoziranje ili predoziranje leka, što kao posledicu ima izostanak terapijskog ili pojavu toksičnih efekata (Jackson i Lowey, 2010). Uzroci nastanka neodgovarajuće formulacije mogu biti: fizička inkompatibilnost između sastojaka, lekovita supstanca/ekscipijens, degradacija lekovite supstance i dr. Sastav leka stoga treba da bude što jednostavniji kako bi se rizik od nastanka problema sveo na minimum (Jackson i Lowey, 2010). Lekovi u svom postojećem obliku nisu adekvatni za određenu životinjsku vrstu usled čega, npr. tablete moraju da se dele, kapsule da se preformulišu, rastvori da se preformulišu u cilju dobijanja palatabilnog oralnog farmaceutskog oblika itd. Međutim, kada se zaštitini film tablete ošteti ili kada se vehikulum promeni, stabilnost leka može da bude narušena. U nekim slučajevima dolazi samo do promene pH vrednosti, ali prema američkoj nacionalnoj farmakopeji, neodgovarajući pH sa povećanom temperaturom najčešće dovodi do degradacije i smanjenja sadržaja lekovite supstance. Promena pH vrednosti može biti uzrok brojnih promena kao što su: hidroliza lekovite supstance, epimerizacija (npr. kod tetraciklina), oksidacija i dr. (Papich, 2005). Primena magistralnog leka može biti rizična i zbog mikrobiološke kontaminacije. Izbor konzervansa zavisi od pH vrednosti preparata, fizičke kompatibilnosti sa ostalim sastojcima i ciljne grupe životinje (Papich, 2005). Određeni sastojci mogu biti toksični za određene životinjske vrste. Iz navedenog razloga je neophodno određene korigense ukusa i boje i konzervanse izbegavati kod odgovarajućih životinjskih vrsta (Davidson, 2017).

Način primene magistralnih lekova je isti kao i za sve druge vrste lekova i zavisi od prirode i lokalizacije bolesti, ali od farmaceutskog oblika izrađenog leka. Pored toga, faktori koji odlučuju koji ćemo način aplikacije određenog magistral-

nog leka odabrati, su: Koja koncentracija leka nam je potrebna? Kolika brzina delovanja leka nam je potrebna? Koliko dugo lek treba da deluje? Koliko je skupa terapija? Na koji deo tela lek treba da deluje? Koliko je dati tretman bezbedan? Da li postoje neki problemi primenom leka na ovaj način? (Lloyd i Allen, 2015).

ZAKLJUČAK

Magistralna izrada lekova predstavlja važan deo savremene veterinarske prakse obzirom da farmaceutske formulacije izrađene na ovaj način imaju važnu ulogu u očuvanju i unapređenju zdravlja životinja uz uslov da su izrađene na propisan način. Bezbedni i efikasni magistralni veterinarski lekovi mogu biti od suštinskog značaja za održavanje zdravlja i produktivnosti životinja, a posebno za lečenje niza bolesti gde za upotrebu kod određenih životinjskih vrsta nisu odobreni i registrovani neophodni lekovi. Pored toga, u eri personalizovane medicine i individualizacije terapije, magistralna izrada lekova može da ima značajnu ulogu obzirom na to da može da pruži optimalnu terapiju obolelim životinjama.

LITERATURA

1. Allen L.V., Popovich N.G., Ansel H.C. 2011, *Ansels pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 710. 2. Allen L.V., 2003. A history of pharmaceutical compounding. *Secundum. Artem.* 11,1-5. 3. Baggot J.D., 2001, *The Physiological Basis of Veterinary Clinical Pharmacology*; Blackwell Publishing Inc.: Malden, MA, USA. 4. Bennett S.A., Rusinger J.F., Prohaska E.S., Steete K.M., Melton B.L. 2018, Accessing pet owner and veterinarian perceptions of need for veterinary compounding services and committy pharmacy setting. *Pharmacy practice.* 5. Cook A.K., Nieuwoudt C.D., Longhofer S.L. 2012. Pharmaceutical evaluation of compounded trilostane products. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 4, 228-33. 6. Davidson G., 2017. Veterinary Compounding: Regulation, Challenges, and Resources. 7. Đekić LJ., Čalića B., Vuleta G., 2013. Izrada magistralnih i galenskih lekova-propisi i standardi, *Arh Farm*, 63, 443-69. 8. Dooms M., Pince H., Simoens S., 2013. Do we need authorized ophan drugs when compounded medications are available? *J Clin Pharm Ther*, 38,1, 1-2. 9. European Directive 65/65/CE. Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31965L0065:EN:HTML> (22.07.2022.) 10. Jackson M., Lowey A. (eds.), 2010, *Handbook of extemporaneous preparation*, London: Pharmaceutical Press. 11. Jezdimirović M., Čupić V., Ivanović S., Dimitrijević B., Jezdimirović N., 2015, Faktori koji utiču na terapijsku efikasnost i bezbednost lekova, *Vet. glas.*, 69, 5-6, 401-15. 12. Lin J.H., 1995, Species similarities and differences in pharmacokinetics, *Drug Metab. Dispos.*, 3, 1008-21. 13. Lorenz W., Reimann H.J., Schmal A., Dormann P., Schwarz B., Neugebauer E. et al. 1977, Histamine release in dogs by Cremophor E1 and its derivates: Oxethylated oleic acid is the most effective constituent, *Agents Actions*, 7, 63-7. 14. Lloyd V., Allen J.R., 2015, PhD *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (fifth edition). 15. Papich M.G., 2005, *Drug Compounding for Veterinary Patients*, *AAPS journal*, 7, 2, 29. 16. Pravilnik o obrascu i sadržini veterinarskog recepta, kao i načina propisivanja i izdavanja veterinarskih lekova, Službeni glasnik RS, br. 48/17 od 19. maja 2017. 17. Pravilnik o uslovima u pogledu objekata, opreme, sredstava za rad, kao i u pogledu stručnog kadra koje mora da

ispunjava veterinarska apoteka, Sl. glasnik RS, br. 91/2009. **18.** Scott-Moncrief J.C., Moore G.E., Coe J., Lynn R.C., Gwin W., Petzold R. 2012. Characteristics of commercially manufactured and compounded protamine zinc insulin, J. Am. Vet. Med. Assoc., 240, 600-5. **19.** Smernice Dobre proizvođačke prakse, Službeni glasnik RS, br. 28/2008. **20.** Smernice Dobre proizvođačke prakse, Službeni glasnik RS, br. 86/2010. **21.** Stanley S.D., Thomas S.M., Skinner W. 2003. Comparison for Pharmaceutical Equivalence of FDA-Approved Products and Compounded Preparations of Ketoprofen, Amikacin, and Boldenone, In Proceedings of the 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, New Orleans, LA, USA, 21-5. **22.** The US Food and Drug Administration. What is compounding? Dostupno na: <https://www.fda.gov/drugs/human-drug-compounding/compounding-and-fda-questions-and-answers#what>(22.07.2022.) **23.** Umstead M.E., Boothie D.M., Cruz-Espindola C., Macdonald J.M., Kennis R., Angarano D. 2012. Accuracy and precision of compounded ciclosporin capsules and solution. Vet. Dermatol. 23. **24.** World Health Organization. WHO Expert Committees 18th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines. Extemporaneous Review. Dostupno na: https://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/18/policy/policy5/en/(22.07. 2022.) **25.** Zakon o lekovima i medicinskim sredstvima, Službeni glasnik RS, br. 30/2010 i 107/2012.

THE IMPORTANCE OF DRUG COMPOUNDING IN VETERINARY PRACTICE

Zorana Kovačević, Sara Mučibabić, Zoran Ružić, Nadežda Tešin, Ivan Stančić

Summary

The drug compounding is most often defined as manipulating the approved pharmaceutical formulation of the drug for use in a way that is not described in the instructions for the drug, given that it is known that this type of veterinary drug production is most often approached in cases where the use of drugs that are registered for use in a certain animal species it is not possible to provide adequate therapy. Today, due to the increasing interest of animal owners, medicinal preparations that can be made immediately before application, i.e. ex tempore, are increasingly present on the market of veterinary drugs, both due to the possibility of individualizing the dose for an individual patient, due to the selection of a pharmaceutical form suitable for a given animal species, but and due to the possibility of influencing the increase of its palatability in the target species. The Law on Medicines and Medical Devices of Serbia defines that a compounded drug is a drug made in a pharmacy according to a prescription (formula) for a specific patient or user, and that the production of these drugs is not considered production. In addition, this law defines that active substances for which there is a waiting period cannot be used for the production of galenic and compounded drugs for use in veterinary medicine for the treatment of animals intended for human consumption or the production of food for human consumption. The subject of research within this work is the importance of the application of compounded drugs in modern veterinary pharmacotherapy, that is, all the regulations that regulate this area. For this reason,

it is necessary to separate the advantages of the application of compounded drugs, as well as the possible risks during their application. Safe and effective compounded veterinary drugs can be essential for maintaining the health and productivity of animals, especially for the treatment of a number of diseases where the necessary drugs are not approved and registered for use in certain animal species.

Key words: *compounded drugs, therapy, veterinary medicine*

ISPITIVANJE UTICAJA DELOVANJA RAZLIČITIH KOLIČINA ORGANSKOG SELENA U HRANI NA EKONOMIČNOST PROIZVODNJE PATAKA U TOVU

*Jelena Janjić¹, Amir Zenunović², Drago Nedić¹, Spomenka Đurić¹,
Branislav Vejnović¹, Milorad Mirilović¹, Milan Ž. Baltić¹*

Kratak sadržaj

Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi uticaj različitih količina organskog selena u ishrani pataka na ekonomske parametre tova. Eksperiment je sproveden na ukupno 240 jednodnevnih pačića poreklom iz komercijalne inkubatorske stanice, zasnovan na grupno-kontrolnom sistemu i trajao je 49 dana (kontrolna grupa K – bez dodatka organskog selena, ogledna OI grupa – sa dodatkom 0,20 mg/kg organskog selena, ogledna OII grupa – uz dodatak 0,40 mg/kg organskog selena, i ogledna OIII grupa – uz dodatak 0,60 mg/kg organskog selena). Proizvodni rezultati (telesna masa, prosečni dnevni prirast, konverzija hrane) i parametri ekonomske efikasnosti tova brojlera (EPEF, EBI) su izračunati za dva perioda (od 0. do 14. dana; od 0. do 49. dana). Dodavanje organskog selena u različitim količinama uticalo je na masu, prirast, potrošnju hrane i konverziju kod pataka 14., odnosno 49. dana. Najbolje vrednosti EPEF i EBI zabeležene su u grupama pačića koje su hranjene uz dodatak 0,2 mg/kg, odnosno 0,4 mg/kg organskog selena u odnosu na kontrolnu grupu i grupu koja je u hrani dobijala 0,6 mg/kg organskog selena.

***Ključne reči:** Cherry Valley hibrid, EBI, EPEF, rezultati proizvodnje*

UVOD

Proizvodnja pačjeg mesa u širem smislu, obuhvata proces od tova jednodnevnih pačića do finalnog proizvoda na stolu potrošača. U ovom radu, posebna pažnja je posvećena ekonomičnosti tova pačića u zavisnosti od koncentracije dodatog organskog selena u smešama za njihov tov. Osnovna odlika tova pačića i proizvodnje pačjeg mesa na savremeni način ogleda se u primeni najmodernijih

¹Dr sci. vet. med. Jelena Janjić, viši naučni saradnik; dr sci. vet. med. Drago Nedić, redovni profesor; dr sci. vet. med. Spomenka Đurić, docent; dr sci. vet. med. Branislav Vejnović, docent; dr sci. vet. med. Milorad Mirilović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Milan Ž. Baltić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr Amir Zenunović, docent, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Tuzli, Tuzla, Bosna i Hercegovina

*e-mail adresa autora za korespondenciju: jeckonbg@gmail.com

tehničko-tehnoloških rešenja, inovacija, istraživanja i razvoja i upotrebe marketinških metoda, kako bi se proizvodi što bolje plasirali na tržištu i povećalo tržišno učešće pačjeg mesa. Velika pažnja je posvećena ekonomskom aspektu proizvodnje, odnosno kako uz optimalne troškove osigurati proizvođačima profitabilno poslovanje na duži rok, stabilan rast i razvoj preduzeća (ili individualnog gazdinstva) (Zenunović, 2015).

Patka je jedna od najranije odomaćenih vrsta živine (pre oko 2000 godina) i po proizvodnji jaja i mesa, predstavlja drugu po važnosti vrstu živine, odmah iza gajenja brojlera. Uprkos globalnom prisustvu, ekonomskom značaju i doprinosu za život, patke do sada nisu uspele da privuku veću pažnju istraživača (Jalaludeen i Churchil, 2022). Većina pataka se gaji u Aziji (89,7 procenata), zatim u Evropi (6,5), SAD (2,3), Africi (1,4) i Okeaniji (0,1). Samo Kina je imala populaciju pataka od 712,4 miliona, odnosno skoro dve trećine svetske populacije pataka. Naučna istraživanja o patkama skoncentrisana su na kopno i provincije (Tajvan) Kine, pa se značajni rezultati istraživanja objavljuju na kineskom jeziku. Načini uzgoja i hranljiva vrednost mesa, klasičnih kineskih i tajvanskih rasa pataka nisu mnogo poznati izvan Kine/Tajvana zbog jezičke barijere (Jalaludeen i Churchil, 2022).

Poslednjih godina je sve više pažnje u velikom broju zemalja usmereno na povećanje komercijalne proizvodnje mesa pataka (Rayani sar., 2020). Za 30 godina, vreme potrebno da se proizvede utovljeni hibrid pataka približne telesne mase od 3 kg je skoro prepolovljeno, sa više od 11 nedelja na manje od 7 nedelja. Koriste se napredne metode selekcije, ukrštanja i genetskog inženjeringa, kako bi se dobili visokoproduktivni hibridi tovnih pačića sa većim i boljim proizvodnim mogućnostima (Zenunović, 2015). Hibridi pataka, namenjeni za proizvodnju mesa, brzo rastu zbog genetske selekcije, efikasnih sistema smeštaja i dobro balansirane ishrane (Starčević i sar., 2021). Da bi se postigao adekvatan prirast i dobro zdravlje, patkama je potrebno obezbediti dovoljne količine svih neophodnih hranljivih materija, uključujući i mineral selen (Se) (Marković i sar., 2018). Prema rezultatima Baltića i sar. (2015, 2016), čini se da su potrebe za selenom u ishrani pataka veće u odnosu na druge vrste živine.

Aktuelni zadatak koji se postavlja pred živinarsku proizvodnju je kako i na koji način proizvesti maksimalnu količinu kvalitetnog mesa uz što niže ukupne troškove. Ovu vrstu poljoprivredne proizvodnje karakteriše brz obrt kapitala (za dva meseca u proseku), koji može biti i do šest puta godišnje. Koeficijent obrta ukupne imovine ukazuje koliko se prihoda generiše od prodaje u odnosu na ukupno angažovanu imovinu u posmatranom obračunskom periodu. Što je koeficijent obrta veći, to znači da se ostvari više prihoda od prodaje prema korišćenoj imovini (Janjić i sar., 2022).

Poslednjih godina su za izračunavanje isplativosti tova živine korišćena dva indeksa: evropski faktor efikasnosti proizvodnje (engl. *European Factor of Production Efficiency* – EPEF) i evropski indeks brojlera (engl. *European Broiler Index* – EBI). EPEF se koristi širom sveta kao indikator učinka rasta živine (Janjić i sar., 2022; Rayani i sar., 2020; Susim i sar., 2020; Ao i Kim, 2019). Neki autori, pored

EPEF, koriste i EBI, koji se može izračunati za jata različite starosti, za procenu performansi živine (Marcu i sar., 2013). Prema tome, faktori uključeni u EPEF su povećanje telesne mase (engl. *Body Weight Gain* – BWG), konverzija (engl. *Feed Conversion Ratio* – FCR) i broj preživelih jedinki i smatraju se univerzalnim merilima za procenu performansi (Marcu i sar., 2013).

Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi uticaj delovanja različitih količina organskog selena u hrani na ekonomičnost proizvodnje pataka u tovu.

MATERIJAL I METODE

Istraživanje je sprovedeno na 240 jednodnevnih pačića u objektu na privatnom gazdinstvu u naselju Rainci u Opštini Kalesija (44.4696° N, 18.8147° E). Prilikom merenja, slučajnim izborom formirane su četiri grupe (K, O-I, O-II i O-III) od po 60 pačića i raspoređene u pripremljene i označene boksove. Pačići su tovljeni na podnom sistemu uzgoja u boksovima iste veličine (3 m²), osiguravajući na taj način gustinu naseljenosti od 0,15 m²/pačetu. Kao prostirka je korištena piljevina od suvog bukovog drveta. Ambijentalni uslovi (osvetljenje, temperature i relativna vlažnost vazduha) su bili u skladu sa normama za vrstu i starost pačića. Hrana i voda su bili *ad libitum*. Pačići su hranjeni u dve faze, nutritivno različitim koncentrovanim smešama: starterom (od 1. do 14. dana tova) i finišerom (od 15. do 49. dana tova). Kontrolna grupa pačića (K) je u toku tova dobijala hranu bez dodatog selena. Grupa pačića O-I je u obe faze tova hranjena uz dodatak 0,20 mg/kg, O-II grupa 0,40 mg/kg i O-III grupa uz dodatak 0,60 mg/kg organskog selena (komercijalni preparat, Alkosel R 397, Francuska). Hemijski sastav smeša prikazan je u tabeli 1.

Tabela 1. Hemijski sastav koncentratnih smjesa za ishranu pataka

Parametar	Hemijski sastav ($\bar{X} \pm Sd$) (%)	
	Starter	Finišer
Vlaga	10,68±0,50	10,37±0,07
Proteini	22,68±0,23	17,39±0,20
Mast	5,00±0,08	4,34±0,02
Pepeo	5,31±0,04	4,40±0,02
Celuloza	2,84±0,05	1,97±0,03
BEM	53,49±0,61	61,17±0,17
Kalcijum (Ca)	0,85±0,01	0,77±0,02
Fosfor (P)	0,65±0,01	0,63±0,01

Tokom ovog istraživanja ispitan je hemijski sastav smeša za ishranu pačića (starter, finišer), proizvodni rezultati prosečna završna masa (BWG) na svakom

periodu tova, prosečni dnevni prirast (engl. *Average Daily Gain* – ADG), prosečna konverzija (FCR), preživljavanje (%), a zatim je izračunata ekonomska efikasnost proizvodnje pačića u tovu (Ao i Kim, 2019; Rayan i sar., 2020; Susim i sar., 2020) i EBI (Marcu i sar., 2013). Za izračunavanje ovih pokazatelja korišćene su sledeće formule:

BWG (g) po periodu = BW (g) na kraju perioda – BW (g) prvog dana tova

$$\text{ADG (g/pače/dan)} = \frac{\text{BWG (g)}}{\text{dužina tova}}$$

$$\text{FCR (kg hrane/ kg prirast)} = \frac{\text{Ukupan unos hrane (kg)}}{\text{Ukupna masa pačića (kg)}}$$

Preživljavanje (%) = broj pačića na kraju svakog perioda tova (%)

$$\text{EPEF} = \frac{\text{preživljavanje (\%)} \times \text{BW (kg)}}{\text{starost pačića (dani)} \times \text{FCR (kg hrane/ kg prirast)}} \times 100$$

$$\text{EBI} = \frac{\text{preživljavanje (\%)} \times \text{ADG (g/pače/dan)}}{\text{FCR (kg hrane/ kg prirast)} \times 10}$$

Dobijeni rezultati ispitivanja su upoređeni statističkom analizom koristeći Microsoft Excel 2010 i GraphPad Prism software, verzija 8.00 za Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Za utvrđivanje značajnosti razlika između ispitivanih grupa poređenih parametara korišćena je analiza varijanse (ANOVA), a zatim Tukey test, kao „post hoc“ za poređenje dobijenih rezultata. Razlike su se smatrale značajnim ukoliko je zapažena vrednost $p < 0,05$.

REZULTATI ISPITIVANJA

U tabeli 2. su prikazani proizvodni rezultati pataka u tovu, kao i izračunati parametri ekonomske efikasnosti tova pataka. Prosečna masa pataka na završetku prve faze tova (14. dana) O-I grupe bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) od prosečne mase pataka O-II grupe. Na kraju tova (49. dana) prosečna masa pataka O-II grupe bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) od prosečne mase kontrolne, kao i O-III grupe. U ostalim slučajevima poređenja (14., odnosno 49. dana) nisu utvrđene statistički značajne razlike u prosečnoj masi pataka. Prosečan dnevni prirast pataka izračunat je za dva perioda tova (od 1. do 14. danai od 1. do 49. dana) i bio je od 45,71 g (O-III grupa) do 47,92 g (O-I grupa) od 1. do 14. dana. Za ceo ogled, prosečan dnevni prirast bio je od 73,06 g (O-III grupa) do 77,69 g (O-II grupa). Konverzija hrane prikazana je u pojedinim fazama tova. Do 14. dana

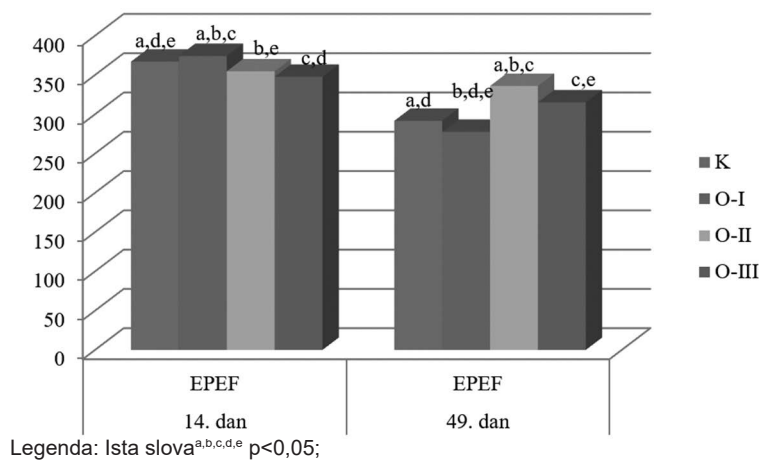
tova, prosečna konverzija K i O-I grupe bila je statistički značajno bolja ($p < 0,05$) od prosečne konverzije pataka O-II i O-III grupe. Nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečne konverzije K i O-I grupe, kao ni između O-II i O-III grupe 14. dana tova. Za razliku od 1. do 14. dana tova, konverzija za ceo period tova bila je statistički značajno bolja ($p < 0,05$) kod O-II i O-III grupe. Nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečnih vrednosti za konverziju K i O-I grupe, odnosno O-II i O-III grupe. U prvoj fazi tova u kontrolnoj (K), O-I i O-III grupi pataka nije bilo uginuća, a u O-II grupi uginulo je jedno pače. Na kraju oglada K i O-II grupe uginula su četiri jединke, a u O-I i O-III grupi je uginulo šest jединki (tabela 2).

Tabela 2. Proizvodni rezultati i parametri ekonomske efikasnosti tova pataka (n=180)

Dani tova	Parametar	K	O-I	O-II	O-III
1. do 14.	BW (kg)	0,72±0,08	0,73±0,09 ^a	0,72±0,11	0,70±0,12 ^a
	ADG (g)	46,95	47,92	47,55	45,71
	FCR (kg hrane/kg prirasta)	1,39±0,02 ^a	1,39±0,03 ^b	1,43±0,04 ^{ab}	1,43±0,04 ^{ab}
	Preživljavanje (%)	100	100	98,33	100
	EPEF	366,91	374,10	354,62	347,65
	EBI	217,36	344,75	326,96	319,65
1. do 49.	BW (kg)	3,61±0,39 ^a	3,69±0,36	3,81±0,39 ^{ab}	3,59±0,38 ^b
	ADG (g)	73,52	74,03	77,69	73,06
	FCR (kg hrane/kg prirasta)	2,36±0,05 ^a	2,49±0,06 ^b	2,16±0,04 ^{ab}	2,13±0,04 ^{ab}
	Preživljavanje (%)	93,33	91,67	93,33	91,67
	EPEF	291,60	277,62	335,97	315,14
	EBI	290,75	272,54	335,68	314,43

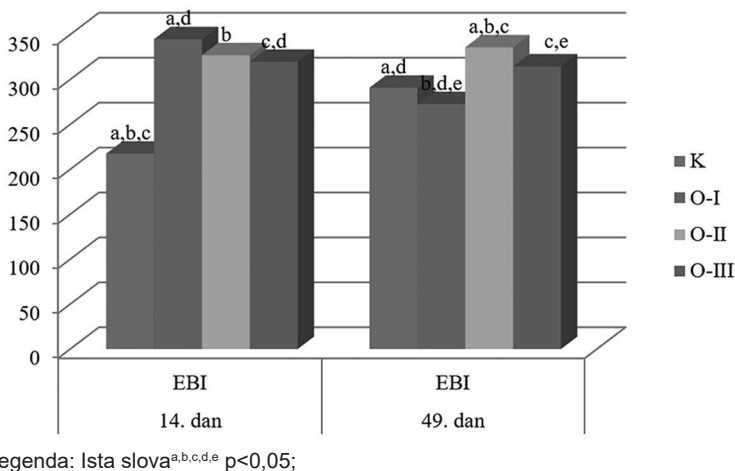
Legenda: Isto slovo ^{a,b} $p < 0,05$;

Efikasnost proizvodnje procenjena je korišćenjem EBI i EPEF (tabela 2). Najbolja EPEF vrednost u ovom istraživanju u periodu od 1. do 14. dana zabeležena je kod O-I grupe, zatim kontrolne grupe, O-II, a najmanja je bila kod O-III grupe. Za ukupan tov pataka, EPEF vrednosti O-II i O-III grupe bile su veće od ovih vrednosti za kontrolnu i O-II grupu. Statistička značajnost razlika između EPEF prikazana je na grafikonu 1.



Grafikon 1. Uporedni prikaz poređenja EPEF vrednosti pačića hranjenih bez i sa dodatim različitim količinama organskog selena

U tabeli 2. su prikazane EBI vrednosti tova pataka za oba perioda istraživanja. Najbolju EBI vrednost od 1. do 14. dana imala je O-I grupa i bila je statistički značajno bolja ($p < 0,05$) od kontrolne i O-III grupe. Statistički značajno najmanju ($p < 0,05$) EBI vrednost imala je kontrolna grupa u odnosu na ogledne grupe. Za ceo period tova najmanja EBI vrednost utvrđena je kod O-I grupe, a najveća kod O-II grupe. EBI vrednosti O-II grupe bile su statistički značajno veće ($p < 0,05$) od kontrolne, O-I i O-III grupe (grafikon 2).



Grafikon 2. Uporedni prikaz poređenja EBI vrednosti pačića hranjenih bez i sa dodatim različitim količinama organskog selena

DISKUSIJA

Na osnovu proizvodnih rezultata (masa pataka na kraju tova, konverzija hrane, prosečni dnevni prirast), teško je govoriti o ekonomskoj isplativosti proizvodnje, već se to može bolje proceniti na osnovu ekonomskih parametara. Proizvodni rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja bili su u skladu sa rezultatima drugih autora (Starčević i sar., 2021; Rayan i sar., 2020; Marković i sar., 2018;). Međutim, analiza podataka o učinku (masa, prosečan dnevni prirast, konverzija i mortalitet) je od suštinskog značaja za izračunavanje ekonomske efikasnosti rasta brojlera.

Mortalitet kod pataka u tovu je u tri četvrtine slučajeva vezan za oboljenja različite, a često i nepoznate etiologije. Najčešće se spominju oboljenja digestivnog i respiratornog trakta. U jednoj trećini slučajeva, uginuću ne predhode bilo kakvi simptomi bolesti. Szilvia i László (2017) u svom radu ističu da je mortalitet kod različitih grupa bio od 1,5 do 6,9 procenata (u proseku 3,4). Autori napominju da je mortalitet bio manji kod mlađih kategorija pataka. Mahmutović (2014) navodi da je mortalitet bio 5 procenata. Znatno veći mortalitet od 18 procenata utvrdili su Balkrishnajha i sar. (2017) (u 11 grupa po 9 jedinki, uginulo je 19). Janječić i sar. (2005) navode da je mortalitet u dve grupe pataka bio različit odnosno 6,40 i 13,75 odsto. Isti autori (Janječić i sar., 2006) su, u drugom ogledu sa tri grupe pataka, utvrdili mortalitet od 3,73, 6,40 i 13,35 procenata.

Različiti autori navode da je prilikom izračunavanja isplativosti i ekonomičnosti neophodno poznavati prodajne cene mesa i troškove poslovanja. Troškovi se dele na fiksne i varijabilne. Varijabilni troškovi variraju u zavisnosti od nivoa ukupne aktivnosti ili obima. Fiksni troškovi se ne menjaju u odnosu na promene obima ili promene nivoa ukupne aktivnosti. Rhodes i sar. (2008) naglašavaju da uzgajivači živine moraju izračunati varijabilne i fiksne troškove prilikom izračunavanja profitabilnosti i ekonomičnosti. Varijabilni troškovi obuhvataju troškove smeša za ishranu pataka, električne energije, čišćenja, tekućeg održavanja objekata i opreme, telefona i alarma. Fiksni troškovi uključuju troškove jednodnevnih pačića, rada, osiguranja, poreza i naknade za korišćenje zemljišta (porez na nepokretnosti). Uz dobru praksu upravljanja, uzgajivač može smanjiti troškove, što je uslov za povećanje profita. Glavna karakteristika novijih strategija smanjenja troškova je definisala manje oslanjanje na statističke izvore smanjenja troškova (kao što su ekonomija obima ili efekti iskustva) i sve veće oslanjanje na kontinuirano poboljšanje, inovacije, restrukturiranje, redizajn poslovnih procesa i rigorozne analize proizvodnih aktivnosti. Ulaganje u poboljšanje dobrobiti pataka (Guidance, 2019) utiče na troškove tova, a izračunavanje troškova dobrobiti životinja je složen zadatak. Neke mere dobrobiti životinja povećavaju troškove proizvodnje, ali se to može nadoknaditi kvalitetnijim proizvodima ili manjim gubicima usled smanjene bolesti ili povreda. Postoje načini za poboljšanje dobrobiti životinja koji ne ugrožavaju produktivnost i nisu nužno skupi. Važno je istražiti ekonomski i društveni uticaj mera, prihvatljivih životinjama, na proizvodnju i proizvodne alternative, kako bi se uskladili dobrobit životinja i ekonomski impe-

rativi. Poboljšanje dobrobiti životinja može dovesti do smanjenja bolesti i smrtnosti, kao i do smanjenja troškova kontrole bolesti i lečenja (Janjić i sar., 2022; Tešić i Nedić, 2015).

Od ukupnih troškova tova živine, troškovi koncentrovanih smeša čine oko 70 odsto. Zbog toga, efikasna upotreba hrane za životinje ima najveći uticaj na upravljanje troškovima proizvodnje. Osnovni parametri koji se koriste za merenje ekonomičnosti i profitabilnosti su rezultati, prihodi i rashodi. Efekti se podjednako smatraju materijalnim proizvodima i uslugama koje proizilaze iz proizvodnog procesa organizacije. Dobit je razlika između vrednosti proizvodnje (ukupnog prihoda) tova i troškova tova, a utvrđuje se na kraju tova. Dobit tovnih pataka, izražena u najjednostavnijem obliku, je vrednost finalnog proizvoda umanjena za ulazne troškove nastale proizvodnjom tog proizvoda (Tešić i Nedić, 2015).

ZAKLJUČAK

Rezultati u ovoj studiji podržavaju primenu većih količina organskog selena u hrani za patke, i to je ekonomski opravdano s obzirom na dobre proizvodne rezultate (masa pataka na kraju tova, konverzija hrane, prosečni dnevni prirast). Stoga je primena organskog selena u hrani za brojlere pozitivno uticala i na povećanje parametara ekonomske isplativosti proizvodnje pataka. Do danas, nema mnogo objavljenih istraživanja koja su pratila uticaj dodatog selena na parametre ekonomske isplativosti (EPEF, EBI), pa ovaj i slični eksperimenti otvaraju brojne mogućnosti za dalja istraživanja.

Zahvalnica:

Ovu studiju je podržalo Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, u skladu sa odredbama Ugovora o finansiranju istraživanja (br. 451-03-68/2022-14/200143).

LITERATURA

1. Ao X., Kim, I. H. 2020. Effects of dietary lipid sources on growth performance and carcass traits in Pekin ducks. *Poultry science*. 99(1): 499-504. 2. Baltić M.Ž., Dokmanović S.M., Bašić M., Zenunović A., Ivanović J., Marković R. et al. 2015. Effects of selenium yeast level in diet on carcass and meat quality, tissue selenium distribution and glutathione peroxidase activity in ducks. *Animal Feed Science and Technology* 210: 225–33. 3. Baltić M.Ž., Dokmanović S.M., Bašić M., Zenunović A., Ivanović J., Marković R. et al. 2016. Effects of dietary selenium-yeast concentrations on growth performance and carcass composition of ducks. *Animal Production Science*. 57(8): 1731-7. 4. Delabougliise A., Nguyen-Van-Yen B., Thanh N.T.L., Xuyen H.T.A., Tuyet P.N., Lam H. M. et al. 2019. Poultry population dynamics and mortality risks in smallholder farms of the Mekong river delta region. *BMC veterinary research*, 15(1): 1-13. 5. Guidance: Ducks (mallard and Pekin): welfare recommendations, 2019. available at: <https://www.gov.uk/government/publications/poultry-on-farm-welfare/ducks-mallard-and-pek-in-welfare-recommendations>. 6. Jalaludeen

A., Churchil R.R. 2022. Duck production: an overview. *Duck Production and Management Strategies*, 1-55. **7.** Janječić Z., Mužić S., Pintar J., Gazić K., Gjurčević Kantura V. 2006. Efficiency of mycosorb and Sel Plex in duck fattening. *Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme*, 48(5): 237-242. **8.** Janječić, Z., Mužić, S., Pintar, J., Gazić, K. 2005. Učinkovitost različitog sustava i oblika krmnih smjesa u tovu pataka. *Krmiva: Časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme*, 47(5): 223-8. **9.** Janjić J., Šević Savić K., Marković R., Šefer D., Nedić D., Đurić S. et al. 2022. Influence of phytobiotics in feed on the cost-effectiveness of broiler production during fattening. *Meat Technology*. 63 (1): 51-58. **10.** Kamboh A.A., Chakrabarti A. 2017. Duck farming: a potential source of livelihood in tribal village. *J. Anim. Health. Prod*, 5(2): 39-43. **11.** Mahmutović H. 2014. Utjecaj genotipa i sustava držanja na kvalitetu pačjeg mesa, Doktorska disertacija, Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet, Tuzla, Bosna i Hercegovina. **12.** Marcu A., Vacaru-Opriș I., Dumitrescu G., Ciochină L. P., Marcu A., Nicula M. et al. 2013. The influence of genetics on economic efficiency of broiler chicken's growth. *Animal Science and Biotechnologies*. 46 (2): 339-46. **13.** Marković R., Ćirić J., Starčević M., Šefer D., Baltić MŽ. 2018. Effects of selenium source and level in diet on glutathione peroxidase activity, tissue selenium distribution, and growth performance in poultry. *Animal health research reviews*. 19(2): 166-76. **14.** Rayan G.N., Ali, A.M., Hassan A.Z. 2020. Growth performance, carcass traits and economic efficiency of pekin ducks as affected by different raising protocols under hot climate. *Fresenius Environ. Bull*, 29: 11737-47. **15.** Rhodes J.L., Timmons J., Nottingham J.R., Musser W. 2008. *Broiler Production Management and Existing Growers*. University of Maryland Cooperation Extension Poultry. **16.** Starčević M., Mahmutović H., Glamočlija N., Bašić M., Andjelković R., Mitrović R. et al. 2021. Growth performance, carcass characteristics, and selected meat quality traits of two strains of Pekin duck reared in intensive vs semi-intensive housing systems. *Animal*, 15(2), 100087. **17.** Susim M.R., Achintya B., Ganesh B. 2020. Effects of Proprietary Hepatoprotective Additives (Cadliv™ liq.) Supplementation on the Growth Performance and Hepatic Histological Architecture of Commercial Broiler Chickens. *International Journal of Poultry Science*. 19: 338-45. **18.** Szilvia M., László S. 2017. Economic issues of duck production: a case study from Hungary. *apstract: Applied Studies in Agribusiness and Commerce*, 11(1033-2018-2953): 61-8. **19.** Tesic M., Nedic D. 2015. *Ekonomika veterinarstva, osnovni udžbenik*. Fakultet veterinarske medicine, Beograd. **20.** Zenunović A., 2015. Uticaj primjene organskog selena u koncentratnim smjesama na proizvodne rezultate i kvalitet mesa pataka, Doktorska disertacija, Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet, Tuzla, Bosna i Hercegovina.

STRATEGIJA KONTROLE *VARROA DESTRUCTOR* U REPUBLICI SRBIJI

**Branislav Vejnović, Jevrosima Stevanović, Uroš Glavinić, Marko Ristanić,
Milorad Mirilović, Spomenka Đurić, Zoran Stanimirović**

Kratak sadržaj

Pčelari imaju na raspolaganju različite metode za suzbijanje pčelinjeg krpelja *Varroa destructor*. Kako bi se utvrdilo koje metode se koriste u pčelinjacima u Republici Srbiji, anketirano je u okviru upitnika COLOSS za 2021. godinu, 112 pčelara koji ukupno imaju 12 912 pčelinjih društava. Od 18 različitih kontrolnih mera protiv *V. destructor* najčešće korišćene metode su bile: primena oksalne kiseline (nakapavanje i sublimacija), primena amitraza (nadimljavanje/aerosol i preko traka), primena kumafosa (preko traka), uklanjanje trutovskog legla i primena mravlje kiseline (kratkoročni i dugoročni tretman). U odnosu na broj košnica, najčešće je korišćen amitraz (nadimljavanje/aerosol i preko traka), oksalna kiselina (nakapavanje i sublimacija), kumafos (preko traka) i mravlja kiselina (kratkoročni i dugoročni tretman), Tau-fluvalinat i uklanjanje trutovskog legla. Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da pčelari u Srbiji protiv *Varroa destructor* najčešće koriste amitraz (nadimljavanjem/aerosol i preko traka).

Ključne reči: Akaricid, *Apis mellifera*, COLOSS anketa, kontrola varroe, pčelarstvo

UVOD

Nakon prelaska sa prvobitnog domaćina, azijske medonosne pčele (*Apis cerana*), na evropsku medonosnu pčelu (*Apis mellifera*) pčelinji krpelj *Varroa destructor* (*V. destructor*) (Anderson i Trueman, 2000) predstavlja veliki problem u pčelarstvu širom sveta (Rosenkranz i sar., 2010; Noel i sar., 2020; Traynor i sar., 2020; Vilarem i sar., 2021; Reams i Rangel, 2022). Pčelinji krpelj, stigao je u Evropu 60-ih i 70-ih godina prošlog veka, a u Severnu Ameriku kasnih 80-ih godina (Rosenkranz i sar., 2010; Traynor i sar., 2020). *V. destructor* se razmnožava samo u zatvorenom pčelinjem leglu (Lin i sar., 2021). Postoji niz istraživanja koja ukazuju na značajnu ulogu *V. destructor* u gubicima pčelinjih društava (Brodtschneider i sar., 2010; Genersch i sar., 2010; Guzman-Novoa i sar., 2010; Beyer i sar., 2018; Morawetz i sar., 2019; Flores i sar., 2021; Kulhanek i sar., 2021; Hernandez

¹Dr sci. vet. med. Branislav Vejnović, docent; dr Jevrosima Stevanović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Uroš Glavinić, docent; dr sci. vet. med. Marko Ristanić, asistent; dr sci. vet. med. Milorad Mirilović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Spomenka Đurić, docent; dr Zoran Stanimirović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: branislav@vet.bg.ac.rs

i sar., 2022). *V. destructor* prvenstveno troši masno tkivo domaćina (Ramsey i sar., 2019), što dovodi do smanjenja težine, nivoa rezervnih proteina i dužine života odraslih infestiranih larvi (De Jong i sar., 1982; Amdam i sar., 2004). Pored navedenog, pčelinji krpelj prenosi i pčelinje viruse (Ball i Allen, 1988; Martin i sar., 2012; Traynor i sar., 2020; Flores i sar., 2021).

Kako bi se ovaj parazit držao pod kontrolom, razvijeno je nekoliko različitih metoda. One se mogu grubo podeliti na nehemijske ili biotehničke metode (uklanjanje trutovskog legla, hipertermiju-tretman legla/pčela visokom temperaturom, potpuno uklanjanje legla i druge metode), "soft" akaricide (akaricidi koji sadrže aktivne sastojke na prirodnoj bazi), kao što su organske kiseline ili eterična ulja i "hard" akaricide koji sadrže sintetičke aktivne sastojke iz grupa organofosfata, piretroida ili formidina (amitraza) (Rosenkranz i sar., 2010; Roth i sar., 2020; Jack i Ellis, 2021). Nažalost, univerzalna metoda kontrole ne postoji, a svaki primenjena metoda ima svoje prednosti i nedostatke. Pre svega, primenjene metode se razlikuju po efikasnosti koja često zavisi od uslova okoline (Underwood i Currie, 2003; Gregorc i sar., 2018; Steube i sar., 2021). Primena hemijskih akaricida može predstavljati dodatni stres i dovesti do subletalnih ili čak smrtonosnih i neželjenih efekata na pčele (Gregorc, 2012; Berry i sar., 2013; Gregorc i sar., 2018; Colin i sar., 2020; Alonso-Prados i sar., 2021; Kast i Kilchenmann, 2022; Ward i sar., 2022). Takođe, postoji i rizik od kontaminacije proizvoda košnice (Wallner, 1999; Mullin i sar., 2010; Kast i sar., 2021). Zbog svega navedenog, traže se novi proizvodi sa visokom efikasnošću varoacida i bez neželjenih efekata na pčele. Jedna od potencijalnih jedinjenja su litijumove soli koje mogu ispuniti ove zahteve (Ziegelmann i sar., 2018). Ostaci litijuma koji dospeju u pčelinje proizvode smatraju se zanemarljivim s obzirom na količinu litijuma koju potrošači unose putem uobičajenih prehrambenih proizvoda (Szkłarska i Rzimski, 2019; Stanimirović i sar., 2021). Osim odobrenih veterinarsko-medicinskih proizvoda, za suzbijanje infestacije *V. destructor* (koje se razlikuju od zemlje do zemlje: Mutinelli, 2016; Jack i Ellis, 2021), koristite se i neregistrovani proizvodi, da ne spominjemo proizvode sopstvene proizvodnje, upotrebu proizvoda "van etikete" i proizvode sa crnog tržišta. Rezultati prikazani u ovom istraživanju odnose se na podatke iz Republike Srbije, a sami podaci su prikupljeni u proleće 2022. godine kao deo mnogo većeg godišnjeg istraživanja koje se sprovodi u 30 zemalja Evrope u sklopu udruženja COLOSS.

Do sada je objavljeno samo nekoliko radova o ovoj temi i to za nekoliko zemalja Evrope (Brodschneider i sar., 2019; Sperandio i sar., 2019; Tomljanović i sar., 2020), i izvršeno je jedno veliko istraživanje koje je obuhvatilo preko 28 000 pčelara u 30 zemalja Evrope (Brodschneider i sar., 2022), kao i istraživanje Mezhher i sar. (2021) koji su anketirali više od 400 pčelara širom sveta.

Ovo istraživanje imalo je za cilj da doprinese boljem razumevanju primenjenih strategija kontrole *V. destructor*, koje pčelari koriste u pčelinjim društvima u Republici Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Anketa

Istraživanje je sprovedeno u proleće 2022. godine. Podaci su prikupljeni anonimno koristeći softver za internet anketiranje (LimeSurvey verzija 3.22.19, LimeSurvey GmbH., Hamburg, Nemačka). Pored metoda za suzbijanje *V. destructor*, u ovom istraživanju su prikupljeni i podaci o broju pčelinjih društava koje su pčelari imali pre zime 2021/2022.

Metode suzbijanja *V. destructor*

Od pčelara je zatraženo da navedu mesec (od aprila 2021. do marta 2022. godine) u kojem su započeli aktivnost u vezi sa suzbijanjem pčelinjeg krpelja *V. destructor*. U ovom istraživanju koristili su ukupno 18 metoda kontrole *V. destructor* (tabela 1).

Tabela 1. Spisak 18 različitih ispitivanih metoda kontrole *V. destructor*

Rb.	Metoda suzbijanja varoe	Kategorija
1.	Uklanjanje trutovskog legla	Biotehnička metoda
2.	Hipertermija (tretman legla/pčela visokom temperaturom)	Biotehnička metoda
3.	Primena drugih biotehničkih metoda – kao što su npr. "ram lovac", kompletno uklanjanje legla, ograničavanje ("hapšenje") matice	Biotehnička metoda
4.	Mravlja kiselina - kratkoročni tretman	Organska kiselina
5.	"Mravlja kiselina - dugoročni tretman (npr. Mite-Away Quick Strips (MAQS))"	Organska kiselina
6.	Mlečna kiselina	Organska kiselina
7.	Oksalna kiselina - nakapavanje	Organska kiselina
8.	Oksalna kiselina - sublimacija (evaporacija, isparavanje)	Organska kiselina
9.	Mešavine sa oksalnom kiselinom Hiveclean/ Bienenwohl/Varromed	Organska kiselina
10.	Timol (npr. Apiguard, ApilifeVar)	Esencijalno ulje
11.	Tau-fluvalinat (npr. Varotom, Apistan)	Piretroid, sintetički akaricid
12.	Flumetrin (npr. Bayvarol, Polyvar)	Piretroid, sintetički akaricid
13.	Amitraz (trake, npr. Apivar, Apitraz, Taktic)	Formamidin, sintetički akaricid
14.	Amitraz (nadimljavanje/aerosol)	Formamidin, sintetički akaricid
15.	Kumafos (nakapavanje, npr. Perizin)	Organofosfat, sintetički akaricid
16.	Kumafos (trake, npr. Checkmite+)	Organofosfat, sintetički akaricid
17.	Neki drugi hemijski proizvod	Nenaveden sintetički akaricid
18.	Neka druga metoda	Neodređeno

U ovom istraživanju, pčelari su naveli u kojim mesecima (od aprila 2021. do marta 2022.) su primenili neku od gore navedenih metoda.

Podaci

U ovom istraživanju su korišćeni samo podaci pčelara koji su imali sve odgovore. Prema neobrađenim podacima ankete, jedan pčelar je imao više košnica pri izimljavanju nego pri zazimljavanju i njegovi podaci su isključeni iz analize. Od ukupno 113 anketiranih pčelara, odgovori jednog pčelara su isključeni, tako da su analizirani odgovori preostalih 112 pčelara.

Analiza podataka

Obrada podataka je izvršena pomoću softvera GraphPad Prism verzija 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA) i Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Za formiranje frekvencija primene određene metode za kontrolu *V. destructor* primenjen je sistem gde je unos '1' označavao da je određena metoda započeta u odgovarajućem mesecu, a nedostatak unosa podataka ukazuje da tretman nije sproveden. Od podataka smo koristili: broj ispitanika u anketi, broj pčelinjih društava pre zazimljavanja 2022. godine, korišćena metoda kontrole pčelinjeg krpelja, kategorizaciju veličine pčelinjaka i učestalost različitih vrsta tretmana.

REZULTATI

U analizi je ukupno učestvovalo 112 pčelara koji su ukupno imali 12 912 pčelinjih društva (tabela 2). U odnosu na broj pčelinjih društava, 49 (43,37 procenat) anketiranih pčelara je imao od 51 do 150 pčelinjih društava, zatim njih 34 (30,36 procenata) je imao preko 150 društava, dok je najmanji broj, njih 29 (25,89 procenata) imao manje od 50 društava (tabela 2).

Tabela 2. Broj ispitanih pčelara i podela u odnosu na broj košnica u periodu od aprila 2021. do marta 2022. godine

Broj ispitanih pčelara	Broj košnica	Pčelari do 50 košnica	Pčelari od 51 do 150 košnica	Pčelari sa preko 150 košnica
N	N	N (%)	N (%)	N (%)
112	12912	29 (25,89)	49 (43,75)	34 (30,36)

Procenti anketiranih pčelara koji primenjuju bilo koji od 18 metoda kontrole *V. destructor* prikazani su u tabeli 3. Najviše je zastupljena metoda primene oksalne kiseline nakapavanjem kod 62 (55,36%) ispitanika, zatim slede: primena amitraza (nadimljavanje/aerosol) kod 52 (46,43%) ispitanika, uklanjanje trutovskog legla kod 27 (24,11%) ispitanika, primena amitraza (trake, npr. Apivar,

Apitraz, Taktic) kod 22 (19,64%) ispitanika, primena kumafosa (trake, npr. Chec-kmite+) kod 22 (19,64%) ispitanika, primena Timola (npr. Apiguard, ApilifeVar) kod 21 (18,75%) ispitanika, primena mravlje kiseline - kratkoročni tretman kod kod 20 (17,86%) ispitanika, primena Tau-fluvalinata (npr. Varotom, Apistan) kod 20 (17,86%) ispitanika i drugi. Niko od ispitanih pčelara za suzbijanje pčelinjeg krpelja nije koristio hipertermiju (tretman legla/pčela visokom temperaturom), kao ni kumafos nakapavanjem (npr. Perizin).

Tabela 3. Broj i procentualna zastupljenost pčelara koji koriste neki od 18 ponuđenih mera kontrole *V. destructor* u periodu od aprila 2021. do marta 2022. godine

Br.	Metoda suzbijanja varoe	Odgovori	Pčelari	Pčelari	Pčelari
		N=112 pčelara	do 50 košnica	od 51 do 150 košnica	preko 150 košnica
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1.	Uklanjanje trutovskog legla	27 (24,11)	9 (33,33)	14 (51,85)	4 (14,81)
2.	Hipertermija (tretman legla/pčela visokom temperaturom)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
3.	Primena drugih biotehničkih metoda - kao što su npr. "ram lovac", kompletno uklanjanje legla, ograničavanje ("hapšenje") matice	15 (13,39)	3 (20,00)	10 (66,67)	2 (13,33)
4.	Mravlja kiselina - kratkoročni tretman	20 (17,86)	4 (20,00)	9 (45,00)	7 (35,00)
5.	"Mravlja kiselina - dugoročni tretman (npr. Mite-Away Quick Strips (MAQS))"	2 (1,79)	0 (0,00)	1 (50,00)	1 (50,00)
6.	Mlečna kiselina	2 (1,79)	0 (0,00)	2 (100,00)	0 (0,00)
7.	Oksalna kiselina - nakapavanje	62 (55,36)	20 (32,26)	29 (46,77)	13 (20,97)
8.	Oksalna kiselina - sublimacija (evaporacija, isparavanje)	16 (14,29)	2 (12,50)	8 (50,00)	6 (37,50)
9.	Mešavine sa oksalnom kiselinom Hivclean/Bienenwohl/Varromed	3 (2,68)	0 (0,00)	2 (66,67)	1 (33,33)
10.	Timol (npr. Apiguard, ApilifeVar)	21 (18,75)	5 (23,81)	11 (52,38)	5 (23,81)
11.	Tau-fluvalinat (npr. Varotom, Apistan)	20 (17,86)	3 (15,00)	8 (40,00)	9 (45,00)
12.	Flumetrin (npr. Bayvarol, Polyvar)	3 (2,68)	1 (33,33)	1 (33,33)	1 (33,33)
13.	Amitraz (trake, npr. Apivar, Apitraz, Taktic)	22 (19,64)	8 (36,36)	6 (27,27)	8 (36,36)

nastavak Tabele 3.

14.	Amitraz (nadimljavanje/aerosol)	52 (46,43)	12 (23,08)	22 (42,31)	18 (34,62)
15.	Kumafos (nakapavanje, npr. Perizin)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
16.	Kumafos (trake, npr. Checkmite+)	22 (19,64)	2 (9,09)	9 (40,91)	11 (50,00)
17.	Neki drugi hemijski proizvod	13 (11,61)	4 (30,77)	7 (53,85)	2 (15,38)
18.	Neka druga metoda	4 (3,57)	2 (50,00)	2 (50,00)	0 (0,00)

Procenti pčelinjih društava u kojima je bio primenjen bilo koji od 18 metoda kontrole *V. destructor* prikazani su u tabeli 4. Od ukupnog broja ispitanih košnica, u najvećem broju je zastupljena metoda primene Amitraza (nadimljavanje/aerosol) kod 6638 (51,41%) društava, zatim slede: primena oksalne kiseline – nakapavanjem kod 5813 (45,02%) društava, primena kumafosa (trake, npr. Checkmite+) kod 3868 (29,96%) društava, primena amitraza (trake, npr. Apivar, Apitraz, Tactic) kod 2884 (22,34%) društva, primena Tau-fluvalinata (npr. Varotom, Apistan) kod 2781 (21,54%) društva, primena mravlje kiseline - kratkoročni tretman kod 2536 (19,64%) društava, uklanjanje trutovskog legal kod 2092 (16,20%) društva, primena Timola (npr. Apiguard, ApilifeVar) kod 2051 (15,88%) društava i druge metode. Ni u jednom pčelinjem drustvu nije korišćena hipertermija (tretman legla/pčela visokom temperaturom), kao ni kumafos nakapavanjem (npr. Perizin) (Tabela 4).

Tabela 4. Broj i procenat pčelinjih društava tretiranih sa 18 različitih metoda za suzbijanje krpelja *V. destructor* u periodu od aprila 2021. do marta 2022. godine

Br.	Metoda suzbijanja varoe	Ukupan broj ispitanih košnica N=12 912
		N (%)
1.	Uklanjanje trutovskog legla	2 092 (16,20)
2.	Hipertermija (tretman legla/pčela visokom temperaturom)	0 (0,00)
3.	Primena drugih biotehničkih metoda – kao što su npr. "ram lovac", kompletno ukljanjanje legla, ograničavanje ("hapšenje") matice	1 260 (9,76)
4.	Mravlja kiselina - kratkoročni tretman	2 536 (19,64)
5.	"Mravlja kiselina - dugoročni tretman (npr. Mite-Away Quick Strips (MAQS))"	284 (2,20)
6.	Mlečna kiselina	162 (1,25)

nastavak Tabele 4.

7.	Oksalna kiselina - nakapavanje	5 813 (45,02)
8.	Oksalna kiselina - sublimacija (evaporacija, isparavanje)	1 953 (15,13)
9.	Mešavine sa oksalnom kiselinom Hiveclean/Bienenwohl/Varromed	319 (2,47)
10.	Timol (npr. Apiguard, ApilifeVar)	2 051 (15,88)
11.	Tau-fluvalinat (npr. Varotom, Apistan)	2 781 (21,54)
12.	Flumetrim (npr. Bayvarol, Polyvar)	358 (2,77)
13.	Amitraz (trake, npr. Apivar, Apitraz, Taktic)	2 884 (22,34)
14.	Amitraz (nadimljavanje/aerosol)	6 638 (51,41)
15.	Kumafos (nakapavanje, npr. Perizin)	0 (0,00)
16.	Kumafos (trake, npr. Checkmite+)	3 868 (29,96)
17.	Neki drugi hemijski proizvod	1 031 (7,98)
18.	Neka druga metoda	240 (1,86)

DISKUSIJA

Kontrola *V. destructor* je ključna za preživljavanje pčelinjih društava (Rosenkranz i sar., 2010; Jacques i sar., 2017; Noel i sar., 2020; Traynor i sar., 2020; Roth i sar., 2020). Izborom adekvatnih metoda, kao i njihovom kombinacijom, postiže se efikasna kontrola pčelinjeg krpelja (Gregorc i Curk, 2000; Jack i Ellis, 2021). U našem istraživanju je od 112 anketiranih pčelara, najčešće korišćena metoda bila primena oksalne kiseline. Od ukupno 112 anketiranih pčelara njih 62 (55,36%) je koristilo oksalnu kiselinu nakapavanjem, 16 (14,29%) je koristilo oksalnu kiselinu u obliku sublimacije (evaporacija, isparavanje). Ovoj grupi je potrebno pridodati i 3 (2,68%) pčelara koji su koristili mešavine sa oksalnom kiselinom (Hiveclean/Bienenwohl/Varromed). Sledeća najčešće korišćena hemijska metoda je primena amitraza, i to amitraza u formi nadimljavanja/aerosola kod 52 (46,43%) pčelara, primena amitraza u obliku traka (Apivar, Apitraz, Taktic) kod 22 (19,64%) pčelara. Zatim sledi primena kumafosa u obliku traka (npr. Checkmite+) kod 22 (19,64%) pčelara kao i primena mravlje kiseline - kratkoročni tretman kod 20 (17,86%) pčelara i mravlje kiseline - dugoročni tretman (npr. Mite-Away Quick Strips (MAQS) kod 2 (1,79%) pčelara. Najčešći nehemijski tretman je bilo uklanjanje trutovskog legla kod 27 (24,11%) pčelara (Tabela 3). Slični rezultati istraživanja su dobijeni i u Luksemburgu, gde su uklanjanje trutovskog legla i upotreba organskih kiselina, kao i eteričnih ulja, najrasprostranjenije metode kontrole (Beyer i sar. 2018). U Sjedinjenim Američkim Državama se organske kiseline i eterična ulja najčešće primenjuju kod pčelara koji imaju manje od 50 pčelinjih društava (Haber i sar., 2019). Ukoliko se posmatra broj i procentualna zastupljenost metoda u odnosu na broj pčelinjih društava, uočava se malo drugačija slika nego sa brojem analiziranih odgovora pčelara. Od 12 912

analiziranih pčelinjih društava kod 6 638 (51,41%) korišćena je metoda primene amitraza i to amitraza u formi nadimljavanja/aerosola kod 6638 (51,41%) i amitraza u obliku traka (npr. Apivar, Apitraz, Tactic) kod 2 884 (22,34%) pčelinjih društava. Sledeća najčešće korišćena hemijska metoda je primena oksalne kiseline, u 5 813 (45,02%) pčelinjih društava je korišćena oksalna kiselina nakapavanjem, dok je u 1 953 (15,13%) pčelinjih društava korišćena oksalna kiselina u obliku sublimacije (evaporacija, isparavanje). Ovde je potrebno pridodati i 319 (2,47%) pčelinjih društava na kojima je primenjena mešavina sa oksalnom kiselinom (Hiveclean/Bienenwohl/Varromed). Zatim sledi primena kumafosa u obliku traka (npr. Checkmite+) kod 3 868 (29,96%) pčelinjih društava kao i primena mravlje kiseline - kratkoročni tretman kod 2 536 (19,64%) društava i mravlje kiseline - dugoročni tretman (npr. Mite-Away Quick Strips (MAQS) kod 284 (2,20%) društava. Najčešći nehemijski tretman je bilo uklanjanje trutovskog legla kod 2 092 (16,20) pčelinjih društava (tabela 3). Na osnovu ovoga se može zaključiti da je najveći broj pčelinjih društava u našem istraživanju bio tretiran amitrazom.

Haber i saradnici (2019) su upoređivali razlike u tretmanu protiv pčelinjeg krpelja u severnim i južnim klimatskim regionima SAD koji koriste pčelari koji imaju mali broj pčelinjih društava, ali nisu ustanovili statistički značajne razlike. U njihovim istraživanjima, utvrdili su da pčelari koji imaju veliki broj pčelinjih društava preferiraju hemijske akaricide u odnosu na pčelare koji imaju mali broj pčelinjih društava. Kada je reč o evropskim zemljama, tretmani mravljom kiselinom imaju široku primenu u Austriji, Danskoj, Nemačkoj, Švajcarskoj i Sloveniji, dok se ne koriste često u geografski udaljenim zemljama poput Francuske, Grčke i Norveške. Upadljive razlike se mogu naći i za sintetičke akaricide, koji se retko koriste u mnogim zemljama, ali se određene supstance u velikoj meri primenjuju u pojedinim zemljama, poput Češke i Rumunije (fluvalinat), Letonije (flumetrin), Francuske i Španije (amitraz u trakama) (Brodschneider i sar., 2022). Na primenu sintetičkih akaricida verovatno u velikoj meri utiču istorija, pravni status i stav pčelara (Mutinelli 2016; Thoms i sar., 2019; Jack i Ellis, 2021).

Zahvalnica:

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

REFERENCE

Kompletan spisak referenci (46) se može dobiti na lični zahtev od prvog autora

CONTROL STRATEGY OF VARROA DESTRUCTOR IN THE REPUBLIC OF SERBIA

***Branislav Vejnović, Jevrosima Stevanović, Uroš Glavinić, Marko Ristanić,
Milorad Mirilović, Spomenka Đurić, Zoran Stanimirović***

Summary

Beekeepers have at their disposal various methods for controlling the bee mite Varroa destructor. In order to determine which methods are used in apiaries on the territory of the Republic of Serbia, 112 beekeepers who have a total of 12,912 bee colonies were surveyed using COLOSS questionnaire. Among 18 different control measures against Varroa destructor the most commonly used methods were: oxalic acid (dripping and sublimation), amitraz (fogging/aerosol and through strips), coumaphos (through strips), drone brood removal and formic acid (short-term and long-term treatment). In relation to the number of hives, the most commonly used methods are: amitraz (fogging/aerosol and through strips), oxalic acid (dripping and sublimation), coumaphos (through strips) and formic acid (short-term and long-term treatment), tau-fluvalinate and removing drone brood. Based on the results obtained, we may conclude that beekeepers in Serbia most often use amitraz (fogging/aerosol and through strips) in the fight against Varroa destructor.

Keywords: *Apis mellifera, Beekeeping, Acaricide, Varroa control, COLOSS Questionnaire*

EPIDEMIOLOŠKI ASPEKT PRENOSA VIRUSA SARS-COV-2 SA ČOVEKA NA KUĆNOG LJUBIMCA U VREMENSKOM PERIODU OD 2020 DO 2022.

Danijela Videnović^{1}, Tamaš Petrović², Sara Savić²*

Kratka sadržaj

U periodu trajanja pandemije Covid-19 u Republici Srbiji je ispitana 41 jedinka vlasničkih pasa i mačaka na prisustvo SARS-CoV-2 virusa kod obolelih ljudi ili onih sa potvrdom o protekloj infekciji ovim virusom dobijenom na osnovu utvrđivanja prisustva specifičnih antitela protiv SARS-CoV-2. U periodu trajanja istraživanja od 2020 do 2022. godine i praćenja prenosa virusa SARS-CoV-2 sa čoveka na kućnog ljubimca, došlo se do različitih epidemioloških podataka o mogućnosti zaražavanja čoveka i njihovih ljubimaca.

U toku popunjavanja ankete od strane vlasnika ispitanih kućnih ljubimaca (41) odgovarajući broj njih je bio pozitivan na virus SARS-CoV-2 u toku preuzimanja kućnih ljubimaca radi uzorkovanja i dijagnostičkih ispitivanja na prisustvo virusa / protekle infekcije SARS-CoV-2 RT-PCR i ELISA metodom. Značajno je navesti da su vlasnici u periodu ispitivanja njihovih kućnih ljubimaca bili različitog imunskog i infektivnog statusa. Vlasnici su bili vakcinisani ili nevakcinisani, oboleli ili oni koji su preboleli Covid-19. Od navedenog broja anketiranih klijenata pojedini su imali simptome bolesti Covid-19 ali se nisu obratili lekaru, a došlo je do zaražavanja njihovih ljubimaca u momentu kontakta u kući. Za takve vlasnike smo smatrali da su imali kontakt sa inficiranom osobom i da su se na osnovu pojave kliničkih simptoma javili dalje veterinaru zbog brige o svom ljubimcu i mogućeg prenosa zaraze na njega. Kod ljubimaca navedenih vlasnika, SARS-CoV-2 je dijagnostikovao u momentu testiranja ljubimca kao trenutno prisutna infekcija ili kao protekla infekcija na osnovu detekcije specifičnih antitela. U talasima epidemije u Republici Srbiji potvrđena je reinfekcija vlasnika koji su prethodno bili vakcinisani i to sa potvrđenom i nepotvrđenom infekcijom kod kućnih ljubimaca po ispitivanju RT-PCR i ELISA metodama. Kućni ljubimci koji su oboleli u navedenim vremenskim periodima bili su različitog uzrasta, različitih vrsta i različitih rasa. Vlasnici navedenih ljubimaca, oboleli u tom periodu, takođe su bili različite starosne dobi. Istraživanje je rađeno na nivou grada Beograda a pozitivni nalazi kod kućnih ljubimaca su utvrđivani u periodima kada je broj obolelih bio u očekivanom većem piku.

¹Dr vet. Danijela Videnović, Ambulanta "Zeleni venac vet", Beograd, R. Srbija

²Dr sci. vet. med. Tamaš Petrović, naučni savetnik; dr sci. vet. med. Sara Savić, naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: zelenivenacvet@gmail.com

Ovakva vrsta alata ispitivanja nalazi svoju upotrebu u momentima kada postoje skromna i nedovoljna saznanja o načinu prenosa virusa sa čoveka na ljubimca, a radi primene preventivnih postupaka zbog postojećeg rizika da se oboli u toku rada. Za primenu preventivnih postupaka, u toku preuzimanja i rada sa ljubimcima, iz kuća gde su ljudi oboleli ili postoji sumnja na osnovu prijavljenih simptoma od strane vlasnika veterinaru, adekvatni su postojeći propisi kako kod nas tako i u svetu. Sve ove vrste informacija su podržane adekvatnom anketom korišćenom u ambulantnim uslovima (Zeleni venac vet), potvrdama za vlasnike ljubimaca koje su poticale iz službeno odobrenih laboratorija (Batut, Gradski zavod za javno zdravlje). Iako je prema dobijenim podacima i saznanjima vrlo mala verovatnoća prenosa infekcije virusom SARS-CoV-2 sa mačke/psa na čoveka, velika je mogućnost profesionalnog oboljenja u kontaktu veterinara i vlasnika životinja u slučaju neadekvatnog sprovođenja preventivnih mera.

Ključne reči: Covid-19, kućni ljubimci, preventivne mere, SARS-CoV-2, Srbija

EPIDEMIOLOGICAL ASPECT OF SARS-COV-2 VIRUS TRANSMISSION FROM HUMANS TO PETS IN THE PERIOD 2020-2022

Danijela Videnović, Tamaš Petrović, Sara Savić

Summary

During the Covid-19 pandemic in the Republic of Serbia, 41 domestic dogs and cats were tested for the presence of SARS-CoV-2 virus in humans or confirmation of past infection with this virus (determination of the presence of specific antibodies against SARS-CoV-2). During the period of research 2020-2022 and monitoring the transmission of the SARS-CoV-2 virus from humans to pets, there were various epidemiological data on the possibility of infecting humans and their pets.

At the time of the survey, pet owners (41) tested positive for SARS-CoV-2 virus during pet collection for sampling and diagnostic testing for SARS-CoV-2 virus / past RT-PCR infection and ELISA method. It is important to note that the owners had different immune and the infectious status during the study period of their pets (the owners were vaccinated or unvaccinated, became ill or had Covid-19. Some of the clients surveyed had symptoms of Covid-19 but they did not consult a doctor, and their pets became infected at the time of contact in the house. For such owners, we considered that they had contact with an infected person and that, based on the appearance of clinical symptoms, they contacted the veterinarian further because of the care of their pet and the possible transmission of the infection to him. In pets of the mentioned owners, SARS-CoV-2 was diagnosed at the time of testing the pet as a currently present infection or as a past infection based on the detection of specific antibodies. In the waves of the epidemic in the Republic of Serbia, the reinfection of owners who were previously vaccinated was confirmed, with confirmed and unconfirmed infection in pets after testing by RT-PCR and ELISA methods.

The pets that became ill during these periods were of different ages, different species and different breeds. The owners of these pets who fell ill during that period were also of different ages. The research was done at the level of the city of Belgrade, and positive findings in pets were determined in periods when the number of patients was at the expected higher peak.

This type of testing tool finds its use in moments when we have little knowledge about the way the virus is transmitted from humans to pets to apply preventive procedures due to the existing risk of getting sick during work. For the application of preventive procedures during the collection and work with pets from houses where people are sick or there is a suspicion based on symptoms reported by the owner to the veterinarian, the existing regulations are adequate both in our country and in the world. All these types of information are supported by an adequate survey used in outpatient settings (Zeleni venac vet), and certificates for pet owners that came from officially approved laboratories (Institute of public health of Serbia-Batut, City Institute of Public Health, etc.). Although according to the obtained data and knowledge, the probability of infection with SARS-CoV-2 virus from cats/dogs to humans is very low, there is a high possibility of occupational disease in contact with veterinarians and animal owners in case of inadequate preventive measures.

Keywords: Covid-19, SARS-CoV-2, Serbia, pets, preventive measures

PRVI NALAZ GENA ZA STX2A U UKUPNOJ DNK FECESA SVINJA S PODRUČJA VOJVODINE

**Vuk Vračar¹, Jana Mitrović¹, Gordana Kozoderović², Tamás Süli³,
Stanislav Simin¹, Vesna Lalošević¹**

Kratak sadržaj

Šiga toksin-produkujuće *Escherichia coli* (STEC) su zoonotski patogeni prenosivi hranom. Infekcije koje oni uzrokuju imaju javno-zdravstveni značaj i kod ljudi se mogu ispoljiti u vidu dijareje i ozbiljnih kliničkih stanja poput hemoragičnog kolitisa i hemolitičko-uremijskog sindroma. Primarni faktor virulencije STEC obuhvata dva imunološki različita tipa toksina, Stx1 i Stx2, pri čemu oba imaju po nekoliko genetskih varijanti, a Stx1 je heterogeniji od Stx2. Ove razlike u građi šiga toksina uslovljavaju i značajne razlike u njihovoj biološkoj aktivnosti, tj. serološkoj reaktivnosti, vezivanju za receptore i potentnosti. Sojevi STEC koji proizvode Stx2, konkretno Stx2a, Stx2c i Stx2d, mnogo češće se dovode u vezu s razvojem najozbiljnijih formi oboljenja kod ljudi. Svinje su značajan rezervoar STEC i mogu predstavljati direktan rizik za ljude unosom ovih sojeva u lanac ishrane, ili indirektno, kontaminacijom zemljišta i vode.

Prema našim saznanjima, do danas u Srbiji ne postoje objavljeni podaci o istraživanjima usmerenim ka subtipizaciji Stx, stoga je cilj našeg rada bio da se ustanovi prisustvo gena zoonotski značajnog subtipa Stx2a u populaciji svinja u Vojvodini.

Uzorci ukupne DNK fecesa zdravih svinja (n=374) testirani su multipleks PCR metodom na prisustvo stx1, stx2 i eae gena. Uzorci pozitivni na stx2 gen (82; 21,9%), dalje su subtipizirani na gen stx2a koji je utvrđen u 3 uzorka što čini 0,8% u ukupnoj populaciji svinja, odnosno 3,65% stx2 pozitivnih uzoraka.

U našem istraživanju, po prvi put u Srbiji, u populaciji svinja smo ustanovili prisustvo gena za zoonotski značajan Stx2a toksin, koji je, iako sa niskom prevalencijom, od velike važnosti za javno zdravlje i upotpunjavanje epidemiološke slike STEC u Srbiji.

Ključne reči: PCR, Srbija, stx2a gen, svinje, šiga toksini

¹Dr sci. vet. med. Vuk Vračar, docent; dr. sci. vet. med. Jana Mitrović, stručni saradnik; dr. sci. vet. med. Stanislav Simin, docent; dr. sci. vet. med. Vesna Lalošević, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija

²Dr Gordana Kozoderović, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Učiteljski fakultet u Somboru, Sombor, Srbija

³Dr Tamás Süli, Veterinarski zavod Subotica, Subotica, Serbia

*e-mail autora za korespondenciju: vuk.vracar@polj.uns.ac.rs

UVOD

Šiga toksin-produkujuće *Escherichia coli* (STEC) su zoonotski patogeni prenosivi hranom, koji imaju javno-zdravstveni značaj na globalnom nivou (Zhang i sar., 2021). Kliničke manifestacije infekcija koje oni uzrokuju se kreću u spektru od blagih dijareja do ozbiljnih kliničkih stanja poput hemoragičnog kolitisa i hemolitičko-uremijskog sindroma (HUS) koji se razvija kod 2-22 % pacijenata (Lodato 2021; Zhang i sar., 2021). Kao posledica infekcija izazvanih sa STEC, HUS se javlja kod otprilike kod 10 % inficirane dece mlađe od 10 godina i dovodi do stope smrtnosti od 5% u ovoj starosnoj grupi. Infekcije izazvane ovim sojevima *E. coli* kod osoba starije dobi, takođe su povezane sa visokim morbiditetom i mortalitetom (Teel i sar., 2003).

Primarni faktor virulencije STEC obuhvata dva imunološki različita tipa toksina, Stx1 i Stx2, za koje ne postoji antitoksin koji bi ih neutralisao (Lodato, 2021). Oba toksina imaju po nekoliko genetskih varijanti, a Stx1 je heterogeniji od Stx2. Razlike u građi šiga toksina uslovljavaju i značajnu varijabilnost u njihovoj biološkoj aktivnosti, tj. serološkoj reaktivnosti, vezivanju za receptore i potentnosti. Sojevi STEC koji proizvode Stx2, konkretno Stx2a, Stx2c i Stx2d, mnogo češće se dovode u vezu s razvojem najozbiljnijih formi oboljenja kod ljudi (Capps i sar., 2021).

Iako se goveda smatraju primarnim rezervoarom STEC za humane infekcije, namirnice koje potiču od drugih životinjskih vrsta, uključujući i svinje, predstavljaju direktan rizik za ljude unosom ovih sojeva u lanac ishrane, ili indirektno, kontaminacijom zemljišta i vode (Tseng i sar., 2014).

Prema našim saznanjima, do danas u Srbiji ne postoje objavljeni podaci o istraživanjima usmerenim ka subtipizaciji Stx, stoga je cilj našeg rada bio da se ustanovi prisustvo gena zoonotski značajnog subtipa Stx2a u populaciji svinja u Vojvodini.

MATERIJAL I METODE

U ovo istraživanje su bila uključena 374 uzorka ukupne DNK fecesa svinja koji su prikupljeni za potrebe prethodnog istraživanja tokom 2016. godine, na području Autonomske Pokrajine Vojvodine. U ispitivanu populaciju su proporcionalno bile uključene svinje svih kategorija, a uzimanje uzoraka je vršeno metodom slučajnog izbora, direktno iz rektuma odabranih jedinki. Ekstrakcija genomske DNK urađena je QIAamp DNA Stool Mini Kitom (QIAGEN) prema uputstvu proizvođača.

Amplifikacija gena faktora virulencije (*stx1*, *stx2*, *eae*) urađena je multipleks PCR tehnikom na TC-412 Thermal Cycler (Techne, Stone, UK) pod uslovima i sa prajmerima prethodno opisanim od strane Fadela i saradnika (Fadel i sar., 2017).

Za subtipizaciju *stx2a* gena primenjen je konvencionalni simpleks PCR metod prethodno opisan od strane Scheutz-a i saradnika, korišćenjem praj-

mera (F2): (5'-CGATACTGRGBACTGTGGCC-3'), (R3):(5'-CCGKCAACCTTCA-CTGTAAATGTG-3') i (R2): (5'-GCCACCTTCACTGTGAATGTG-3'), uz modifikaciju temperature vezivanja prajmera (65°C) (Scheutz i sar., 2012). Reakciona smeša ukupnog volumena 20 µl sadržavala je 5 µl ispitivanog DNK ekstrakta, 10 µl Hot Start Taq 2x Master Mix, po 1,25 µl od svakog prajmera (5 µmol) i 1,25 µl sterilne ddH₂O. Kao pozitivna kontrola je korišćen DNK ekstrakt *E. coli* O157:H7 ATCC 35150. Kao negativna kontrola, odnosno za proveru ispravnosti postupka, korišćena je "non-template" kontrola (NTC). Nakon razdvajanja PCR produkata elektroforezom, urađena je vizuelizacija PCR produkata etidijum bromidom. Očekivana veličina PCR produkata je bila 349 i/ili 347 bp, što je analizirano u Serva BlueCube 300 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) sistemu za vizualizaciju.

REZULTATI

Uzorci totalne DNK fecesa zdravih svinja (n=374) testirani su multipleks PCR metodom na prisustvo *stx1*, *stx2* i *eae* gena. Uzorci pozitivni na *stx2* gen (82; 21,9%), dalje su subtipizirani na gen *stx2a* koji je utvrđen u 3 uzorka što čini 0,8% u ukupnoj populaciji svinja, odnosno 3,65 % *stx2* pozitivnih uzoraka.

DISKUSIJA

Šiga-toksin produkuje *Escherichia coli* izazivaju infekcije kod ljudi koje karakterišu dijareja i hemoragični kolitis, sa mogućim komplikacijama u vidu insuficijencije bubrega i posledično hemolitičko-uremijskim sindrom (Remfry i sar., 2021). Neki STEC sojevi su takođe označeni kao enterohemoragične *E. coli* (EHEC). Ovi sojevi čine podgrupu STEC i karakterišu ih određeni serotipovi, koji su često povezani sa epidemijama i teškim kliničkim oboljenjima (Delannoy i sar., 2013). Glavni faktor virulencije STEC je Šiga toksin, koji je kodiran od strane bakteriofaga. Serotip O157 je najzastupljenija STEC širom sveta i proizvodi jedan ili više Stx suptipova. Produkcija Stx2, pre svega Stx2a subtipa, predstavlja glavni rizični faktor za teške STEC infekcije, s obzirom na to da je prečišćen Stx2 1 000 puta toksičniji prema humanim bubrežnim endotelnim ćelijama nego Stx1. Međutim, produkcija Stx2 izuzetno varira među sojevima (Ogura i sar., 2015).

Pored preživara kao najvažnijih rezervoara STEC, infekcije kod ljudi su takođe pripisane i svinjama. Svinje su nosioci STEC koji putem lanca hrane mogu dospeti do ljudi i tako predstavljaju rizik po javno zdravlje. Sojevi STEC, izolovani iz svinja i svinjskog mesa, često su bili povezani sa slučajevima hemoragičnog kolitisa i HUS-a kod ljudi (Arancia i sar., 2019; Colello i sar., 2016).

Prevalencije STEC sojeva i prisustva *stx2* ili *stx2a* gena u populacijama svinja kao i proizvodima od mesa svinja navode se u mnogim epidemiološkim studijama sprovedenim u različitim zemljama. Međutim, ove podatke je često vrlo teško uporediti usled razlika u dizajnu studija, vrsti i načinu prikupljanja uzoraka, kao i samoj metodologiji rada.

U naše istraživanje su bila uključena 374 pojedinačna uzorka fecesa zdravih svinja iz kojih je izolovana ukupna DNK. Od ukupnog broja uzoraka, *stx2* gen pronađen je u 82 uzorka (21,9 %), dok je subtipizacijom, *stx2a* gen utvrđen u 3 uzorka, što čini 0,8 % u ukupnoj populaciji svinja, odnosno 3,65 % *stx2* pozitivnih uzoraka.

U Italiji su, Arancia i sar., ispitivanjem sadržaja cekuma svinja u klanicama utvrdili prevalenciju *stx2* gena u 50,4 % uzoraka, nakon čega je urađena izolacija sojeva EHEC, od kojih je većina (74,2 %) posedovala *stx2a* subtip, prisutan i u kombinaciji sa *stx2b* i *stx2c* subtipovima u 16,7 % uzoraka (Arancia i sar., 2019). Sličnu prevalenciju *stx2* gena navode i Ercoli i sar., takođe u Italiji, gde je na liniji klanja bilo pozitivno 38,6 % uzoraka fecesa svinja i 13 % briseva trupova, dok je u uzorcima mesa, *stx2* otkriven u samo 2,1 % uzoraka (Ercoli i sar., 2016).

Prisustvo *stx2a* gena kod *E. coli* O157:H7, navodi se u rezultatima studije iz Indonezije, gde je ovaj gen identifikovan u sojevima izolovanim iz uzoraka svinjetine, fecesa svinja i vode. Rezultati tih ispitivanja su dokazali da je *stx2a* gen utvrđen u 75 % izolata *E. coli* O157:H7, odnosno da je bio prisutan u 87,5 % uzoraka svinjetine, 70 % uzoraka stolice, i 50 % uzoraka vode (Goma i sar., 2019). Slične rezultate navode i Ateba i Mwebe, koji su utvrdili *stx2* u 70,96 % (22/31) izolata *E. coli* O157:H7 iz uzoraka fecesa svinja (Ateba and Mbewe 2011). Značajno nižu prevalenciju *stx2a* subtipa kod izolata EHEC iz fecesa svinja navode autori studije sprovedene u SAD (Cha i sar., 2018), kod samo 0,6 % (2 izolata od ispitivanih 352). Nasuprot tome, u skorijoj studiji sprovedenoj u SAD, od 178 STEC izolata iz uzoraka fecesa zdravih svinja izolovano je 152 (85,4 %) *stx2*-pozitivna soja, međutim ni jedan nije sadržao *stx2a* gen (Remfry i sar., 2021).

Ispitivanjem rektalnih briseva svinja sa farmi u Češkoj, među izolatima EHEC najčešće je bio zabeležen *Stx2*, u čak 96 % izolata, od kojih je *stx2a* suptip pronađen u 14,3 % uzoraka (Kucerova i sar., 2018).

Od 2015. godine, Švajcarska savezna kancelarija za javno zdravlje registrovala je povećanje prijavljivanja slučajeva STEC kod ljudi, verovatno zbog usvajanja skrining testova za *Stx* u dijagnostičkim laboratorijama. Tokom 2017. godine, sprovedeno je ispitivanje serotipova i gena virulencije 120 STEC izolovanih iz uzoraka stolice ljudi, koji su podeljeni u grupe prema starosti i kliničkim simptomima kao što su abdominalni bol, dijareja i HUS. Od 120 STEC sojeva, 40 (33,3 %) je posedovalo subtipove gena sa izrazito patogenim potencijalom, *stx2a*, *stx2c*, *stx2d*. Nalaz ovih subtipova je bio ređi kod pacijenata sa abdominalnim bolom (14,3 %), nego kod pacijenata sa dijarejom (41 %) i HUS-om (100 %) (Nüesch-Inderbinen i sar., 2018).

Hemolitičko-uremijski sindrom je jedan od najčešćih razloga akutne insuficijencije bubrega i važan uzrok stečene hronične bubrežne bolesti kod dece (Colello i sar., 2016). Za potrebe studije sprovedene u Iranu, od juna 2018. do decembra 2019. prikupljeno je ukupno 315 uzoraka stolice dece sa dijarejom iz dve pedijatrijske nastavne bolnice u Teheranu. Od ukupnog broja uzoraka dobijeno je 150 (47,6 %) izolata *E. coli*, od kojih za 10 (6,7%) potvrđeno da su STEC. *Stx1* je

detektovan u 6 izolata i *stx2* u 4 izolata, a jedan izolat je istovremeno nosio i *stx1* i *stx2*. Svi *stx2* su bili subtipa *stx2a*. Između *stx1* i *stx2* gena, *stx2* je važniji zbog toga što je povezan sa težim oblikom HUS-a (Moeinirad i sar., 2021). Takođe su, Frank i saradnici, potvrdili da je tokom epidemije gastroenteritisa izazvane Šiga-toksin produkujućom *E. coli* 22 % pacijenata razvilo HUS, a u izolatima je otkriven *stx2a* gen (Frank i sar., 2011).

ZAKLJUČAK

Rezultati ove studije ukazuju da svinje mogu biti rezervoar zoonotskih STEC sojeva. Neophodna su dalja istraživanja koja uključuju veći broj uzoraka i druge subtipove Stx kako bi se ustanovila uloga svinja u epidemiologiji STEC infekcija, kao i da bi se razumeo uticaj na javno zdravlje različitih sojeva koji cirkulišu u populaciji svinja na području Srbije.

Zahvalnica:

Ovo istraživanje je podržano od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (451-03-68/2022-14/200117)

LITERATURA

1. Arancia S., Iurescia M., Lorenzetti S., Stravino F., Buccella C., Caprioli A. et al. 2019. Detection and isolation of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in caecal samples from pigs at slaughter in Italy. *Veterinary Medicine and Science*, 5:462-9.
2. Ateba C.N., Mbewe M. 2011. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 virulence genes in isolates from beef, pork, water, human and animal species in the northwest province, South Africa: public health implications. *Research in Microbiology*, 162:240-8.
3. Capps K.M., Ludwig J.B., Shridhar P.B., Shi X., Roberts E., DebRoy C. et al. 2021. Identification, Shiga toxin subtypes and prevalence of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feedlot cattle feces. *Scientific Reports*, 11: 8601.
4. Cha W., Fratamico P.M., Ruth L.E., Bowman A.S., Nolting J.M., Manning S.D. et al, 2018. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in finishing pigs: Implications on public health. *International Journal of Food Microbiology*, 264:8-15.
5. Colello R., Caceres M.E., Ruiz M.J., Sanz M., Etcheverria A.I., Padola N.L. 2016. From Farm to Table: Follow-Up of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Throughout the Pork Production Chain in Argentina. *Frontiers in Microbiology*, 7:93.
6. Delannoy S., Beutin L., Fach P. 2013. Discrimination of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from non-EHEC strains based on detection of various combinations of type III effector genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 51:3257-62.
7. Ercoli L., Farneti S., Zicavo A., Mencaroni G., Blasi G., Striano G., Scuota S. 2016. Prevalence and characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs and pork products in Umbria and Marche regions of Italy. *International Journal of Food microbiology*, 232:7-14.
8. Fadel H.M., Afifi R., Al-Qabili D.M. 2017. Characterization and zoonotic impact of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in some wild bird species. *Veterinary World*, 10:1118-1128.
9. Frank C., Werber D., Cramer J.P., Askar M., Faber M., an der Heiden M. et al. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *The New England Journal of Medicine*, 365:1771-1780.

10. Goma M.K.E., Indraswari A., Haryanto A., Widiasih D.A. 2019. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and Shiga toxin 2a gene in pork, pig feces, and clean water at Jagalan slaughterhouse in Surakarta, Central Java Province, Indonesia. *Veterinary World*, 12:1584-1590. **11.** Kucerova D., Kolackova I., Karpiskova R. 2018. Zoonotic significance of *Escherichia coli* strains isolated from cattle and pigs. *Klinicka mikrobiologie a infekcni lekarstvi*, 24:36-40. **12.** Lodato P.B. 2021. The effect of two ribonucleases on the production of Shiga toxin and stx-bearing bacteriophages in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 11:18372. **13.** Moeinirad M., Douraghi M., Foroushani AR., Sanikhani R., Dallal M.M.S. 2021. Molecular characterization and prevalence of virulence factor genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from diarrheic children. *Gene Reports*, 25:101379. **14.** Nüesch-Inderbilen M., Morach M., Cernela N., Althaus D., Jost M., Mäusezahl M. et al. 2018. Serotypes and virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated during 2017 from human infections in Switzerland. *International Journal of Medical Microbiology*, 308:933-939. **15.** Ogura Y., Mondal S.I., Islam M.R., Mako T., Arisawa K., Katsura K. et al. 2015. The Shiga toxin 2 production level in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is correlated with the subtypes of toxin-encoding phage. *Scientific Reports*, 5:16663. **16.** Remfry S.E., Amachawadi R.G., Shi X., Bai J., Tokach M.D., Dritz S.S. et al. 2021. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Feces of Finisher Pigs: Isolation, Identification, and Public Health Implications of Major and Minor Serogroups. *Journal of Food Protection*, 84:169-80. **17.** Scheutz F., Teel L.D., Beutin L., Pierard D., Buvens G., Karch H. et al. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50:2951-63. **18.** Teel L.D., Steinberg B.R., Aronson N.E., O'Brien A.D. 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated kidney failure in a 40-year-old patient and late diagnosis by novel bacteriologic and toxin detection methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:3438-40. **19.** Tseng M., Fratamico P.M., Manning S.D., Funk J.A. 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine: the public health perspective. *Animal Health Research Reviews*, 15:63-75. **20.** Zhang P., Essendoubi S., Keenlside J., Reuter T., Stanford K., King R. et al. 2021. Genomic analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from cattle and pork-production related environments. *NPJ Science of Food*, 5:15.

TOPIKALNA TERAPIJA OBOLJENJA KOŽE KONJA

**Mihajlo Erdeljan, Tijana Kukurić, Zorana Kovačević, Ivana Davidov,
Miodrag Radinović, Annamaria Galfi Vukomanović**

Kratak sadržaj

Lokalna terapija oboljenja kože konja je podjednako važna kao i ona kod pasa i mačaka. Međutim, ona je kod konja veoma često, ograničena na kupanje životinja. Kod pasa i mačaka, postoji čitav niz preparata koji se koriste u terapiji sa uputstvima i objašnjenja o mogućnostima njihovog korišćenja, a objavljen je i veliki broj radova o tome. Svi oni se mogu koristiti kod konja ali su u praksi slabo zastupljeni. Lokalni preparati za tretman kože dolaze u različitim formulacijama, u vidu šampona, sredstava za ispiranje, praškova, losiona, krema, masti i gelova. Kupanje šamponima je svako korisno, dok čekamo rezultate specijalističke analize – skarifikata, citološkog nalaza ili pregleda na gljivice. U određenim slučajevima, kupanje može biti i jedina potrebna terapija. U terapiji bakterijskih oboljenja, lek izbora je šampon na bazi hlorheksidina. Mogu se koristiti i preparati na bazi povidon joda, ali oni često suše kožu, izazivaju iritaciju i opadanje dlake. Antigljivična terapija podrazumeva korišćenje preparata na bazi hlorheksidina, mikoazonala i enilkonazola, a mogu se koristiti i benzoil peroksid i selenium sulfid. Terapija alergijskih oboljenja kortikosteroidima može biti problematična zbog teško predvidive resorpcije ali je preporuka da se ovi preparati koriste zajedno sa sistemskom terapijom uz smanjenje doza. Kao dopuna terapiji, može se koristiti bilo koji šampon koji će očistiti kožu. Posebno dobar efekat daju preparati na bazi linoleinske kiseline i pirokton olamida. Antiseboreična terapija podrazumeva primenu benzoil peroksida, etil laktata, salicilne kiseline i selenium sulfida. Problem ovakve terapije kod konja može biti i cena preparata zbog veličine životinje.

Ključne reči: bolesti kože, konji, lokalna terapija

Čitav niz različitih uzročnika može izazvati bolest kože (bakterije, virusi, gljivice i paraziti), alergije (na ubode insekata, hranu, lekove, faktore okoline), reakcije na sunce, fizičko ili hemijsko delovanje, genetski faktori ili promene tumorskog porekla (Gotić, 2017). Svakako da terapija oboljenja koja mogu imati ovako širok spektar etioloških faktora predstavlja veliki izazov. Vrlo često su kli-

¹Dr sci. vet. med. Mihajlo Erdeljan, vanredni profesor; dr vet. Tijana Kukurić, asistent; dr sci. vet. med. Zorana Kovačević, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Ivana Davidov, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Miodrag Radinović, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Annamaria Galfi Vukomanović, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: erdeljanm@polj.uns.ac.rs

nički simptomi slični ili isti, a to su gubitak dlake (lokalno ili generalizovano), svrab i crvenilo kože. Kako se oboljenje razvija mogu se pojaviti i drugi simptomi kao što su: osetljivost na dodir, kruste, ljuštenje kože, perutanje, zadebljavanje kože ili pojava otoka. Dijagnoza se može postaviti na osnovu anamneze i kliničke slike, ali je vrlo često za postavljanje definitivne dijagnoze potrebno uraditi specijalistički pregled.

Lokalna terapija oboljenja kože konja je podjednako važna kao i ona kod pasa i mačaka. Međutim, ona je vrlo često, kod konja, ograničena na kupanje životinja. Kupanje šamponima je svako korisno, dok čekamo rezultate specijalističke analize – skarifikata, citološkog nalaza ili pregleda na glivice. U određenim slučajevima kupanje može biti i jedina potrebna terapija.

U svakom slučaju, potrebno je kao inicijalnu terapiju upotrebiti šampon za kupanje. Kupanje šamponom će očistiti kožu koja će na taj način biti pripremljena za dalju terapiju. U slučajevima gde imamo kruste i posledično ljuštenje koje je u vezi sa infektivnim procesom, upotreba antibakterijskog sredstva - šampona sa kombinovanim keratolitičkim svojstvima (da promoviše ljuštenje smanjenjem kohezivnih sila između ćelija stratuma korneuma) i keratoplastičnim svojstvima (da pomogne u obnavljanju normalnog procesa keratinizacije) može biti od koristi (Paterson, 2003).

Kod pasa i mačaka postoji čitav niz preparata koji se koriste u terapiji zajedno sa uputstvima i objašnjenjima o mogućnostima njihovog korišćenja, a objavljen je i veliki broj radova o tome. Svi oni se mogu koristiti kod konja ali su u praksi slabo zastupljeni. Lokalni preparati za tretman kože dolaze u različitim formulacijama: u vidu šampona, sredstava za ispiranje, praškova, losiona, krema, masti i gelova. Postoji čitav niz faktora koje treba uzeti u obzir prilikom izbora formulacije za topikalnu terapiju oboljenja kože kod konja (tabela 1).

Bakterijski folikulitis kod konja je uglavnom izazvan koagulaza pozitivnim *Staphylococcus* spp. (Chiers i sar., 2003), tako se strategija lečenja mora usmeriti na njih. Mnogi izolati su rezistentni na penicilin G što dodatno otežava terapiju. Razvoju folikulitisa pogoduju: loša higijena, loše održavanje kože (šišanje, timarenje, kupanje), traume od opreme, toplo vlažno vreme i težak rad, tako da je preventiva veoma važna (White, 2015). Za lokalizovane lezije se može koristiti mupirocin mast, srebro sulfadiazin krema, a od šampona etil laktat ili hlorheksidin-tris-EDTA (4%). Od novijih preparata se preporučuje gel sa 0,4% kalaj fluorida ili fusidinska kiselina u vidu masti (Marsella i Akucewich, 2007). Drugi autori (Paterson, 2003), navode da je lek izbora u terapiji bakterijskih oboljenja šampon na bazi hlorheksidina. Mogu se koristiti i preparati na bazi povidon joda koji često suše kožu, izazivaju iritaciju i opadanje dlake (Scott i sar., 2001). Lokalna terapija često nije dovoljna.

Najčešći uzročnici dermatofitoze konja su: *Trichophyton equinum*, *Microsporum equinum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton bullosum* i *Trichophyton verrucosum* (Sitterle i sar., 2012). Topikalna terapija je u ovom slučaju najčešće dovoljna za izlečenje. Autori navode čitav niz preparata tako da anti-

gljivična terapija podrazumeva korišćenje preparata na bazi hlorheksidina, mikonazola, ketokonazola i enilkonazola ali se mogu koristiti i benzoil peroksid i selenium sulfid (Paterson, 2003). Može se koristiti i rastvor krečnog sumpora (1 kašika na 4 l vode) koji se koristi u voćarstvu i varikina u odnosu 1:10 sa vodom. Oba preparata su efikasna ali ostavljaju neurednu dlaku i imaju neprijatan miris (White, 2015). U svakom slučaju, tretman treba ponoviti za 6-8 nedelja a treba da budu tretirani svi konji koji su bili u kontaktu sa obolelom životinjom.

Tabela 1. Faktori koji utiču na izbor formulacije za topikalnu terapiju (Paterson, 2003)

Formulacija	Opis	Fizičke osobine i indikacije
Gel	Polučvrsti vodeni rastvor.	Nemasni, meša se sa vodom i lako se ispara. Neokluzivno. Koristan kod stanja kože sa eksudatom.
Krema	Mešavina emulgovane masti ili ulja sa vodom. Krema uglavnom sadrži više vode nego ulja.	Podmazuje i umiruje kožu. Blago okluzivno i protektivno. Kada voda ispari, ostavlja fin film od ulja. Kontraindikovana kod stanja kože sa eksudatom.
Mast	Mešavina emulgovane masti ili ulja sa vodom. Mast uglavnom sadrži više ulja nego vode.	Podmazuje i umiruje kožu. Okluzivna, protektivna, smanjuje gubitak vode. Kada voda ispari na koži ostaje debeo masni film. Kontraindikovana kod stanja kože sa eksudatom.
Losion	Tečnost u kojoj je aktivni sastojak suspendovan ili rastvoren.	Preparati za sušenje i hlađenje. Tečnost isparava a na koži ostavi film pudera. Može biti primenjen više puta. Pogodan za akutna stanja sa eksudatom, ali je kontraindikovan kod hroničnih problema sa suvom kožom.
Šampon	Tečnost sa aktivnim sastojcima koji se obično primenjuje koncentrovano na kožu u kombinaciji sa vodom. Zahteva ograničeno vreme kontakta da bi delovao.	Koristan za velike površine tela. Aktivni sastojci imaju samo kratko trajanje delovanja.
Rastvor za ispiranje	Koncentrovani rastvor ili prah pomešan sa vodom. Nanosi se prskanjem, polivanjem ili sunderom na životinju.	Koristan za velike površine tela. Ostavlja aktivne sastojke na koži. Dugo trajanje delovanja. Često se primenjuje nakon terapije šamponom.
Prašak	Organski ili neorganski prah u čvrstom stanju nanosi se na kožu u vidu tankog filma.	Koristan za sušenje i hlađenje kože. Često sadrži druge aktivne sastojke (npr. anti-parazitarne agense). Koža mora biti čista i suva pre nanošenja.

Terapija alergijskih oboljenja kortikosteroidima može biti problematična zbog teško predvidive resorpcije, ali je preporuka da se koriste zajedno sa sistemskom terapijom uz smanjenje doza. Kao dopuna terapiji može se koristiti bilo koji šampon koji će očistiti kožu. Posebno dobar efekat daju preparati na bazi linoleinske kiseline i pirokton olamida.

Tretman pemfigusa obično podrazumeva upotrebu prednizolona 1 mg/kg t.m. na 12 h, zatim deksametazona 0,05–0,1 mg/kg t.m. na 24 h (McGurrin i sar., 2004). Isti autori preporučuju kao topikalnu terapiju primenu kortikosteroida - triamcinolon sprej 0,015%, ili hidrokortizon aceponat sprej 0,0584%, čijom primenom se u nekim slučajevima može izbeći primena sistemskih kortikosteroida. Alternativa (koja je dosta skuplja), može biti upotreba takrolimus masti 0,1%.

Antiseboreična terapija podrazumeva primenu šampona na bazi benzoil peroksida, etil laktata, salicilne kiseline i selenium sulfida (Johns, 2014).

Vrlo često se kao posledica nekog od hroničnih oboljenja pojavljuju ožiljci ali su informacije o njihovim tretmanima uglavnom preuzete od drugih životinjskih vrsta (Wobeser, 2015). Problematika je ovde dvojaka, ekonomska tj. estetska sa jedne strane, a sa druge strane dobrobit same životinje može biti ugrožena (Constable i sar., 2017). Kao posledica osnovne bolesti, hronične kožne lezije se smatraju najvažnijim uzrokom prolongiranog lečenja i rehabilitacije, često sa uginućem životinje ili eutanazijom (Anantama i sar., 2022). Različiti autori navode sledeću prevalencu hroničnih oboljenja kože tako da se gljivična oboljenja javljaju najčešće (29,6%), zatim dolaze ektoparazitoze (16,3%), habronemiasa (8%), melanomi (7,2%), sarkoidi (4,7%), papilomatoza (3,3%) i skvamozni celularni karcinom (2,5%) (Mottet i sar., 2018; Tyrnenopoulou i sar., 2019). Prevalenca svakako zavisi od većeg broja faktora – genetskih, klimatskih, načina držanja i korišćenja. Lokalizacija je takođe najčešća na pojedinim delovima tela tako da su najviše zahvaćeni glava, abdomen, prepucijum kod muških životinja i distalni delovi ekstremiteta (Verhaar i sar., 2018). Osim anamneze i kliničkog nalaza, dijagnostika često zahteva i specijalističke preglede pre odluke o terapiji a to su analize briseva kože, biopsija, parazitološke i mikrobiološke pretrage (Constable i sar., 2017; Salant i sar., 2021).

Postoji nekoliko terapijskih protokola razvijenih za saniranje hroničnih lezija, a oni podrazumevaju upotrebu makrocikličnih laktona (ivermektin i moksidektin), antibakterijskih lekova u kombinaciji sa hirurškom resekcijom, kriohirurgiju, steroidne anti-inflamatorne lekove i različite tretmane kože (Lavy i sar., 2022; Tyrnenopoulou i sar., 2019; Wobeser, 2015), što samo govori o nedostatku uspešnih novijih procedura. Poslednjih godina postoji čitav niz pokušaja da se iznađu preparati koji mogu pomoći u lečenju. Tako korišćenje hitosana, biopolimera, može pomoći u procesu zarastanja (Escarcega-Galaz i sar., 2018). Strukturno, to je linearni, 2-monomer polisaharid, (1-4)-2-amino-2-deoxy- β -D-glucan (D-glucosamine) i (1-4)-2-acetamide-2-deoxy- β -D-glucan (N-acetyl-D-glucosamine). Istraživanja dokazuju da je on biokompatibilan, biorazgradiv, netoksičan, sa antimikrobiološkim i koagulantnim svojstvima, a može se koristiti u obliku ge-

la, sunđera, praška i filma (Sanchez-Machado i sar., 2019). Hitosan filmovi su jeftini, fleksibilni i elastični i kao takvi se mogu koristiti za više namena, uključujući i zarastanje rana (Lopez-Cervantes i sar., 2019; Maldonado-Cabrera i sar., 2021). Preporuka za korišćenje hitosana je gel ili film sa 2% hitosana, primenom na leziju svaka 72 sata tokom 3 meseca. Upotreba ovakvog protokola je potvrdila da je to adekvatan tretman za hronične lezije na koži konja zbog svoje biokompatibilnosti i efikasnosti. Dodatno je poboljšana funkcionalnosti tog dela kože i primetni su kozmetički efekti posle regeneracije kože (Maldonado-Cabrera i sar., 2022).

Na kraju treba napomenuti, da većina ovih preparata nije registrovana za primenu kod konja, kako kod nas tako i u inostranstvu. Sa jedne strane, radi se o preparatima iz male prakse, obično o preparatima za pse, a sa druge strane o preparatima iz humane medicine. Problem ovakve terapije kod konja može predstavljati cena preparata zbog veličine životinje, pogotovu ako se radi o preparatima namenjenim za ljude.

LITERATURA

1. Anantama N.A., Du Cheyne C., Martens A., Roth S.P., Burk J., De Spiegelaere W. et al. 2022. The granulation (t)issue: A narrative and scoping review of basic and clinical research of the equine distal limb exuberant wound healing disorder. *The Veterinary Journal*. 280, Article 105790. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2022.105790>
2. Chiers K., Decostere A., Devriese L.A., Haesebrouck, F. 2003. Bacteriological and mycological findings, and *in vitro* antibiotic sensitivity of pathogenic staphylococci in equine skin infections. *Vet. Rec.*, 152, 138-41.
3. Constable P.D., Hinchcliff, K.W., Done, S.H., Grünberg W. 2017. Diseases of the skin, eye, conjunctiva, and external ear. *Veterinary Medicine*, 11th ed., pp. 1540–661. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5246-0.00016-4>
4. Escarcega-Galaz A.A., Cruz-Mercado J.L.D., La Lopez-Cervantes J., Sanchez-Machado D.I., Brito-Zurita O.R et al. 2018. Chitosan treatment for skin ulcers associated with diabetes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 130–5. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.03.017>
5. Johns I. 2014. Veterinary management of starved and neglected horses. *In Practice*, 36, 144-52. doi:10.1136/inp.g1539
6. Lavy E., Kirmayer D., Nudelman Z., Orenshtein-Vilensky L., Rowan T.G., Shenderovich-Gefter J. et al. M. 2022. Aspects in controlled drug delivery for topical applications in veterinary medicine. *Veterinary and Animal Science*, 15, Article 100235. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100235>
7. Lopez-Cervantes J., Escarcega-Galaz A.A., Sanchez-Machado D.I., De La Cruz-Mercado JL., Perez-Gomez L.E., Ornelas-Aguirre J.M. 2019. Characterization and efficacy of chitosan membranes in the treatment of skin ulcers. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 6(1), 195–205. <https://doi.org/10.1080/2314808X.2019.1694734>
8. Maldonado-Cabrera B., Sanchez-Machado D.I., Lopez-Cervantes J., Osuna - Chavez R. F., Escarcega-Galaz A.A., Robles-Zepeda R.E. et al. 2021. Therapeutic effects of chitosan in veterinary dermatology: a systematic review of the literature. *Preventive Veterinary Medicine*. 190, Article 105325. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105325>
9. Maldonado-Cabrera B., Sanchez-Machado D.I., Lopez-Cervantes J., Osuna-Chavez R.F., Ibarra-Zazueta C., Robles-Zepeda, R.E. 2022. Efficacy of chitosan in the treatment of chronic skin lesions in a horse: A case report. *Veterinary and Animal Science*, Article 100261. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2022.100261>
10. McGurrin M.K., Arroyo L.G., Bienzle D. 2004. Flow

cytometric detection of platelet-bound antibody in three horses with immune-mediated thrombocytopenia. J. Am. Vet. Med. Ass. 224, 83-7. **11.** Marsella R, Akucewich L. 2007. Investigation on the clinical efficacy and tolerability of a 0.4% stannous fluoride preparation (MedEquine® Gel) for the treatment of bacterial skin infections in horses: a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. Vet. Dermatol. 18, 444-50. **12.** Mottet R.S., Moon R.D., Hathaway M.R., Martinson K.L. 2018. Effectiveness of Stable Fly Protectants on Adult Horses. Journal of Equine Veterinary Science. 69, 11-5. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.06.002>. **13.** Sanchez-Machado D.I., Lopez-Cervantes J., Correa-Murrieta M.A., Sanchez- Duarte R. G., Cruz-Flores P, Servin De la Mora-L'opez G. 2019. Chitosan. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements (485-493). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00064-3> **14.** Salant H, Rojas A, Yardeny D, Brenner O, Schwartz G, Baneth G, Dvir E. 2021. Cutaneous habronemosis in horses: First molecular characterization of *Habronema muscae* in Israel. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. Article 101608. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101608> **15.** Scott D.W., Miller W.H., Griffin C. E. 2001. Dermatological therapy. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 6th edn. Philadelphia, W. B. Saunders. 207-73. **16.** Sitterle E., Frealle E., Foulet F, Cabaret P, Cremer G., Guillot J., Delhaes L., Botterel, F. 2012. *Trichophyton bullosum*: a new zoonotic dermatophyte species. Med. Mycol. 50, 305-9. **17.** Tyrnenopoulou P, Diakakis N, Psalla D., Traversa D., Papadopoulos E., Antonakakis, M. 2019. Successful surgical management of eosinophilic granuloma on the urethral process of a gelding associated with *Habronema spp.* infection. Equine Veterinary Education, 31(1), e1-e4. <https://doi.org/10.1111/eve.12890> **18.** Verhaar N., Hermans H., Van Rooij E., Van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.S., Ensink J. 2018. Case series: Periocular habronemiasis in five horses in the Netherlands. Veterinary Record, 182(26), 746. <https://doi.org/10.1136/vr.104265> **19.** White S.D. 2015. A diagnostic approach to the pruritic horse. Equine Veterinary Education Equine vet. Educ. 27 (3) 156-166 doi: 10.1111/eve.12278 **20.** Wobeser B.K. 2015. Skin Diseases in Horses. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, 31(2), 359-376. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2015.04.007>

PREVALENCIJA SUPKLINIČKE KOKCIDIOZE NA FARMAMA TOVNIH PILIĆA U VOJVODINI

Marko Pajić, Slobodan Knežević, Dalibor Todorović

Kratak sadržaj

Kokcidioza predstavlja jednu od najznačajnijih bolesti koja se učestalo pojavljuje na farmama živine. Savremena živinarska proizvodnja se sve više suočava sa supkliničkom formom kokcidioze, koja nanosi velike ekonomske gubitke širom sveta. Ona ima indirektan uticaj na proizvodne rezultate, zbog toga što se smanjenom iskoristivošću hrane produžava proizvodni ciklus i povećava se stepen konverzije hrane. Praćenjem broja oocista kokcidija u fecesu pilića, može se pravovremeno ustanoviti prisustvo supkliničkih infekcija u jatu, kako bi se sprovele odgovarajuće terapijske mere. Cilj ovog istraživanja je bio da se praćenjem broja oocista kokcidija, pravovremeno ustanovi prisustvo supkliničkih infekcija u jatu i da se ustanovi njena prevalencija.

Ukupno je ispitano 100 jata na isto toliko farmi tovnih pilića. Prilikom posete farmama, prvo je sproveden klinički pregled jata, a nakon toga je uzorkovan feces u najlonske kese. Uzorci su uzimani od pilića uzrasta od 3 do 6 nedelja. Nakon sakupljanja, uzorci su u putnom frižideru dopremani u laboratoriju. Parazitološki pregled je obavljen modifikovanom metodom flotacije po Mekmasteru kako bi se utvrdio broj oocista kokcidija u gramu uzorka. Primenom ove metode, oociste kokcidija su ustanovljene u 59 jata (59 odsto), dok je 41 jata bilo slobodno od infekcije. Infekcija kokcidijama je u najvećem broju slučajeva bila supklinička. U 51 jatu brojlera (51 odsto), uprkos prisustvu oocista u fecesu, nije bilo pojave kliničkih simptoma kokcidioze. Klinički simptomi kod brojlera su bili izraženi na 8 farmi (8 odsto).

*Supklinička forma kokcidioze je sve više prisutna na farmama i izaziva velike ekonomske probleme zbog negativnog uticaja na prirast i iskoristivost hrane. Ona se smatra važnim činiocem u nastanku nekrotičnog enteritisa pilića, zato što stvara uslove za infekciju vrstom *Clostridium perfringens*, ali i za druge sekundarne infekcije. Jedan od glavnih faktora nastanka subkliničke kokcidioze je i rezistencija *Eimeria* prema kokcidiostaticima, koja često nastaje ukoliko se kokcidiostaticki programi (shuttle i program rotacije) ne sprovedu planski. Primena biosigurnosnih mera na farmama je jedan od bitnih preduslova za prevenciju pojave bolesti uopšte, a posebno kokcidioze. Pravilno upravljanje farmom i dobra organizacija proizvodnje imaju značajnu ulogu u sprečavanju pojave ili širenja kokcidioze, zbog toga što su oociste sveprisutne u prirodi i lako se mogu prenositi iz jedno objekta u drugi unutar iste farme. Potrebno je da se obra-*

¹Dr sci. vet. med. Marko Pajić, naučni saradnik; dr vet. Slobodan Knežević, istraživač saradnik; dr sci. vet. med. Dalibor Todorović, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: markopajic@niv.ns.ac.rs

ti velika pažnja na mere dezinfekcije nakon svakog proizvodnog ciklusa. Zbog visokog reproduktivnog potencijala Eimeria, vrlo je teško obezbediti ambijentalne uslove slobodne od kokcidija, posebno na savremenim farmama sa intenzivnim načinom uzgoja pilića.

Ovim istraživanjem je ustanovljeno da je supklinička kokcidioza prisutna na velikom broju farmi tovnih pilića i da predstavlja jedan od većih izazova za savremeno ži-vinarstvo. Kako bi se rizik od pojave ove bolesti smanjio, potrebno je biosigurnosne me-re na farmama održavati na visokom nivou, poboljšati pranje i dezinfekciju objekata, rotirati kokcidiostatike i menjati kokcidiostatske programe.

Ključne reči: *mere prevencije, oociste, supklinička kokcidioza, tovni pilići*

Zahvalnica:

Ovaj rad je rezultat istraživanja po Ugovoru sa Ministarstvom prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije o realizaciji i finansiranju naučnoistraži-vačkog rada NIV-NS u 2022. godini, broj 451-03-68/2022-14/200031.

ADENOKARCINOM MLEČNE ŽLEZDE MAČAKA – PRIKAZ SLUČAJA

*Ivan Galić¹, Jovan Spasojević¹, Tijana Kukurić¹, Tatjana Lazić²,
Ivan Stančić¹, Sandra Nikolić¹, Nadežda Tešin¹*

Kratak sadržaj

Mlečna žlezda je organ koji je često zahvaćen različitim patološkim procesima kod kućnih ljubimaca. Tumori koji nastaju od epitela mlečne žlezde kod mačaka, za razliku od pasa, u većini slučajeva su malignog karaktera. Adenokarcinom mlečne žlezde kod mačaka je izuzetno agresivan maligni tip tumora sa visokom stopom metastaza na regionalne limfne čvorove i pluća, pa je kao i u ovom slučaju potrebno izvršiti kompletnu kliničku i laboratorijsku dijagnostiku. Kod mačaka se adenokarcinom mlečne žlezde uglavnom dijagnostikuje kod starijih jedinki (10-12 godina), što se poklapa sa našim slučajem, ali mogu da obole i mlađe životinje, pa i mužjaci, kod kojih se adenokarcinom razvija iz tkiva rudimentiranih mlečnih žlezda. U zavisnosti od prognostičkog sistema koji se koristi, prosečno vreme preživljavanja (PVP) za tumor II stepena (koji je dijagnostikovao u ovom slučaju) je dvanaest meseci. U ovom radu su opisane preoperativna priprema, hirurška intervencija uklanjanja neoplastične mase, patohistološka dijagnostika i postoperativno radiografsko snimanje pacijenta sa adenokarcinomom mlečne žlezde.

Ključne reči: hirurgija, mačka, patohistološka dijagnostika, tumor

PRIKAZ SLUČAJA

Mačka je dovedena na fakultetsku veterinarsku kliniku, Departmana za veterinarsku medicinu, radi pregleda i mogućih terapijskih protokola zbog promena koje su se pojavile na abdomenu u predelu mlečne žlezde. Domaća mačka je bila starosti jedanaest godina, ženskog pola. Iz anamnestičkih podataka se saznaje da je ovariohisterektomija urađena u drugoj veterinarskoj ambulanti pre pola godine. Opštim kliničkim pregledom, tačnije metodama adspekcije i palpacije, dijagnostikovane su promene gornjih partija desne strane mamarnih kompleksa, koje ulceriraju. Ultrazvučni pregled je izveden pomoću ultrazvučnog aparata BPU60 Vet (BMV, Kina), korišćenjem mikrokonveksne sonde, frekvencije 8 MHz,

¹Dr vet. Ivan Galić, asistent; dr sci. vet. med. Jovan Spasojević, docent; dr vet. Tijana Kukurić, asistent; dr sci. vet. med. Ivan Stančić, redovni profesor; dr vet. Sandra Nikolić, asistent; dr vet. Nadežda Tešin, doktorand, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

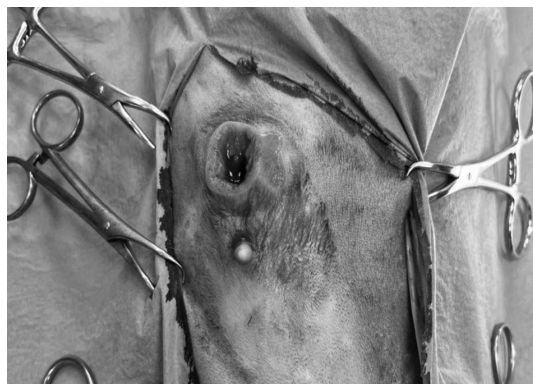
²Dr Tatjana Lazić, dijagnostički patolog, TL VetPath International Consultants, Hiawatha, SAD

*e-mail adresa autora za korespondenciju: ivangalicvet@gmail.com

u B modu. Ultrazvučnim pregledom ustanovljen je afektirani mamarni kompleks hipoehogenog parenhima, slabo diferenciranih margina, sa fokalnim anehogenim područjima (slika 1). Pacijentu je uzorkovana krv za hematološki i biohemijski pregled, koji je urađeni u fakultetskoj Laboratoriji za patološku fiziologiju. Hematološki i biohemijski parametri su bili u fiziološkim granicama i pacijentu je zakazana hirurška intervencija uklanjanja tumora mlečne žlezde. Hirurški zahvat je izveden u opštoj injekcionoj anesteziji, po svim načelima dobre veterinarske i hirurške prakse (slika 2).



Slika 1. Ultrazvučna dijagnostika promenjenog mamarnog kompleksa
(Asist. Sandra Nikolić, dr vet.)

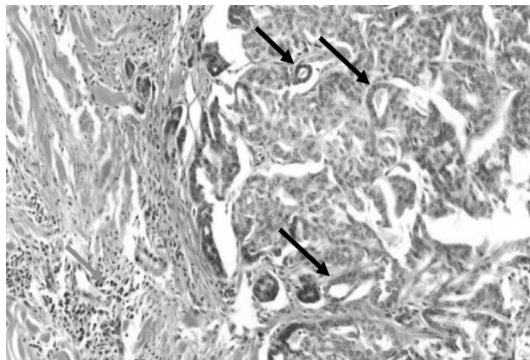


Slika 2. Priprema za hiruršku intervenciju uklanjanja tumorske mase
(Doc. dr sci vet. med Jovan Spasojević)

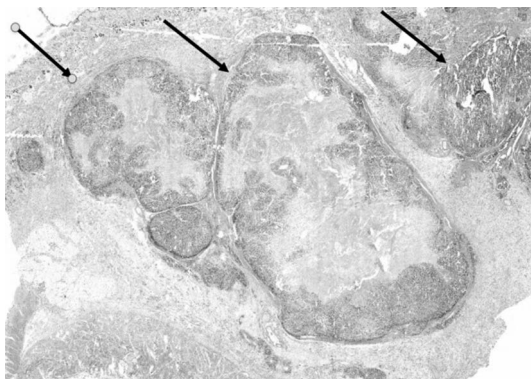
Sedacija pacijenta u okviru premedikacije opšte anestezije je izvedena pomoću ksilazina (Xylased, Bioveta, Češka Republika) u dozi od 2mg/kg telesne mase i.m. aplikacijom. Nakon premedikacije, pripremljeno je operaciono polje, tako da je dlačni pokrivač uklonjen sa abdomena. Koža je prvo oprana neutralnim sapunom, a zatim je izvršena dezinfekcija kože pomoću 70% rastvora etil alkohola i 10% rastvora povidon joda. Opšta injekciona anestezija je izvršena in-

travenskom aplikacijom ketamina (Ketamidol 10%, Richter pharma ag, Austrija) u dozi od 3,3 mg/kg telesne mase. Nakon inicijalnog reza kroz kožu, izvršeno je preparisanje potkožja. Prilikom odstranjivanja neoplastične mase pravljeni su margine u razmaku od 3 cm od ivica patološkog procesa, kako ne bi došlo do kontaminacije okolnog tkiva neoplastičnim ćelijama. Makroskopskim pregledom promenjenog tkiva je utvrđeno da je veći deo mamarnog kompleksa zahvaćen neoplastičnom promenom. Uočena je, slabo razgraničena i neinkapsulirana masa, nepravilno-ovalnog oblika, veličine 3,0 x 2,2 cm, sive do žute boje i čvrste konzistencije. Za podvezivanje krvnih sudova i odvajanje promenjenog mamarnog kompleksa od okolnog tkiva korišćen je resorptivni multifilamentni konac PGA, USP 2/0 (Yavo, Poljska). Šivenje potkožnog vezivnog tkiva izvršeno je resorptivnim monofilamentnim koncem MONOSORB, USP 2/0 (Yavo, Poljska), tekućim šavom, uz promenu hirurškog seta. Šivenje kože je izvršeno neresorptivnim monofilamentnim koncem NYLON, USP 2/0 (Yavo, Poljska) pojedinačnim čvorastim šavom.

Nakon odstranjivanja neoplastične mase, njena fiksacija je izvršena za 48h u 10% neutralnom formalinu i poslata na patohistološku analizu, koja je izvršena u privatnoj veterinarskoj laboratoriji VetLab. Nakon fiksacije, izvršeno je modeliranje tkiva i uklapanje tkiva u parafin. Tktivni isečci su sečeni na mikrotomu, debljine 5 µm, bojeni hematoksilinom i eozinom, a potom analizirani na mikroskopu. Na histološkom preparatu su uočene neoplastične ćelije organizovane u tubule ili razgranate trake, dalje organizovane u gnezda ili nodule varijabilnih veličina (slika 3.). Uočene neoplastične ćelije su bile su poligonalnog do okruglog oblika i sadržavale su veliku količinu eozinofilne ili vakuolirane citoplazme. Ćelijska jedra su bila ovalnog ili okruglog oblika sa po nekoliko uočljivih jedaraca. Stopa ćelijske i jedarne atipije je bila osrednja; stopa mitotske deobe osrednja (1 mitoza u 2 polja do 40x uveličanja). Gotovo 70% mase je bilo nekrotično, ali su uočena i polja inflamacije. Nije bilo invazije limfnih sudova (slika 4.). Na osnovu patohistološkog pregleda postavljena je dijagnoza: adenokarcinom mlečne žlezde mačaka, jednostavnog tipa, II stepena diferencijacije (gradus II).



Slika 3. Neoplastične ćelije su organizovane u tubule (crne strelice), razgranate trake ili nodule; u okolnom tkivu se uočava inflamatorni infiltrat (plava strelica), 20X
(Dr vet. Tatjana Lazić)



Slika 4. Subkutis sadrži multilobularnu, neoplastičnu masu (strelice), 2X
(Dr vet. Tatjana Lazić)

Nakon dobijanja patohistološkog nalaza i konačne diganoze, a zbog mogućih metastatskih promena, najčešće u grudnoj duplji, urađeno je i prvo postoperativno radiografsko snimanje grudnog koša, četrnaest dana nakon izvršene hirurške intervencije. Snimanje je urađeno u rendgenskom kabinetu fakulteta, u LL i VD projekciji (ZooMax Gold 5G0844, sistemom za obradu snimaka AGFA 9000HP rp 5810 RAID1pc i softerom DICOM viewer, NX model 3.0). Nalaz radiografskog snimanja je bio negativan, odnosno nisu uočene promene koje bi odgovarale senkama metastatskih promena na plućima.



Slika 5. LL projekcija grudnog koša
pacijenta
(Asist. Ivan Galić, dr vet.)



Slika 6. VD projekcija grudnog koša
pacijenta
(Asist. Ivan Galić, dr vet.)

DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Adenokarcinomi (*adenocarcinoma*) imaju oblik manjih ili većih čvorova, a kod pasa i mačaka se najčešće pojavljuju na mlečnoj žlezdi i često egzulceriraju

(Prašović at al., 2010; Giménez at al., 2010), što je potvrđeno i u našem slučaju. Karcinomi mamarne žlezde se kod mačaka često javljaju kao diskretni, opipljivi i pokretni tumori, ali 25 procenata mačaka sa ovakvom dijagnozom ima ulceracije sa ekstenzivnom nekrozom tumora (Novosad i sar., 2006; Carpenter, 1987), kakav je bio i u ovom prikazu slučaja. Adenokarcinom mamarne žlezde je relativno čest tumor mačaka i za razliku od pasa, tumori mlečne žlezde su kod 90 procenata mačaka malignog karaktera. Tačan uzrok nastanka nije poznat, mada se zna da su sijamske i kratkodlake mačke predisponirane na nastanak adenokarcinoma (Ito at al., 1996). Najčešće oboljevaju starije ženke i tumori se najčešće razvijaju kod ženki koje su stare između 10-12 godina). Ovo se podudara sa našim slučajem, mada se tumor može razviti i kod mlađih mačaka, a u retkim slučajevima i kod mužjaka (iz tkiva rudimentiranih mlečnih žlezda) (Moore i Ogilvie, 2001; Lana i sar., 2001; Johnston i sar., 2001). Za sada se zna da je ovariohistektomija preventivna metoda pomoću koje se smanjuje rizik od razvoja tumora mlečne žlezde (Overley at al., 2005). Mamarni adenokarcinom mačaka je izuzeteno agresivan tumor sa visokom stopom metastaze na regionalne limfne čvorove i pluća, dok drugi organi takođe mogu biti zahvaćeni. U zavisnosti od prognostičkog sistema koji se koristi, prosečno vreme preživljavanja (PVP) za tumor II stepena diferencijacije (gradus II), kakav je bio u ovom slučaju, to je 12 (Elston i Ellis, 1991) ili 14 meseci (Mills at al., 2015). Kod bilo kakvih promena na mlečnoj žlezdi mačaka potrebno je uraditi niz dijagnostičkih procedura, kako bi se došlo do konačne dijagnoze, idealnog terapijskog protokola, ali i do dalje prognoze koja čeka pacijenta nakon intervencije (Giménez at al., 2010; Moore i Ogilvie, 2001; Lana i sar., 2001; Johnston i sar., 2001).

Važna stavka kliničkog pregleda je i pregled mlečnih žlezda, pa tako i rano otkrivanje pacijenata sa dijagnozom neoplastičnih promena. Tumori mlečne žlezde kod kućnih ljubimaca pojavljuju se u sve većem procentu u kliničkoj praksi. Zbog mogućih različitih manifestacija i mogućih metastaza, potrebna je pravovremena dijagnostika, hirurška intervencija odstranjivanja, ali i ovariohistektomija. Patohistološka analiza promenjene mlečne žlezde je sigurna metoda za predviđanje daljeg ishoda bolesti i predstavlja zlatni standard u donošenju dijagnoze. Zbog toga je potrebno vlasnicima naglasiti njen značaj i uvek insistirati da ona bude deo dijagnostičke procedure nakon hirurške intervencije uklanjanja neoplastičnih masa kod kućnih ljubimaca.

LITERATURA

1. Carpenter J. 1987. Tumor and tumor-like lesions. In: Holzworth J, ed. Diseases of the cat: medicine and surgery. Philadelphia: WB Saunders, 406-596. 2. Elston C.W., Ellis I.O. 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19:403-10. 3. Giménez F., Hecht S., Craig L.E., Legendre A.M. 2010. Early detection, aggressive therapy: optimizing the management of feline mammary masses. *Journal of feline medicine and surgery*, 12(3):214-24. 4. Ito T., Kadosawa T., Mochizuki M., Matsunaga S., Nishimura R., Sasaki N. 1996. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats.

The Journal of Veterinary Medical Science, 58:723-6. **5.** Johnston S.D., Kustritz M.V.R., Olson P.N.S. 2001. Disorders of the mammary gland of the queen. In: Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS, eds. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: WB Saunders, 474-85. **6.** Lana S.E., Rutteman G.R., Withrow S.J. 2001. Tumors of the mammary gland. In: Withrow SJ, Vail DM, eds. Small animal clinical oncology. 4th ed. Canada: Saunders Elsevier, 628-36. **7.** Mills S.W., Musil K.M., Davies J.L., Hendrick S., Duncan C., Jackson M. L. et al. 2015. Prognostic value of histologic grading for feline mammary carcinoma: a retrospective survival analysis. *Veterinary Pathology*, 52(2):238- 249. **8.** Moore A.S., Ogilvie G.K. 2001. Mammary tumors. In: Stecher Y, ed. *Feline oncology*. 1st edn. United States: Veterinary Learning Systems, 355-67. **9.** Novosad C.A., Bergman P.J., O'Brien M.G., Maura G., McKnight J.A., Charney S.C. et al. 2006. Retrospective evaluation of adjunctive doxorubicin for the treatment of feline mammary gland adenocarcinoma: 67 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42:110-20. **10.** Overley B., Shofer F.S., Goldschmidt M.H., Sherer D., Sorenmo K.U. 2005. Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19:560-3. **11.** Prašović S., Kadrić M., Lalošević D., Beširović H., Alić A. 2010. Opšta veterinarska patologija. Veterinarski fakultet Sarajevo, 194-5.

TERMOGRAFIJA U DIJAGNOSTICI OBOLJENJA KONJA

**Tijana Kukurić, Mihajlo Erdeljan, Marko Cincović, Mira Majkić,
Ivan Galić, Jovan Stanojević**

Kratak sadržaj

Infracrvena termografija predstavlja dijagnostičku metodu snimanja temperaturnih oscilacija površine tela životinje, koje mogu ukazati na upalne, vaskularne ili neurološke poremećaje. Ova neinvazivna dijagnostička metoda, bazirana je na elektromagnetnom toplotom zračenju, koje se registruje pomoću termografske kamere i prikazuje u obliku mape distribucije toplote. Termografske kamere detektuju zračenje u dugom infracrvenom opsegu i proizvode slike zračenja, koje se nazivaju termogrami. Termokamera omogućava vizualizaciju i lokalizaciju dela tela sa povećanom toplotom, usled upale ili povrede, ili smanjenu proizvodnju toplote, kod redukovano protoka krvi ili vazomotornog tonusa. U dijagnostici oboljenja konja, od posebnog značaja su bolesti lokomotornog sistema. Laminitis, osteoartritis, dezmitis i tendinitis, frakture kostiju, zapaljenski procesi mišića i apscesi su neka od oboljenja koja se mogu uspešno registrovati ovom dijagnostičkom metodom. Takođe, ne treba zanemariti ni mogućnost dijagnostike oboljenja drugih organskih sistema. Pomenuta oboljenja mogu se otkriti i do 2 nedelje pre pojave kliničkih simptoma, što je od velikog značaja, posebno kada su u pitanju sportski i radni konji. Kako bi se eliminisale greške u interpretaciji, za procenu površinskih termičkih oscilacija, pravilna upotreba termokamere zahteva kontrolisane uslove okruženja i poštovanje protokola snimanja, Termografija ima važnu ulogu kao dopunska dijagnostička metoda, koja može ukazati na postojanje nekog procesa i usmeriti dijagnostički postupak ili terapiju. Pored toga, može se upotrebljavati i u svrhu praćenja napretka zarastanja i obnavljanja tkiva i praćenja ishoda terapije. Cilj ovog rada je upoznavanje sa osnovama upotrebe termografije u veterinarskoj medicini i njeno implementiranje u dijagnostici oboljenja konja.

Ključne reči: dijagnostika, konj, lokomotorni aparat, oboljenja, termografija

UVOD

Infracrvena termografija predstavlja dijagnostičku metodu snimanja temperaturnih oscilacija površine tela životinje, koje mogu ukazati na upalne, vaskularne ili neurološke poremećaje (Gerardi i sar, 2019). Ova neinvazivna dija-

¹Dr vet. Tijana Kukurić, asistent; dr sci. vet. med. Mihajlo Erdeljan, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Marko Cincović, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Mira Majkić, docent; dr vet. Ivan Galić, asistent; dr vet. Jovan Stanojević, asistent, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: tijana.kukuric@gmail.com

gnostička metoda, bazirana je na elektromagnetnom toplotom zračenju, koje se registruje pomoću termografske kamere i prikazuje u obliku mape distribucije toplote (Hall i sar., 2011). Termalne slike, odnosno termogrami, su grafički prikazi elektromagnetnog zračenja površine tela, koja se zatim pretvara u vidljivu sliku (Soroko i Kevin, 2016). Toplotna energija ili infracrveno zračenje, se sastoji od elektromagnetnih talasa, čija je dužina prevelika da bi bila detektovana od strane ljudskog oka. To je, u stvari, onaj deo elektromagnetnog spektra koji se manifestuje kao toplota. Termografska kamera detektuje infracrveno zračenje koje se spontano emituje, iz bilo kog objekta, temperature iznad apsolutne nule (-273,16°C) (Redaelli i sar., 2014). U svetu infracrvene energije, sva tela sa temperaturom iznad apsolutne nule, emituju toplotu; čak i tela koji imaju veoma nisku temperaturu, kao što su kocke leda. Što je temperatura tela viša, to je manja talasna dužina infracrvenog zračenja koje ono emituje (Gerardi i sar., 2019; Redaelli i sar., 2014).

Cilj ovog rada je upoznavanje sa osnovama upotrebe termografije u veterinarskoj medicini i njeno implementiranje u dijagnostici oboljenja konja.

UPOTREBA TERMOGRAFIJE U DIJAGNOSTICI OBOLJENJA KONJA

Termografija se sporadično korišćena u veterinarskoj medicini u proceni povreda mekog tkiva i površinskih lezija kostiju, kao dopunska metoda ultrazvučnim i radiografskim pregledima, još od 70-ih godina prošlog veka (Soroko i Kevin, 2016). Termokamera omogućava vizualizaciju i lokalizaciju dela tela sa povećanom toplotom, usled upale ili povrede, ili smanjenu proizvodnju toplote, kod redukovano protoka krvi ili vazomotornog tonusa (Purohit, 2008). U dijagnostici oboljenja konja, od posebnog značaja su bolesti lokomotornog sistema. Laminitis, osteoartritis, dezmiti i tendiniti, frakture kostiju, zapaljenski procesi mišića i apscesi su neka od oboljenja koja se uspešno mogu registrovati ovom dijagnostičkom metodom. Takođe, ne treba zanemariti ni mogućnost dijagnostike oboljenja drugih organskih sistema (Soroko i Davies Morel, 2016). Termografija se u dijagnostici oboljenja konja može koristiti na tri načina: kao fiziološka, klinička i preventivna dijagnostička metoda (Yanmaz i sar., 2007). Tokom procesa zarastanja, termografijom se može kvantifikovati regresija upale i pratiti efikasnost antiinflamatornih lekova (Purohit, 2008). Takođe, korist od termografije se ogleda i u evaluaciji dobrobiti i akutnog stresa kod sportskih i trkačkih konja i proceni performansi tokom vežbi, treninga i takmičenja, u specifičnim uslovima sredine (Hall i sar., 2011). Termografija je ujedno korisna i kao potencijalni metod skrininga za otkrivanje nezakonitih metoda, koje se koriste uoči takmičenja, radi prikrivanja bolnosti i poboljšanja performansi, kao što je primena topikalnih tretmana hlađenja, upotrebe biomagneta, infiltracije povređenog područja snažnim analgeticima ili palmarne digitalne neurektomije (Soroko i Davies Morel, 2016; Čebulj Kadunc i sar., 2020).

Uprkos mnogim prednostima, termografija nije postala rutinska metoda u svakodnevnoj praksi dijagnostike oboljenja konja. Treba i da budemo svesni nje-

nih nedostataka, koji se odnose na manjak specifičnosti kao dijagnostičke metode i nemogućnost otkrivanja etiologije patoloških promena (Soroko i sar., 2018). Prema tome, termografija ima važnu ulogu kao dopunska dijagnostička metoda, koja može ukazati na postojanje nekog procesa i usmeriti dijagnostički postupak ili terapiju.

PRINCIPI TERMOGRAFIJE

Telo konstatno produkuje toplotu, koju emituje putem kože, procesima radijacije, konvekcije, kondukcije ili evaporacije. Temperatura tela je obično za 5 °C viša od temperature kože, a izvori temperature koju registrujemo termokamerom su lokalni metabolizam tkiva i cirkulacija (Yanmaz i sar., 2007). Uočavanjem lokalizacije mesta sa povećanom temperaturom, moguće je otkriti inflamatorni proces, čak i pre njegovih kliničkih manifestacija. Kako bi relevantnost termokamere bila što veća, potrebno je obratiti pažnju na kretanje životinje, odnosno na imobilizacija (Čebulj Kadunc i sar., 2020) i izbegavati kontakt sa hemijskim agensima, koji bi mogli uticati na perifernu cirkulaciju. Snimanje treba izvršiti na mestu gde nema direktne izloženosti sunčevim zracima i uz idealne ambijentalne temperature od 17 °C, sa prihvatljivom gornjom granicom do 30 °C. Potrebno je smanjiti mogućnost artefakata, očistiti regiju koja se snima, skinuti metalne i druge predmete, a snimanje izvršiti iz više uglova (Satchell i sar., 2015).

SPECIFIČNA PRIMENA TERMOKAMERE KOD KONJA

Kopita: Termokamerom je moguće uvrđiti različita patološka stanja na kopitu, kao što su laminitis, navikularni sindrom, apscesi, žuljevi i drugi upalni procesi. Definitivna dijagnoza se ne postavlja uz pomoć termografije, ali ona može dati korisne informacije o lokalizaciji procesa, stepenu zapaljenja i izbora najbolje terapije i pre ispoljavanja kliničkih simptoma (Cetinka i Demirutku, 2012).

Zglobovi: Zapaljenski procesi zglobova su dobro uočljivi termokamerom, a najbolje se vide iz dorzalnog aspekta. Cirkulatorna regija povećane temperature se može potvrditi poređenjem sa drugim zglobovima, koji nisu pod inflamacijom. S obzirom da se promene mogu uočiti i do 2 nedelje pre kliničkih manifestacija, poseban značaj postoji u prevenciji sportskih povreda (Yanmaz i sar., 2007).

Tetive i ligamenti: Normalne fleksorne tetive se uočavaju bilaterano simetrično. Palmarno se registruje niža temperatura, dok je periferno temperatura tetiva za 1 °C viša od okolnog tkiva. Ukoliko je tetiva inflamirana, uočiće se lokalizovano područje povećane temperature, što je takođe slučaj kada su u pitanju povrede ligamenata. Promene se mogu uočiti i do 2 nedelje pre kliničke manifestacije, a shodno tome, trening se može prilagoditi, kako bi se izbegle povrede (Soroko i sar., 2018).

Mišići: Zapaljenski procesi mišića su praćeni pojavom edema, što ometa cirkulaciju, tako da se upala mišića može registrovati termokamerom i kao polje

smanjene, ali i povećane lokalne temperature. Iz tog razloga, potrebno je uporediti mišiće sa obe strane tela (Yanmaz i sar., 2007).

Kosti: Dijagnostika oboljenja kostiju, koje su prekrivene teškim, jakim mišićima je teško moguća. Neophodno je da kost bude što bliže, uz kožu, kako bi termokamera mogla da registruje promene u temperaturi, koje se odnose na posmatranu kost (Soroko i sar., 2018). U ovom slučaju termografija ima najveću primenu u vezi sa dorzalnom metakarpalnom bolesti, što je čest uzrok hromosti kod sportskih konja. Snimanje i registrovanje promena na pršljenovima, kao što su luksacije, sublüksacije i frakture, moguće je registrovati termografijom samo u vidu povećane ili smanjene lokalne temperature. S obzirom na poteškoće sa radiografijom ove regije kod konja, velika prednost daje se termografiji (Soroko i Kevin, 2016).

ZAKLJUČAK

Upotrebom sofisticirane tehnologije, moguće je unaprediti kvalitet dijagnostike u veterinarskoj medicini. S obzirom da je ovde reč o neinvazivnoj metodi, koja može detektovati brojna patološka stanja i to 2 nedelje uoči pojave vidljivih simptoma, može se reći da je upotreba termokamere u dijagnostici oboljenja konja od velikog značaja.

LITERATURA

1. Cetinka M.A, Demirutku A. 2012. Thermography in the assessment of equine lameness. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36(1): 43-48. doi:10.3906/vet-1102-791
2. Čebulj Kadunc N., Frangež R., Kruljč P. 2020. Infrared Thermography in Equine Practice. *Veterinarska stanica.* 51 (2), <https://doi.org/10.46419/vs.51.2.1>
3. Gerardi B., Denadai D., Pereira M., Chaves A., Barbosa J., Peiró J. et al. 2019. Use of infrared thermography in Quarter Horse submitted to team roping. *Animal Morphology, Pesq. Vet. Bras.* 39 (07) <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5790>
4. Hall C., Burton K., Maycock E., Wragg E. 2011. A preliminary study into the use of infrared thermography as a means of assessing the horse's response to different training methods. 6(5), 291-292. doi:10.1016/j.jveb.2011.05.005
5. Purohit R.C. 2008. Use of thermography in veterinary medicine. In: Cohen JM, Lee M, editors. *Rehabilitation medicine and thermography.* Morrisville: In press Publication; 135-47.
6. Redaelli V., Bergero D., Zucca E., Ferrucci F., Costa L., Nanni C., Lorenzo L.F. 2014. Use of Thermography Techniques in Equines: Principles and Applications. *Journal of Equine Veterinary Science,* 34(3), 345-350. doi:10.1016/j.jevs.2013.07.007
7. Satchell G., McGrath M., Dixon J., Pfau T., Weller R. 2015. Effects of Time of Day, Ambient Temperature and Relative Humidity on the Repeatability of Infrared Thermographic Imaging in Horses. *Equine Veterinary Journal,* 47, 13-14. doi:10.1111/evj.12486
8. Soroko M., Cwynar P., Howel K., Yarnell K., Dudek K., Zaborski D. 2018. Assessment of Saddle Fit in Racehorses Using Infrared Thermography. *Journal of Equine Vet Science.* 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.01.006>
9. Soroko M., Davies Morel M. 2016. Equine thermography in practice. Replika Press PVT Ltd, Sonipat, India.
10. Soroko M., Howell K. 2016. Infrared Thermography: Current Applications in Equine Medicine. *Journal of Equine Veterinary Science.* S073708061630449X doi:10.1016/j.jevs.2016.11.002

GRIP I ZONOTSKE BOLESTI U HUMANOJ I VETERINARSKOJ MEDICINI U REPUBLICI SRBIJI

Dragana Dimitrijević¹, Verica Jovanović¹, Boban Đurić²

Kratak sadržaj

Virus gripa je virus sa najvećim pandemijskim potencijalom. Jedna od osnovnih karakteristika virusa gripa je njegova promenljivost i nepredvidljivost, pa samim tim i stalna opasnost od epidemija velikih razmera i pandemija. U poslednje vreme, zoonoze zbog izražene globalizacije i potencijala za širenje, kao i klimatskih promena, dobijaju sve veći javno zdravstveni značaj.

Cilj rada je da se istakne značaj humane i veterinarske medicine kroz analizu epidemiološke situacije gripa i zoonoza u Srbiji u 2021. godini. Za izvor podataka su korišćeni mesečni izveštaji o kretanju zaraznih bolesti, 24 zavoda/instituta za javno zdravlje sa teritorija nadležnosti kao i informacija o aktuelnoj epidemiološkoj situaciji groznice Zapadnog Nila u 2021. godini. Za analizu podataka je korišćena deskriptivna metoda.

U 2021. godini, ukupan broj registrovanih slučajeva oboljevanja od zoonoza, u skladu sa Pravilnikom o načinu praćenja zoonoza i uzročnika zoonoza ("Sl. glasnik RS", br. 76/2017) iznosio je 31, što predstavlja nešto veći broj prijavljenih bolesti, zbog registrovanih potvrđenih slučajeva oboljevanja od groznice Zapadnog Nila. Prijavljena su tri smrtna ishoda, koja se mogu dovesti u vezu sa oboljevanjem od zoonoza. U 2021. godini, u veterinarskoj medicini registrovani su A (H5N8), A (H5N1), A (H5N2). Nije registrovan nijedan slučaj ptičijeg gripa u humanoj medicini.

U 2021. godini, ukupan broj registrovanih slučajeva oboljevanja od zoonoza, u skladu sa Pravilnikom i zoonoza u širem smislu je iznosio 1122, što predstavlja mali broj prijavljenih bolesti. Prijavljen je jedan smrtni ishod, koji se može dovesti u vezu sa oboljevanjem od zoonoze.

U 2021. godini, registrovano je 6 epidemija, u kojima je obolelo 58 osoba. Prijavljeno je 5 epidemija salmoneloze i jedna epidemija kampilobakterioze.

Integrišući sistemi za nadzor u humanoj i veterinarskoj medicini, odnosno u sektorima za zaštitu zdravlja životinja i javnog zdravlja sa utemeljenjem u legislativi, unapređenje nadzora nad zoonozama, jačanje laboratorijskih kapaciteta, obzirom na značajnu podregistraciju, su prioritetne aktivnosti, posebno u svetlu aktuelne pandemije.

Ključne reči: *grip, humana i veterinarska medicina, Republika Srbija, zoonoze*

¹Dr med. Dragana Dimitrijević; dr med. Verica Jovanović, Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut", Beograd, R. Srbija

²Spec. dr vet. Boban Đurić, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za veterinu, Beograd, R. Srbija

e-mail autora za korespondenciju: dragana_dimitrijevic@batut.org.rs. Srbija

INFLUENZA AND ZOOSES IN HUMAN AND VETERINARY MEDICINE IN THE REPUBLIC OF SERBIA

Dragana Dimitrijević, Verica Jovanović, Boban Đurić

Summary

Influenza virus is the virus with the greatest pandemic potential. One of the basic characteristics of the flu virus is its variability and unpredictability, and thus the constant danger of large-scale epidemics and pandemics. Zoonoses in recent years assuming an increasing public health importance due to the extreme globalization and the potential for expansion as well as climate change

The objective of this work was to underline the importance of human and veterinary medicine through the analysis of the epidemiological situation of influenza and zoonoses in Serbia in 2021. For the analysis, a descriptive method was used. Data source: Monthly reports on Communicable Diseases of 24 Institutes of Public Health in Serbia.

A total of 31 human cases of zoonotic diseases were reported in 2021 in accordance with Rulebook on monitoring of zoonoses and zoonotic agents (Official Gazette of RS, No. 76/2017) which represents a slightly higher number of reported diseases, due to registered confirmed cases of West Nile fever. There were three death associated to zoonotic diseases. In 2021, in veterinary medicine A (H5N8), A(H5N1), A(H5N2) were registered. No one case in human medicine was registered.

In 2021, the total number of registered cases of zoonotic disease in accordance with the Rulebook and zoonoses in the wider sense was 1122, which represents a small number of reported diseases. Also, there were one death associated to zoonotic diseases.

During 2021, 6 outbreaks of zoonotic diseases in Serbia were reported, with a total of 58 cases: 6 outbreaks of Salmonellosis and one outbreak of Campylobacteriosis.

Integrating surveillance systems in the human and veterinary medicine, i.e. in animal health and public health sectors with legislative basis, improvement of zoonotic surveillance, strengthening of laboratory capacities, since there is a significant sub registration are priority activities, especially in light of the current pandemic.

Keywords: human and veterinary medicine, influenza, Republic of Serbia, zoonoses

DEFICIT VITAMINA B12 (KOBALAMINA) KOD PASA

**Božo Eškić, Marko R. Cincović, Nikolina Novakov,
Sandra Nikolić, Mira Majkić**

Kratak sadržaj

Kod pasa i mačaka, najčešći uzroci nedostatka kobalamina su hronične i teške bolesti tankog creva i insuficijencije egzokrinog pankreasa (EPI). Pored toga, kod različitih rasa pasa je opisan nasledni nedostatak kobalamina. Nađeno je da preko 80 procenata pasa sa EPI ima nedostatak kobalamina, a takođe i nešto viši procenat mačaka. Nedostatak proteaza pankreasa i promena mikrobiote tankog creva takođe mogu igrati ulogu, ali izgleda da su manje važni od nedostatka unutrašnjeg faktora. Nedostatak kobalamina se primećuje kod nekoliko bolesti, uključujući: inflamatornu bolest creva, gastrointestinalni limfom, crevnu disbiozu, egzokrinu insuficijenciju pankreasa, sindrom kratkog creva, pankreatitis, kao i kod gastrinoma. Ovo može uticati i na gastričnu i pankreasnu sekreciju intrinzičnog faktora. Psi sa teškom i dugotrajnom bolešću tankog creva koja uključuje ileum takođe mogu imati nedostatak kobalamina. Neke infekcije, kao što je đardijaza mogu značajno uticati na razvoj deficita. Nasledni nedostatak kobalamina zabeležen je kod nekoliko rasa pasa, uključujući: velikog šnaucera, bigla, border kolija, australijskog ovčara i kineskog šarpeja. Identifikovan je region na hromozomu 13 koji je u vezi sa nedostatkom kobalamina kod kineskog šarpeja. Kod pasa, urođeni nedostatak kobalamina može dovesti do kliničkih abnormalnosti uključujući loš razvoj, slabljenje telesne kondicije, kaheksiju, letargiju, slabost, anoreksiju, dijareje, povraćanja, disfagije, oralne ulceracije, hematopoetske abnormalnosti (neregenerativne anemije, neutropenija) i proteinuriju. Simptomi se mogu pojaviti već u dobi od 6 do 12 nedelja, a slučajevi se klinički identifikuju kod pacijenata do 3-4 godine. Kod stečenih bolesti, većina pasa i mačaka sa nedostatkom kobalamina, ispoljava samo kliničke znake gastrointestinalne bolesti, što može biti ili uzrok ili posledica nedostatka kobalamina, a opisani su slučajevi hiperamoniemijske encefalopatije, gubitak težine, letargija, povremeno povraćanje, napadi, anemija i leukopenija.

Kobalt je esencijalni sastojak vitamina B12. Njega sintetišu mikroorganizmi u digestivnom traktu životinja i neophodan je unos dovoljne količine kobalta. U želucu se vitamin B12 vezuje za protein R, da bi se pod dejstvom tripsina ovaj kompleks razgradio u duodenumu. Kod insuficijencije pankreasa dolazi do nedovoljnog stvaranja tripsina pa samim tim opada i resorpcija vitamina B12, što rezultira deficijencijom ovog vita-

¹ Dr vet. Božo Eškić, doktorand; dr sci. vet. med. Marko Cincović, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Nikolina Novakov, vanredni profesor; dr vet. Sandra Nikolić, asistent; dr sci. vet. med. Mira Majkić, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sar, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: mcincovic@gmail.com

mina. Poremećaj bilansa kobalta i vitamina B12 se pre svega ogledaju u promenama na eritrocitima. Višak kobalta dovodi do inhibicije enzima iz grupa citohrom oksidaza i sukcinat dehidrogenaza što za posledicu ima policitemiju. Deficit kobalta dovodi do nastanka megaloblastne anemije. Zbog učešća vitamina B12 u Krebsovom ciklusu u procesu resinteze glukoze, deficit može da se ogleda i u smanjenom apetitu i nastanku masne jetre.

Zbog svega navedenog, potrebno je u biohemijske analize uvrstiti određivanje koncentracije vitamina B12 kod pasa sa gastrointestinalnim problemima.

Ključne reči: deficit, gastroenteropatije, klinička patologija, kobalamin, psi

RADIONICE
WORKSHOPS

METODE PREGLEDA MESA NA TRIHINELE U SKLADU SA NOVIM PROPISIMA

Dragan Vasilev¹, Tamara Bošković², Nevena Grković¹, Branko Suvajdžić¹

Kratak sadržaj

Novi propis u Republici Srbiji kojim se reguliše način vršenja službene kontrole životinja pre i posle njihovog klanja na prisustvo trihinele u mesu (Službeni glasnik RS, 48/2022) u potpunosti je usklađen sa Uredbom komisije Evropske unije o utvrđivanju posebnih pravila službene kontrole trihinele u mesu (EU br. 1375/2015), izuzev postupaka osposobljavanja mesa zamrzavanjem. Po prvi put se uvodi mogućnost da farme nakon ispunjenja propisanih uslova dobiju status „slobodno od trihinele“, pri čemu se prilikom klanja tovnih svinja sa tih farmi, za pregled mesa na trihinele uzorkuje najmanje 10 procenata životinja. Ove farme podležu stalnom monitoringu, a u slučaju nalaza trhinele gube navedeni status. Pregled mesa na trihinele obavlja se u službenim laboratorijama koje su akreditovane u skladu sa standardom ISO/IEC 17025, pri čemu ne moraju biti akreditovane veterinarske ambulante, stanice, klinike i laboratorije u objektima za klanje, ukoliko je jedina aktivnost laboratorije ispitivanje mesa na trihinele, uz uslov da raspoložu kvalifikovanim osobljem koje ima zadovoljavajuće rezultate u međulaboratorijskom ispitivanju koje organizuje nacionalna referentna laboratorija za trihinelu, i da su upisane u „Registar laboratorije koja vrši ispitivanje na prisustvo *Trichinella* spp. u mesu“. Ispitivanje mesa trihinoskopskom metodom je i dalje u primeni, a vrši se samo kod odstupanja koja se odnose na male subjekte u poslovanju hranom i uključuje pripremu i pregled 56 isečaka (po 28 na dva kompresorijuma) čime se pregleda najmanje 1 g uzorka. Referentna metoda ispitivanja mesa na prisustvo trihinele je „Veštačka digestija zbirnih uzoraka pomoću magnetne mešalice“, a pored ove metode, predviđena je i mogućnost upotrebe ekvivalentnih metoda kao što su „Metoda pomoću mehaničke digestije zbirnog uzorka – tehnika sedimentacije“, „Metoda pomoću mehaničke veštačke digestije zbirnog uzorka – tehnika izdvajanja na filteru“, „Metoda automatske veštačke digestije zbirnih uzoraka težine do 35g“, kao i test veštačke digestije pomoću PrioCHECK® *Trichinella* AAD kita.

Ključne reči: pregled mesa, propisi, *Trichinella*, trihinoskopija, veštačka digestija

¹Dr sci. vet. med. Dragan Vasilev, redovni profesor, dr sci. vet. med. Nevena Grković, docent; dr sci. vet. med. Branko Suvajdžić, docent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija.

²Spec. dr vet. Tamara Bošković, Načelnik odeljenja za veterinarsko javno zdravstvo, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, Uprava za veterinu, Beograd, R. Srbija.

*e-mail adresa autora za korespondenciju: vasilevd#@et.bg.ac.rs

Prikaz slučaja (aktivnost 1)

U uvodnom delu, radionica će obuhvatiti upoznavanje sa propisom koji reguliše način vršenja službene kontrole životinja pre i posle njihovog klanja na prisustvo trihinele u mesu (Službeni glasnik RS, 48/2022) i postupkom upisa veterinarskih ambulanti, stanica, klinika i laboratorija u objektima za klanje u "Registar laboratorije koja vrši ispitivanje na prisustvo *Trichinella* spp. u mesu". Isto tako, biće predstavljene sve ekvivalentne metode pregleda mesa na trihinelu u skladu sa ovim propisom.

Praktični rad (aktivnost 2)

Tokom praktičnog dela radionice polaznici će uporedno ispitati uzorke mesa referentnom metodom veštačke digestije zbirnih uzoraka pomoću magnetne mešalice i ekvivalentnom metodom veštačke digestije pomoću PrioCHECK® Trichinella AAD kita. U poređenju sa referentnom metodom, kao i ostalim ekvivalentnim metodama veštačke digestije, kod metode pomoću PrioCHECK® Trichinella AAD kita ne koriste se hlorovodonična kiselina i pepsin, već se veštačka digestija odvija pomoću enzima serin-endopeptidaze. Praktični rad će biti organizovan u grupama od po 10 polaznika, a broj grupa će zavisiti od broja prijavljenih polaznika.

Interaktivna učionica (aktivnost 3)

Nakon završenog postupka veštačke digestije pomoću navedenih metoda, razmatraće se dobijeni rezultati, izvršiti poređenje referentne i ekvivalentne metode u pogledu postupka izvođenja, sagledavanja kritičnih tačaka u toku rada, kao i izgleda larvica trihinele dobijenih ovim metodama.

Ostali relevantni podaci

Očekivani broj učesnika: minimalno 10, maksimalno 40 (četiri grupe po deset polaznika). Broj nastavnika koji će učestvovati u izvođenju radionice: prof. dr Dragan Vasilev (koordinator i predavač, grupa 1: od 1. do 10. slušaoca), spec. dr vet. Tamara Bošković (predavač, grupa 2: od 11. do 20. slušaoca), doc. dr Nevena Grković (grupa 3: od 21 do 30. slušaoca), doc. dr Branko Suvajdžić (grupa 4: od 31. do 40. slušaoca).

Faza i mesto realizacije

Aktivnost 1 – realizuju prof. dr Dragan Vasilev i spec. dr. vet. Tamara Bošković, upoznaju kandidate sa novom zakonskom regulativom i metodama (referentnom i ekvivalentnim) za ispitivanje mesa na trihinele. Aktivnost 2 i 3 - prof. dr Dragan Vasilev, spec. dr. vet. Tamara Bošković, doc. dr Nevena Grković, doc. dr Branko Suvajdžić, u sali koja će za ovu radionicu biti dodeljena od strane organizatora.

PRAKTIČNO SPROVOĐENJE BIOSIGURNOSNIH MERA – DEZINFEKCIJA, NA FARMAMA

Radislava Teodorović, Ljiljana Janković

Kratak sadržaj

Postupak kojim se deluje na mikroorganizme, sa ciljem uništavanja određenih mikroorganizama, ili onih mikroorganizama na koje to dezinfekciono sredstvo deluje, naziva se dezinfekcija. Uspех izvedene dezinfekcije zavisi od pravilno sprovedenih faza dezinfekcije: mehaničko čišćenje, sanitarno pranje, dezinfekcija u užem smislu, kontrola izvršene dezinfekcije, ispiranje dezinfikovanih površina, kao i kontrola dezinfikovanih površina posle ispiranja. Samo pod uslovom da su pravilno sprovedene navedene faze dezinfekcije, može se očekivati efekat primenjenog dezinfekcionog sredstva. Po završenom mehaničkom čišćenju, pristupa se sanitarnom pranju kojim se uklanja ostatak nečistoća. Infektivni materijal može često da prodre duboko u različite predmete i na površine, odnosno može da bude prekriven raznom nečistoćom, naročito organskog porekla, u kojoj se nalazi veliki broj mikroorganizama. Primena bilo kakvog hemijskog dezinfekcionog sredstva na takvom mestu teško može dovesti do nekog rezultata, zato što dezinficijens, neće prodreti do samog mikroorganizama. Na taj način, dezinficijens gubi veliki deo svoje dezinfekcione sposobnosti, odnosno do mikroorganizma dopire samo njegov neznatni deo. Zato odstranjivanje nečistoća sa površina koje se dezinfikuju predstavlja važnu meru i uslov za uspešnu dezinfekciju. Kada je reč o prevoznim sredstvima, kojima se prevoze životinje, ona se moraju mehanički očistiti i izvršiti temeljno sanitarno pranje, a zatim dezinfikovati. Vozilo koje ulazi na farmu mora imati potvrdu o obavljenoj dezinfekciji od ovlašćene veterinarske organizacije i ukoliko stanje vozila odgovara potvrdi o obavljenoj dezinfekciji, dozvoljava se ulazak vozila na farmu. U praktičnoj svakodnevnoj dezinfekciji najviše se koriste hemijska dezinfekciona sredstva. Među njima postoji veliki broj preparata, čija se primena preporučuje za određene vidove dezinfekcije.

Ključne reči: biosigurnosne mere, dezinfekcija, farma

¹Dr sci. vet. med. Radislava Teodorović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Ljiljana Janković, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: rada@vet.bg.ac.rs

DEZINFEKCIJA ZARAŽENIH OBJEKATA, OPREME I VOZILA

Opšti principi

Suzbijanje zaraznih bolesti obuhvata dezinfekciju objekata, opreme, vozila i drugih kontaminiranih materijala. Dezinfekcija objekata je interna biosigurnosna mera koja se sprovodi nakon mehaničkog čišćenja i sanitarnog pranja. Mehaničko čišćenje ima za cilj da se sa podova objekta i drugih površina ukloni sva vidljiva nečistoća koju najčešće čine fekalni otpad i ostaci hrane. Sakupljeno đubre se odvozi na određeno mesto (50 metara udaljeno od farmskog objekta) i skladišti. Mehaničkim čišćenjem se može ukloniti i do 50 procenata mikroorganizama sa poda objekta. Osoblje koje je angažovano na ovim poslovima mora se strogo pridržavati procedura, nositi zaštitnu opremu i svoj kontakt sa kontaminiranim materijalima treba da svede na minimum. Dezinfekciju bi trebalo organizovati i sprovesti u kombinaciji sa temeljnim mehaničkim čišćenjem i pranjem, pri čemu se uvek moramo pridržavati opštih principa zaštite zdravlja ljudi, koji su angažovani na ovim poslovima. Pri rukovanju opasnim sredstvima, mora se biti veoma oprezan. Dezinfekciju objekata, kao i neškodljivo uklanjanje leševa obavljaju specijalizovane ekipe veterinarskih stanica, veterinarskih instituta i drugih organizacija ovlašćenih za obavljanje DDD poslova (dezinfekcije, dezinfekcije, deratizacije) angažovanih od strane Ministarstva. Na ovim poslovima im pružaju pomoć komunalne službe lokalne samouprave i lokalni štabovi civilne zaštite, Lica koja su angažovana na poslovima dezinfekcije moraju biti kvalifikovana za ove poslove i adekvatno opremljena zaštitnom odećom i opremom u koju spadaju: zaštitna odela, gumene čizme kape, naočare, rukavice i maske.

Kod dezinfekcije se treba strogo pridržavati i sledećih opštih principa:

- pranje i čišćenje sprovoditi detaljno uz upotrebu četki pri čemu bi trebalo temeljno četkati podove, zidove i plafone. Svi delovi objekta, gde su prolazile životinje, vozila ili ljudi, koji su radili sa bolesnim životinjama, moraju biti dezinfikovani;
- za dezinfekciju koristiti ona sredstva koja su registrovana u zemlji i koja provereno deluju na uzročnika bolesti. Mora se voditi računa da, dezinfekciono sredstvo ne oštećuje, opremu i površine koje se dezinfikuju;
- pridržavati se uputstava proizvođača, najbitnije u onom delu koji propisuje vreme ekspozicije odnosno vreme delovanja samog dezinficijensa;
- koristiti ispravne prskalice, koje proizvode veliku maglu;
- po završetku dezinfekcije obavezno izdati potvrdu o izvršenoj dezinfekciji, kako za vozila tako i za sam objekat;
- sam postupak dezinfekcije objekta, opreme i vozila mora se obavljati pod neposrednim inspekcijskim nadzorom Republičke veterinarske inspekcije.

DEZINFEKCIJA OBJEKTA U KOJIMA SU BORAVILE BOLESNE ŽIVOTINJE

Sve površine unutar objekta, uključujući opremu i ubijene životinje treba isprskati rastvorom dezinficijensa u količini od 1 l/m².

Sredstvo izbora za ovu namenu je 2% rastvor NaOH. Ostaviti da dezinficijens deluje narednih 30 minuta. Kada istekne ovo vreme, započeti iznošenje leševa. U slučaju da su životinje ubijene izvan objekta, objekat isprskati rastvorom 2% NaOH, a životinje prskati po završetku postupka ubijanja i transportovati do mesta neškodljivog uklanjanja. Nakon završetka ubijanja životinja i iznošenja leševa iz objekata, pristupa se detaljnom mehaničkom čišćenju objekta, a potom i pranju.

Cilj ovog postupka je uklanjanje grubih nečistoća i omogućavanje što boljeg kontakta površina, koje se dezinfikuju i radnog dezinfekcionog rastvora. Osim toga, organske materije na sebe vezuju virusne partikule i smanjuju efekat dezinfekcije zato što dezinficijens teže dopire do uzročnika bolesti. Zbog toga se mora sprovesti čišćenje i pranje zidova, plafona i podova u cilju što potpunijeg skidanja organske materije. Za pranje se može koristiti voda pod pritiskom kojoj su dodata sredstva za odmašćivanje. Za odmašćivanje se može koristiti 3% topli rastvor (55 °C) NaCO₃ kome je dodato 0,3% natrijum meta silikata i uz upotrebu pritiska od 80-100 bara. Metalna oprema, kao što su kavezi, može se dekontaminirati termičkim tretmanom, tj. upotrebom plamena. Sva oprema unutar objekata kao što su: pojilice, hranilice, elevatori i transporteri hrane, mora se oprati i tretirati dezinficijensom najmanje 24 časa. Najbolje je ovu opremu prvo rastaviti pa onda oprati i dezinfikovati. Kod čišćenja svih površina, odnosno suvog materijala, potrebno je da se prethodno oni navlaže vodom ili dezinficijensom. To je potrebno zbog toga da se prilikom čišćenja ne bi dizala prašina, a sa njom i mikroorganizmi koji mogu kontaminirati druge površine ili aerogenim putem inficirati osoblje koje sprovodi čišćenje. Ni posle temeljnog mehaničkog čišćenja, ne može se reći da je odstranjena sva nečistoća koja bi smetala delovanju dezinfekcionog sredstva. Zbog toga je kao drugu etapu nakon mehaničkog čišćenja potrebno sprovesti sanitarno pranje. Ovim postupkom se skida preostala nečistoća, a sa njom i znatne količine mikroorganizama. Posle sprovođenja postupka uklanjanja grube nečistoće, pranja objekta i opreme pristupa se dezinfekciji objekta i opreme. Dezinficijens je potrebno nanositi ravnomerno i temeljno na sve površine: zidove, podove, plafone, spoljašnje površine zidova i pri tom voditi računa o količini nanetog dezinfekcionog sredstva, koncentraciji i ekspoziciji.

Postupak nanošenja dezinficijensa ponoviti nakon 24 časa. U objektima, kod kojih su podovi napravljeni od vodonepropusnih materijala, kao što su beton, cigla, asfalt ili drugi materijali, 2% rastvor NaOH nanositi u količini od 0,7 l/m². Na vodopropusne površine, kao što su zemljani podovi, ako su nabijeni, nanositi rastvor u količini od 1 l/m², a na nenabijene zemljane podove u količini od 1,5 l/m². Rezervoari za vodu se takođe moraju isprazniti, oprati i dezinfikovati.

Tornjevi i silosi za hranu moraju se isprazniti, oprati toplom vodom pod pritiskom i na kraju fumigirati.

Dezinfekciona barijera je jedna od veoma važnih mera spoljašnje zaštite objekta. Dezbarijera bi trebalo da bude široka, tako da u potpunosti pokriva širinu ulaza za zaposlena lica i širinu ulaza za transportna sredstva. Na ulazu i izlazu iz dezbarijere mora da postoji kosina kako bi vozila lako prolazila. Točkovi transportnih sredstava moraju tokom prolaska kroz dezbarijeru, tj. dezinfekciono sredstvo, najmanje jednom da se okrenu u punom krugu. Efikasan je i niz raspršivača koji se postavljaju poprečno preko saobraćajnica tako da se točkovi, donji deo ili čitavo vozilo potpuno natope dezinfekcionim sredstvom.

Dužina dezbarijere se određuje na osnovu obima točka transportnog sredstva, koji je uvećan za 1 m. Dubina dezbarijere je oko 25 cm, a visina dezinfekcionog sredstva u njoj treba da iznosi 15 cm. U dezinfekcione barijere namenjene za dezinfekciju obuće radnika stavljaju se kompozitni sunderi koji dobro upijaju tečnost, a isto tako svojom elastičnošću omogućavaju dobar kontakt gazne površine obuće i rastvora dezinfekcionog sredstva. Inače treba istaći, da uobičajene gumene čizme imaju rebrastu površinu za gaženje u koju se skuplja prljavština. Zato se uz bazen za pešake postavlja posuda sa vodom i četkom za prethodno pranje obuće. Postoji i mogućnost stavljanja plastičnih navlaka preko obuće. Za posetioce moraju stajati na raspolaganju gumene čizme ili kaljače, koje se mogu navući preko cipela i nose se za vreme posete farmi. Dezbarijere bi trebalo da budu natkrivene kako bi se zaštitile od atmosferskih padavina. Od dezinfekcionih sredstava najčešće se koristi 2-3% rastvor NaOH.

Vozila se dezinfikuju posle mehaničkog čišćenja i pranja pri čemu bi posebnu pažnju trebalo posvetiti, točkovima, branicima, blatobranima i bočnim stranama vozila. Sitna oprema se može dezinfikovati potapanjem u dezinficijens. Potopljena oprema treba da stoji u rastvoru potopljena najmanje 4 časa. Lista dezinficijensa koji su aktivni protiv virusnih oboljenja koncentracije i preporuke za upotrebu je sledeća:

1) natrijum hidroksid: 2% rastvor za dezinfekciju otvorenih površina, zidova, podova, delova opreme koji su otporni na natrijum hidroksid, dezinfekciju točkova u dezinfekcionim barijerama; 2) natrijum hipohlorit: 2,3% aktivne hlorne solucije za dezinfekciju opreme; 3) limunska kiselina: 0,2% rastvor za dezinfekciju ruku;

Evidencija o obavljenoj dezinfekciji

O obavljenim poslovima dezinfekcije i utrošku sredstva za dezinfekciju obavezno je voditi urednu evidenciju koja bi trebalo da sadrži: 1) naziv utrošenog dezinficijensa; 2) količinu utrošenog dezinfekcionog sredstva; 3) koncentraciju radnog rastvora i 4) za svaku izvršenu dezinfekciju obavezno je izdati priznanicu vlasnicima gazdinstva i za vozila.

NASELJAVANJE ŽIVOTINJA NA MESTA NA KOME SU BORAVILE ZARAŽENE ŽIVOTINJE – SVINJSKA KUGA

Životinje koje bi trebalo uvesti u objekat koji je nekada bio zaražen, može se izvršiti po isteku 40 dana od završetka čišćenja i dezinfekcije uz primenu dole navedenih postupaka.

U objektu, gde se životinje drže na otvorenom, moraju se uvesti svinje koje dolaze sa gazdinstva na kome nije bilo nikakvih ograničenja povezanih sa afričkom kugom svinja. Svinje se u skladu sa uputstvima veterinarskog inspektora pravilno raspoređuju po celom gazdinstvu i od njih se, nakon 45 dana od uvođenja, uzimaju uzorci radi ispitivanja na prisustvo antitela na virus afričke kuge svinja. Dobijanjem negativnog rezultata dijagnostičkog ispitivanja može se pristupiti daljem uvođenju svinja na gazdinstvo. Kod svih drugih načina uzgajanja, ponovno uvođenje svinja u gazdinstvo odvija se u skladu sa odredbama ili se sve svinje uvode pod sledećim uslovima: - da dolaze sa gazdinstava koja nisu bila podvrgnuta nikakvim ograničenjima povezanim sa afričkom kugom svinja i da se uvedu u gazdinstvo u roku od 20 dana, - da se svinje u obnovljenom zapatu podvrgnu dijagnostičkom ispitivanju, s tim da se uzorci za ovaj pregled uzimaju najranije 45 dana nakon dolaska poslednjih svinja, - da ni jedna svinja ne sme napustiti gazdinstvo dok se ne dobiju negativni rezultati dijagnostičkog ispitivanja.

Ako je pojava bolesti bila povezana sa vektorima, svinje se ne smeju ponovo uvoditi na gazdinstvo:

1. Ako nisu uspešno, pod nadzorom veterinarskog inspektora, sprovedeni postupci za uništavanje vektora iz prostorija ili mesta na kojima će se svinje držati ili na kojima svinje mogu da dođu u kontakt sa vektorom, 2. Ako ne može da se dokaže, da prisutnost vektora više ne predstavlja značajan rizik od prenošenja afričke kuge svinja. 3. Najranije 60 dana nakon potpune repopulacije uzimaju se uzorci radi dijagnostičkog ispitivanja na virus afričke kuge svinja i do dobijanja negativnih rezultata ni jedna svinja ne sme da napusti gazdinstvo. 4. Kada pojava bolesti nije bila povezana sa vektorima i ako je prošlo više od šest meseci od završetka čišćenja i dezinfekcije na gazdinstvu, veterinarski inspektor može da odobri odstupanje od stava 3., uzimajući u obzir epizootiološku situaciju. 5. Ponovno uvođenje na gazdinstvo domaćih životinja drugih vrsta mora da odobri veterinarski inspektor, pri čemu uzima u obzir rizik od širenja zaraze ili od prisutnosti vektora pri ponovnom uvođenju.

U masovnoj intenzivnoj stočarskoj proizvodnji, dezinfekcija se sprovodi kao mera biološke bezbednosti u cilju zaštite zdravlja životinja, obezbeđivanja uslova za visoku produktivnost životinja, kao i dobijanja higijenski ispravne stočne hrane, zaštite zdravlja ljudi i zaštite životne sredine.

Uspeh dezinfekcije zavisi od niza faktora:

- uslova životne sredine,
- vrste objekta,
- vrsta površine koja se dezinfikuje,

- dezinficijensa koji se koristi,
- vremena ekspozicije i
- temperature.

ZAKLJUČAK

Da bi se dezinfekcija sprovela na najbolji mogući način potrebno je, pre primene dezinfekcionog sredstva, pripremiti površine za dezinfekciji i izvršiti: mehaničko čišćenje, sanitarno pranje, sušenje površina i nakon toga sprovesti postupak dezinfekcije. Uspeh dezinfekcije zavisi od pravilno sprovedenih svih ovih faza.

LITERATURA

1. Fang C., Yang X., Ding S., Luan X., Xiao R, Du Z. et al. 2021. Characterization of dissolved organic matter and its derived disinfection byproduct formation along the Yangtze River. *Environmental Science & Technology*, 55(18), 12326-36. 2. Heeb M.B., Criquet J., Zimmermann-Steffens S.G., Von Gunten U., 2014. Oxidative treatment of bromide-containing waters: formation of bromine and its reactions with inorganic and organic compounds—a critical review. *Water research*, 48, 15-42. 3. Mulvey D., Redding P., Robertson C., Woodall C., Kingsmore P., Bedwell D. et al. 2011. Finding a benchmark for monitoring hospital cleanliness. *Journal of Hospital Infection*, 77(1), 25-30. 4. Mumford A.C., Barringer J.L., Benzel W.M., Reilly P.A., Young L.Y. 2012. Microbial transformations of arsenic: mobilization from glauconitic sediments to water. *Water research*, 46(9), 2859-68. 5. Operativni priručnik za sprovođenje kriznog plana za kontrolu i suzbijanje zarazne bolesti afrička kuga svinja - Republika Srbija Ministarstvo Poljoprivrede, Šumarstva i Vodoprivrede - Uprava Za Veterinu <https://www.vet.minpolj.gov.rs/legislativa/pravilnici/Operativni%20Prirucnik%20AKS.pdf> 6. Reid D., Ternes K., Winowiecki L., Yonke C., Riege B., Fregoli F. et al. 2020. Germicidal irradiation of portable medical equipment: mitigating microbes and improving the margin of safety using a novel, point of care, germicidal disinfection pod. *American journal of infection control*, 48(1), 103-5. 7. Sandle T. 2012. *The CDC Handbook-A Guide to Cleaning and Disinfecting Clean Rooms*. Grosvenor House Publishing.

PRACTICAL IMPLEMENTATION OF BIOSECURITY MEASURES - DISINFECTION ON FARMS

Radislava Teodorović, Ljiljana Janković

Summary

The procedure that acts on microorganisms, with the aim of destroying certain microorganisms, or those microorganisms on which the disinfectant acts, is called disinfection. The success of the performed disinfection depends on the properly perfor-

med stages of disinfection: mechanical cleaning, sanitary washing, disinfection in the narrower sense, control of the performed disinfection, rinsing of disinfected surfaces and control of disinfected surfaces after rinsing. Only under the condition that the mentioned stages of disinfection have been carried out correctly, the effectiveness of the applied disinfectant can be expected. After the mechanical cleaning is completed, sanitary washing is used to remove the rest of the impurities. Infectious material can often penetrate deeply into various objects and surfaces, that is, it can be covered with various impurities, especially of organic origin, which contain a large number of microorganisms. Application of any chemical disinfectant in such a place can hardly lead to any result, because the disinfectant will not be able to penetrate to the microorganisms itself. In this way, the disinfectant loses a large part of its disinfecting ability, that is, only a small part of it reaches the microorganism. That is why the removal of impurities from the surfaces to be disinfected is an important measure, i.e. a condition for successful disinfection. When it comes to means of transport used to transport animals, they must be mechanically cleaned, thoroughly washed and then disinfected. The vehicle entering the farm must have a certificate of disinfection from an authorized veterinary organization, and if the condition of the vehicle corresponds to the certificate of disinfection, the entry of vehicles to the farm is allowed. In practical everyday disinfection, we mostly use chemical disinfectants. Among them there is a large number of preparations, the use of which is recommended for certain types of disinfection.

Key words: biosecurity measures, disinfection, farm

PRAKTIČNO SPROVOĐENJE BIOSIGURNOSNIH MERA DEZINSEKCIJE I DERATIZACIJE NA FARMAMA

*Ljiljana Janković¹, Radislava Teodorović¹, Milutin Đorđević¹,
Vladimir Drašković¹, Katarina Nenadović¹, Štefan Pintarič²*

Kratak sadržaj

Intezivna proizvodnja životinja na farmama ne može se ni zamisliti bez pravilno definisanih i sprovedenih biosigurnosnih mera. One predstavljaju niz koraka koje treba sprovesti i poštovati da bi se sprečilo ulazak bolesti na farme ili da bi se sprečilo iznošenje patogenih organizama sa farme, ukoliko oni postoje. Održavanje visokog nivoa biosigurnosnih mera doprinosi boljem zdravlju životinja, većoj produktivnosti i profitabilnosti, bezbednosti hrane i zaštiti životne sredine. Ove mere takođe utiču i na međunarodni promet životinjama i proizvodima životinjskog porekla. Kako bi se bolje razumeo koncept i značaj biosigurnosnih mera, one su podeljene na eksterne (spoljašnje) i interne (unutrašnje) biosigurnosne mere. Eksterne biosigurnosne mere obuhvataju primenu mera koje imaju za cilj sprečavanje unošenja patogena na farmu, dok interne imaju za cilj sprečavanje širenja patogena unutar farme. Interne biosigurnosne mere su definisane u svim biosigurnosnim protokolima na farmama, kroz planove sanitarne procedure koji se kontinuirano sprovode. Mere dezinfekcije i deratizacije su samo segment ukupnih biosigurnosnih mera i kada se ne sprovode programski, dodatno se umanjuju očekivani efekti, ali i obezvređuje njihov značaj. Za svaki farmski objekat se pravi plan sanitarne procedure ponaosob, zavisno od kapaciteta objekta, građevinsko tehničkih karakteristika i tipa proizvodnje.

Ključne reči: biosigurnosne mere, dezinfekcija, deratizacija

UVOD

Efikasne biosigurnosne mere su ključne za smanjenje rizika od unošenja i širenja uzročnika bolesti, ne samo na nivou farme, već i na regionalnim i nacionalnim granicama. Biosigurnosne mere predstavljaju način osiguranja bezbednosti od prenosa infektivnih bolesti, parazita i ostalih uzročnika oboljenja. Mere se zasnivaju na poznavanju načina prenošenja i glavnih puteva širenja patogena, kao i dužine opstanka patogena u spoljašnjoj sredini (FAO/OIE, 2010).

¹Dr sci. vet. med. Ljiljana Janković, vanredni profesor; dr sci. vet. med. Radislava Teodorović, redovni profesor; dr sci. vet. med. Milutin Đorđević, redovni profesor; dr vet. Vladimir Drašković, asistent; dr sci. vet. med. Katarina Nenadović, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija

²Dr Štefan Pintarič, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, R. Slovenija

*e-mail adresa autora za korespondenciju: lili@vet.bg.ac.rs

Cilj primene biosigurnosnih mera je da se smanji mogućnost infekcije, što treba da obezbedi proizvodnju zdravog i pouzdanog proizvoda (Maslić - Strižak i sar., 2012; Janković i sar., 2014; Toma i sar., 1999). Ove mere doprinose i većem ugledu stočarske proizvodnje, a takođe utiču i na međunarodni promet životinja i proizvoda životinjskog porekla. Konstantna primena biosigurnosnih mera je od presudne važnosti za uspeh uzgoja životinja, mada pojedina istraživanja dokazuju da je stepen ispunjenja navedenih zahteva u biosigurnosnom protokolu nizak, bez obzira na moguće ozbiljne ekonomske posledice (lečenje bolesnih životinja, ubijanje životinja zbog afričke svinjske kuge, slinavke i šapa) (Pitkin i sar., 2009; Vaillancourt i Carver, 1998). Uvođenje novih životinja je jedan od najvećih rizika za ulazak novih patogena na farmu. Stoga se više pažnje posvećuje merama kojima se sprečava direktni kontakt između životinja, nego merama preduzetim za sprečavanje indirektnog prenosa putem opreme i ljudi, tako da manje važan put unošenja patogena može postati veoma važan, onog trenutka kada se više puta stvore uslovi za ulaz patogena na farmu (Casal i sar., 2007).

Kako bi se bolje razumeo koncept i značaj biosigurnosnih mera, one su podeljene na eksterne (spoljašnje) i interne (unutrašnje) biosigurnosne mere (Laanen i sar., 2013). Eksterne biosigurnosne mere obuhvataju primenu mera koje imaju za cilj sprečavanje unošenja patogena na farmu, dok interne imaju za cilj sprečavanje širenja patogena unutar farme. Interne biosigurnosne mere su definisane u svim biosigurnosnim protokolima na farmama, kroz planove sanitarne procedure koji se kontinuirano sprovode (FAO/OIE, 2010). Mere DDD su samo segment ukupnih biosigurnosnih mera, i kada se ne sprovode programski, dodatno se umanjuju očekivani efekti, ali i obezvređuje njihov značaj. Svaka farma je jedinstvena celina u pogledu samog objekta, lokacije, menadžmenta prijemčivosti domaćina i drugih faktora. Stoga se za svaki farmski objekat pravi plan sanitarne procedure ponaosob, zavisno od kapaciteta objekta, građevinsko tehničkih karakteristika i tipa proizvodnje. U osnovi, nju sačinjavaju protokoli dezinfekcije, dezinfekcije i deratizacije, koje izvode veterinarski radnici kontinuirano ili specijalizovane službe. O svemu se vodi pismena evidencija koja se čuva najmanje tri godine (Đorđević i sar., 2008; Radenković i sar., 2013).

Sprovođenje biosigurnosnih mera na farmi zavisi od najmanje plaćenih i edukovanih radnika i podložno je greškama tokom obavljanja svakodnevne radne prakse. Stoga je potrebno svakodnevno praćenje izvršenja radnih obaveza zaposlenih, uz kontinuiranu edukaciju, pri čemu svaka otkrivena neusaglašenost služi za unapređenje postojećeg biosigurnosnog protokola. Kod sprovođenja biosigurnosnih mera na farmi, imperativ u radu mora da bude kompletna i blagovremena realizacija navedenih aktivnosti po biosigurnosnom protokolu (Rašeta i sar., 2015; Laanen i sar., 2013). Keener (2007) navodi da protokoli kontrole štetnih insekata i glodara moraju da sadrže sledeće stavke:

1. procedure kontrole štetočina – aktivnosti koje se sprovode za kontrolu svake vrste štetočina. Pisane procedure treba da budu detaljne i da uključuju učestalost delovanja;

2. evidencija – dokumentacija svake izvršene aktivnosti. Zapisi moraju biti tačni, ažurni i moraju uključivati obavljenu inspekciju za dokaze o štetočinama;
3. odgovorni pojedinci – osoba(e) koja je zadužena za sprovođenje postupka kontrole štetočina i vođenje evidencije kao i supervizor odgovoran za potpisivanje pregledanih zapisa;
4. odstupanje – dokaz problema sa štetočinama je subjektivna odluka koja zahteva stručnost. Na primer, povremeno pronalaženje bubašvaba ispod kante za otpatke može biti prihvatljivo, ali pronalaženje mnogo bubašvaba bi bilo odstupanje. Došlo je do odstupanja kada je dozvoljena granica prekoračena i
5. korektivne mere – ovo su pisani akcioni koraci u planu koji će se izvršiti ukoliko dođe do odstupanja od programa kontrole štetočina. One često mogu uključivati povećanje procedura kontrole, prekvalifikaciju zaposlenih, čišćenje određenog područja i dr.

Održavanje visokih standarda biosigurnosti na farmama nije lako i verovatno će se desiti samo tamo gde se biosigurnosne mere razvijaju kao ukorenjeni deo poslovne kulture.

PRAKTIČNO SPROVOĐENJE BIOSIGURNOSNE MERE DEZINSEKCIJE

Pojedine vrste insekata za domaće životinje predstavljaju pravu napast i opasnost po njihovo zdravlje. Insekti napadaju domaće životinje, uznemiravaju ih ubadanjem i sisanjem krvi i mogu prouzrokovati pad proizvodnih rezultata. Neki od njih prenose uzročnike zaraznih i parazitskih bolesti na životinje i ljude. Zbog toga se dezinfekcija farmanskih objekata i okoline mora kontinuirano sprovođiti, a posebno je to bitno u toplim periodima godine (Janković i sar. 2014). Za uspešno izvođenje dezinfekcije neophodno je detaljno poznavanje razvojnog ciklusa štetnih insekata. Dezinfekcija može da se vrši kada je populacija insekata najveća – tekuća dezinfekcija, ili kada je najmanja – preventivna dezinfekcija. Preventivna dezinfekcija se sprovođi tokom zime i ranog proleća, dok se tekuća dezinfekcija sprovođi u toku toplog perioda godine. Kod preventivne dezinfekcije, za uništavanje štetnih insekata i njihovih razvojnih oblika koriste se mehaničke, fizičke i hemijske metode. Tekuća dezinfekcija se sprovođi kontinuirano, od aprila do oktobra. Koriste se iste metode kao kod preventivne dezinfekcije, ali se koriste i hemijska sredstva adulticidi i larvicidi (Levot, 2013).

Mehaničke metode za suzbijanje štetnih insekata obuhvataju asanaciju i melioraciju, isušivanje bara, krčenje šikara, stavljanje lepljivih pojaseva oko stabala, mehaničko prevrtanje gornjeg sloja stajnjaka, postavljanje lepljivih traka u objektima i zaštitnih mrežica na prozore. Takođe se koriste inertna prašiva (silikati, dijatomejska zemlja, silika gel). Prašiva deluju tako što svojim oštrim česticama oštećuju i adsorbuju vosak iz kutikule štetnih insekata što dovodi do desikacije i uginuća (Korunić, 2013).

Biološko suzbijanje štetnih insekata se zasniva na korišćenju prirodnih neprijatelja. Betke i sar. (1991) navode da su na farmi svinja uselili muvu *Opyra aenescens* čija kanibalistička larva 3. stadijuma uništava larve kućne muve. Ogleđom je utvrđeno da je dominantna vrsta veoma brzo potisnula populaciju kućne muve. Stanje na farmi se poboljšalo budući da se muve *Opyra aenescens* drže okolnih površina i ne napadaju svinje.

U suzbijanju štetnih insekata, danas se na farmama najčešće primenjuju hemijske metode, a najviše se koristi prskanje insekticidnim rastvorima. U zavisnosti od veličine čestica razlikujemo postupke prskanja, raspršivanja, zamagljivanja, ULV- postupak i zaprašivanje.

Prskanje ručnom prskalicom kapaciteta od 2, 5 i 10 l se obavlja insekticidnim rastvorom, a veličina kapi je oko 150 μ (0,15 mm).

Raspršivanje se obavlja pomoću leđnih i motornih pumpi kapaciteta 10-15 l, a veličina raspšenih čestica se kreće od 50 do 150 μ . Sa ovim manjim kapima se postiže isti efekat kao pri prskanju, a troši se i do 10 puta manje insekticidnog rastvora. Posebnim regulatorom (ventilom) određujemo količinu rastvora koju raspršivač izbacuje u minuti. Smanjivanjem količine rastvora, smanjuje se i veličina kapi. Mlaz insekticidnog rastvora izbacuje se na udaljenost od 5-10 m i zato se ove prskalice pretežno koriste za eksterijere. Ako se tretman insekata stručno sprovede, efikasno će dovesti do redukcije populacije štetnih insekata.

Zamagljivanjem se nanosi insekticidni rastvor čije su kapi veličine od 0,5-50 μ . Topli zamagljivači raspršuju kapljice u vrlo male čestice (20 μ) iz insekticidnog rastvora na uljnom nosaču i prave suhu maglu. Koriste se za tretman eksterijera i interijera. Kod hladno - vlažnog zamagljivanja, čestice su veličine 20-50 μ . Hladni zamagljivači se koriste kada se rade interijeri.

Tretman ULV se koristi za leteće insekte. Veoma male kapi insekticidnog rastvora (5-15 μ) su mnogo efikasnije ako se u vazduhu zadržavaju duže vreme, zato što je veća mogućnost da insekt dođe u kontakt sa kapljicom koja lebdi. Veće kapljice brzo sedimentiraju, dok se manje čestice odbijaju od ciljanog insekta u letu pre nego što ga pogode. Kada je vazduh miran, ULV čestice lebde nekoliko sati, pa je preporuka da se prostorija drži zatvorena 2-4 sata. Pri upotrebi u zatvorenom prostoru, fine čestice insekticida koje lebde, padaju na dlačice ciljanih insekata, aglomeriraju u veće kapi i skliznu na telo izazivajući prislan dodir i isti efekat kao da je upotrebljen teži sprej (Đorđević i sar., 2008).

Zaprašivanje se vrši nanošenjem praškastog insekticida i uglavnom se koristi protiv gmižućih insekata. Aktivna supstanca je najčešće na inertnom prahu (npr. talk) ili je sama u obliku praha. Ova sredstva se ne mešaju sa vodom. Deluju tako što se prikače na organe za kretanje i organe za sisanje i bodenje, tako da preko njih prodiru u digestivni ili respiratorni sistem. Da bi se smanjila mogućnost pojave rezistencije, povremeno treba rotirati klasu insekticida tj. hemijsku grupu (Liu i sar., 2006).

Fumigacija je postupak primene gasova u dezinfekciji. Gasovi se od aerosola razlikuju po tome što se šire kao posebni odvojeni molekuli, a to im omogućava

da prodiru u fumigirani materijal i da isto tako izlaze iz njega. Sa druge strane, aerosoli ne mogu prodirati zato što se njihove čestice zadržavaju na spoljnim površinama. Primena fumiganata određuje se na osnovu odnosa rizika i koristi. Poboľšanju postupaka u fumigaciji doprineli su instrumenti za otkrivanje i analizu gasova (multi gas detektori), poboljšanje formulacije fumiganata kao i povećan zahtev za efikasnim i ekonomičnim merama suzbijanja štetnih insekata.

PRAKTIČNO SPROVOĐENJE BIOSIGURNOSNE MERE DERATIZACIJE

Regulacija populacije štetnih glodara je biosigurnosna mera koja ima izuzetno važan epidemiološko-epizootiološki značaj, zbog činjenice da su štetni glodari prirodni rezervoari i prenosioci uzročnika čitavog niza bolesti na čoveka i životinje, izazvanih bakterijama, rikecijama, virusima, parazitima, protozoama, helmintima i gljivicama (Bijelić-Čabrilo i sar., 2013; Pavlović, 2022; Kataranovski i sar., 2011; CDC, 2017). Prouzrokovaoe infekcija oni izlučuju fecesom i urinom, pa se na taj način kontaminiraju voda i hrana. Kod nekih infekcija, buve, krpelji i komarci prenose sa glodara prouzrokovaoe oboljenja na čoveka i domaće životinje. Štetni glodari mogu preneti niz infekcija ili mehanički ili direktnim ugrizom (Meerburg i sar., 2009; Janković i sar., 2019). Deratizacija se sprovodi i zbog ogromnih ekonomskih šteta koje glodari nanose jedući i zagađujući fecesom i urinom uskladištenu hranu i oštećujući instalacije i opremu (Rustamani, 2005; Awan i Hussain, 2015).

Suzbijanje štetnih glodara je izuzetno složen i delikatan zadatak. Nestručno sprovedena deratizacija može imati nesagledive negativne posledice, kako za radnike na farmi i neciljane vrste, tako i za same izvođače. Imajući ovo u vidu, kod sprovedenja akcije deratizacije potrebno je odgovarajuće teorijsko i praktično naučno-stručno znanje (Krajcar, 2011).

Metode suzbijanja štetnih glodara

U praktičnom suzbijanju štetnih glodara, kao što su pacovi, miševi i mišoliki glodari, koriste se ista sredstva i metode, a principi suzbijanja su isti, bez obzira na vrstu. Rylnikov (2008) navodi da se kod sprovedenja deratizacije treba pridržavati pravila da se ona istovremeno radi na svim površinama, objektima i pratećim kanalizacionim sistemima i da se koriste metode koje nisu štetne za životnu sredinu. Da bi suzbijanje štetnih glodara na farmama bilo uspešno, samo će integrisana primena preventivnih, mehaničkih, fizičkih i hemijskih metoda dati željene rezultate. Nažalost, danas se u praksi koriste i sprovode samo hemijske mere i deratizacija se poistovećuje samo sa izlaganjem otrova, tj. zatrovanih mamacu, što je pogrešno (Krajcar 2011; Sayer, 2017; Janković i sar., 2013).

1. Preventivne mere

Cilj preventivnih mera je da se primenom tehničkih i higijenskih mera onemoguću ulaganje, zadržavanje, hranjenje i opstanak štetnih vrsta glodara u objek-

tima. Preventivne mere treba primenjivati kao sastavni deo ukupnog deratizacionog procesa. U preventivne mere spadaju:

Tehnološko manipulativne mere – ovo predstavlja preventivnu meru u posrednom suzbijanju glodara a podrazumeva odgovarajuća tehnologiju smeštaja i manipulisanja različitim sirovinama u skladištima, magacinima i drugim prostorima. Cilj ove mere je onemogućavanje ulaska, zadržavanja, hranjenja i razmnožavanja glodara u tim prostorima.

Građevinsko-tehničke mere – kvalitetnom gradnjom, objekat će predstavljati neprobojnu barijeru za ulazak, zadržavanje, hranjenje i razmnožavanje štetnih glodara.

Sanitarno-higijenske mere – izbor mera zavisi od vrste i namene objekta, a sve se svode na stvaranje nepovoljnih uslova za egzistenciju štetnih glodara u objektima i oko njih.

2. Mehaničke metode

Mehaničke metode (prepreke, klopke, lepak) u deratizaciji se mogu koristiti na ograničenom prostoru ili u objektu koji je infestiran sa malim brojem životinja.

3. Hemijske metode

Upotreba hemijskih sredstava – rodenticida za sada je najbrži i najefikasniji način za regulaciju prenamnožene populacije pacova i mišolikih glodara. Prednost rodenticida je u tome što se mogu koristiti na velikim površinama, a to je nemoguće izvesti drugim metodama. Negativna strana hemijske metode je što su ova sredstva istovremeno opasna i za ljude i za domaće životinje. Ukoliko se deratizacija sprovodi stručno i uz neophodne mere opreza, opasnost se svodi na minimum (Janković i sar., 2013; Sayer, 2017).

U deratizaciji se koriste antikoagulanti II generacije. Većina ovih rodenticida je u stanju da u koncentraciji u mamcu od svega 0,002 - 0,005% izazove 100 odsto uginuća sivih pacova nakon 4 do 6 dana. Prilikom postavljanja mamaca, treba voditi računa o načinu i mestu izlaganja zato što su izuzetno toksični za živinu i pernatu divljač, a nešto manje za svinje, pse, mačke i ljude (Sayer, 2017).

Pravila kod izlaganja rodenticidnih mamaca

Mamci mogu biti izuzetno atraktivni za glodare, međutim ukoliko se postavljaju na neodgovarajući način, može izostati uspeh deratizacije ili može doći do trovanja neciljanih vrsta. Pravila kod izlaganja mamaca u objektima i na otvorenim površinama su sledeća: mamce treba postavljati na onim mestima gde se okuplja najveći broj glodara i tako povećava mogućnost da mamci budu pojedeni; postavljaju se tako da budu nedostupni za sve neciljane vrste; izlaganjem mamaca ne sme da bude stvorena mogućnost kontaminiranja hrane i vode za ljude i životinje; za svaki objekat i teren napraviti tačan plan i raspored izlaganja mamaca kako bi se pratilo uzimanje i eventualni nestanak; plan i raspored izlaga-

nja treba da sadrži podatke o kritičnim mestima i potrebnim količinama; mamce postaviti u dovoljnoj količini i izlagati u deratizacionim kutijama ili na skrovita i zaklonjena mesta; parafinski mamci izloženi u blizini domaćih životinja moraju biti vezani žicom da ih štetni glodari ne bi mogli preneti; u kanalizacione sisteme postaviti parafinske mamce otporne na vlagu.

Propusti tokom sprovođenja deratizacije se mogu ispraviti samo ako za vreme sprovođenja i po završenoj akciji, postoji interni i stručni nadzor deratizacije. Tada se većina uočenih grešaka može lako ukloniti još u toku akcije. Sve ostale greške uočene u završnoj analizi uklanjaju se ponavljanjem mera u objektu, ili na površinama gde su uočeni propusti (Krajcar, 2011; Janković i sar., 2013).

ZAKLJUČAK

Veliki broj bolesti na farmama, je moguće primenom profilaktičkih i terapijskih mera, kao i pojačanom kontrolom stručnih službi, držati pod kontrolom. Glavni zadatak u radu na farmi treba da bude kompletna i blagovremena realizacija biosigurnosnih mera planiranih biosigurnosnim protokolom, s obzirom na ozbiljnost posledica koje mogu da se pojave u slučaju neadekvatnog sprovođenja. Mere dezinfekcije i deratizacije su samo segment ukupnih biosigurnosnih mera i kada se ne sprovode programski, dodatno se umanjuju očekivani efekti, ali i obezvređuje njihov značaj. Kako bi se osigurala adekvatna realizacija biosigurnosnih mera na farmi, potrebno je pratiti proizvodni proces i ako je potrebno organizovati dodatni trening i edukaciju zaposlenih radnika. Održavanje visokih standarda biosigurnosti na farmama nije ni jednostavno ni lako i verovatno će se odvijati samo tamo, gde se biosigurnosne mere razvijaju kao ukorenjeni deo poslovne kulture.

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-09/2021-14/200143).

LITERATURA

1. Awan D.S., Hussain I. 2015. The level of rodent problems in poultry farms of Rawalpindi-Islamabad, Pakistan, *Mammalia*, 8, 2, 193-204. 2. Betke P, Ribbeck R, Schmaschke R. 1991. Biologische bekämpfung von stallfliegen mittels des antagonisten *Ophyra Aenescens* in tierproduktion salnlagen, *Proceedings of 7th international congress on animal hygiene*, Leipzig, 504-9. 3. Bijelić-Čabrilo O., Čabrilo B., Popović E. 2013. Helminth fauna of rodents (*Mammalia, Rodentia*) from Zasavica (Serbia), *Biologia Serbica*, 35, 1-2, 43-47. 4. Casal J.A., De Manuel E., Mateu M., Martín M. 2007. Biosecurity measures on swine farms in Spain: Perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures, *Preventive Vet Med*, 82, 2007, 138–150. 5. Dewulf J., 2013, Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds, *Vet J*, 198, 508–12. 6. Đorđević M., Radenković-Damnjanović B., Vučinić M., Teodorović R., Jan-

ković L.j, Živanov D. 2008. Biosigurnosne mere u intezivnoj proizvodnji svinja, Zbornik radova XIX savetovanja dezinfekcija, dezinfekcija i deratizacija u zaštiti zdravlja ljudi i životinja sa međunarodnim učešćem, 187-207. **7.** FAO/OIE Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Organisation for Animal Health/World Bank. 2010. Good practices for biosecurity in the pig sector—Issues and options in developing and transition countries. **8.** FAO Animal Production and Health Paper No. 169. **9.** Pavlović I., Janković LJ., Stanojević S., Bojkovski J., Zdravković N., Tasić A. et al. 2022. Biosigurnosne mere u kontroli parazitskih infekcija svinja u farmskim objektima, 33 Savetovanje DDD - Jedan svet jedno zdravlje, 213 - 220. **10.** Janković LJ., Drašković V., Pintarić Š., Mirilović M., Đurić S., Tajdić N., Teodorović R. 2019. Rodent pest control, Veterinarski glasnik, 73, 2, 85-99. **11.** Janković LJ, Radenković- Damnjanović B., Teodorović R., Đorđević M., Pintarić Š. 2013. Propusti koji utiču na efikasnost deratizacije, XXIV savetovanje dezinfekcija, dezinfekcija i deratizacija u zaštiti zdravlja ljudi i životinja sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, 177-89. **12.** Janković LJ., Radenković-Damnjanović B., Teodorović R., Đorđević M., Pintarić Š., Levstek P. 2014. Najčešći propusti kod sprovođenja biosigurnosnih mera na farmama, XXV Savetovanje dezinfekcija, dezinfekcija i deratizacija - jedan svet jedno zdravlje sa međunarodnim učešćem, 31-39. **13.** Kataranovski M., Mirkov I., Belij S., Popov A., Petrović Z., Gačić Z., Kataranovski D. 2011. Intestinal helminths infection of rats (*Ratus norvegicus*) in the Belgrade area (Serbia): the effect of sex, age and habitat, Parasite, 18, 2, 189-196. **14.** Keener K, 2007, Small meat processing plants: A pest control program, <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/FS/FS-22-W.pdf>. **15.** Korunić Z., 2013, Diatomaceous Earths - Natural insecticides, Pesticidi i Fitomedicina, 28, 2, 77-95. **16.** Krajcar D, 2011. Provedba deratizacijskih postupaka - integralni pristup, Hrvatski časopis za javno zdravstvo, 7, 28, 7. **17.** Laanen M., Persoons D., Ribbens S., de Jong E., Callens B., Strubbe M. et al. 2013, Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. Vet J, 198, 2, 508-12. **18.** Levot G., 2013. Controlling flies on intensivelivestockfarms, <https://www.dpi.nsw.gov.au/data/assets/pdf/0011/475229/Controlling-flies-on-intensive-livestock-farms.pdf>. **19.** Liu N., Zhu F., Xu Q., Pridgeon J.W., Zhang L. 2006. Behavioral change, physiological modification, and metabolic detoxification: Mechanisms of insecticide resistance, Acta Entomol Sin, 49: 671-9. **20.** Janković LJ., Teodorović R., Đorđević M., Drašković V., Pintarić Š., Pavlović I. 2021, Rezistencija insekata na insekticide i značaj biotestova, Zbornik radova, 31 i 32 Savetovanje DDD – Jedan svet jedno zdravlje, 146-55. **21.** Maslić-Strižak D., Spalević LJ, Resanović R. 2012. Biosigurnosne mere u industrijskom živinarstvu, Živinarstvo, 46, 9,10, 2-15. **22.** Meerburg B.G., Singleton G.R., Kijlstra A. 2009. Rodent-borne diseases and their risks for public health, Critical reviews in microbiology, 35, 3, 221-70. **23.** Radenković-Damnjanović B., Janković LJ., Teodorović R. 2013. Biosigurnosne mere kod pojave bruceloze, Naučno-stručni simpozijum sa međunarodnim učešćem "Bruceloza u Jugoistočnoj Evropi", 174-82. **24.** Rustamani M.A., Kakar A.W., Khooharo AA, Dars F, Ansari SA, Baloch HB, 2005, Grain losses caused by house rat *Rattus rattus* L. and its control, Pakistan J Zool, 37, 1, 33-8. **25.** Rylnikov V.A., 2008, Control of rodents with rodenticides, Proceedings of the sixth international conference on urban pests, Review of Anti-pest Technologies, Russia, Moscow William, 2008 Printed by OOK-Press Kft., H-8200. **26.** Sayer K., 2017. The 'modern' management of rats: British agricultural science in farm and field during the twentieth century. BJHS Themes. <https://doi.org/10.1017/bjt.2017.7>. **27.** Pitkin A., Otake S., Dee S., 2009. Biosecurity Protocols for the prevention of spread of PRRS virus, http://www.aasv.org/aasv/PRRSV_BiosecurityManual.pdf. Vaillancourt JP, Carver DK, 1998, Biosecurity: perception is not reality, Poultry Digest, 57, 6, 28-36.

PRACTICAL IMPLEMENTATION OF BIOSECURITY MEASURES OF DISINSECTION AND DERATIZATION ON FARMS

**Ljiljana Janković, Radislava Teodorović, Milutin Đorđević,
Vladimir Drašković, Katarina Nenadović, Štefan Pintarič**

Summary

The intensive production of animals on farms cannot even be imagined without properly defined and implemented biosecurity measures. Biosecurity measures are a series of steps that should be implemented and followed to prevent the disease from entering the farm or to prevent pathogenic organisms from leaving the farm, if present. Maintaining a high level of biosecurity measures contributes to better animal health, higher productivity and profitability, food safety, and environmental protection. These measures also affect international trade in animals and products of animal origin. In order to better understand the concept and importance of biosecurity measures, they are divided into external (external) and internal (internal) biosecurity measures. External biosecurity measures include the implementation of measures aimed at preventing the introduction of pathogens to the farm, while internal measures are aimed at preventing the spread of pathogens within the farm. Internal biosecurity measures are defined in all biosecurity protocols on farms, through sanitary procedure plans that are continuously implemented. Disinsection and pest control measures are only a segment of the overall biosecurity measures, so when they are not implemented programmatically, the expected effects are additionally reduced and their importance is also devalued. Sanitary procedure plan is made individually for each farm facility, depending on the capacity of the facility, construction and technical characteristics, and type of production.

Key words: biosecurity measures, disinfection, pest control

KLINIČKA BIOLOGIJA I PRAVILNO DRŽANJE GMAZOVA U ZATOČENIŠTVU

Maja Lukač

Kratak sadržaj

Gmazovi (*Reptilia*) predstavljaju jednu od najvećih i najstarijih grupa kralješnjaka na svijetu. Evoluirali su prije 310 – 320 miliona godina od svojih predaka vodozemaca. Razred *Reptilia* dijeli se u četiri reda: kornjače (*Chelonia*), ljuskaše (*Squamata*), krokodile (*Crocodylia*) i tuatare (*Rhynocephalia*), a svaki red se dalje dijeli na podredove, familije, rodove i vrste i svi spadaju u ektotermne organizme.

Danas je na svijetu prisutno preko 11 000 vrsta gmazova koji značajno variraju u svojoj veličini, izgledu, fiziologiji i prehrani. Radi svoje popularnosti, mnoge se vrste gmazova danas drže u zatočeništvu, kako u privatnim, tako i u izložbenim kolekcijama. Zbog svojih specifičnih anatomskih i fizioloških karakteristika, gmazovi u zatočeništvu zahtijevaju osiguravanje specifičnih mikroklimatskih uvjeta koji se razlikuju ovisno o vrsti gmaza. Obzirom da je danas dobro poznato da većina bolesti gmazova u zatočeništvu proizlazi upravo iz pogrešaka u njihovom držanju, veterinar koji se bavi liječenjem gmazova trebao bi biti upoznat sa specifičnostima anatomije i fiziologije gmazova, kao i mikroklimatskim uvjetima potrebnim svakoj pojedinoj vrsti kako bi donio pravilnu dijagnozu i terapiju, te savjetovao vlasnika kako da ispravi i izbjegne buduće pogreške u držanju životinje. Veterinar koji se bavi liječenjem gmazova trebao bi moći prepoznati vrstu pacijenta kojeg liječi, odrediti spol, ako je to moguće, te znati osnovne mikroklimatske uvjete potrebne dotičnoj vrsti, a vezane uz vrstu terarija, optimalni temperaturni gradijent, vlagu, svjetlost, način uzimanja vode i supstrat. Također bi trebao biti upoznat s pravilnom prehranom i suplementima potrebnima pojedinoj vrsti gmaza.

Ključne riječi: fiziologija, gmazovi, klinička biologija

KLASIFIKACIJA GMAZOVA

Svi današnji gmazovi spadaju u razred *Reptilia* koji se dijeli u četiri reda: kornjače (*Chelonia*), ljuskaše (*Squamata*), krokodile (*Crocodylia*) i tuatare (*Rhynocephalia*), a svaki red se dalje dijeli na podredove, familije, rodove i vrste (Doneley, 2018). Danas je poznato preko 11 000 vrsta gmazova (<http://www.reptile-database.org>).

¹Dr. Maja Lukač, DipECZM (Wildlife Population Health), docent, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska
e-mail adresa autora za korespondenciju:maja.lukac@vef.hr

Tablica 1. Taksonomija i klasifikacija gmazova

RED	PODRED	UOBIČAJENI NAZIV	OKVIRAN BROJ VRSTA
<i>CHELONIA</i>	<i>CRYPTODIRA</i> (Većina kornjača)	KORNJAČE	356
	<i>PLEURODIRA</i> (Vijovratke)		
<i>SQUAMATA</i> (ljuskaši)	<i>SERPENTES (OPHIDIA)</i>	ZMIJE	3 971
	<i>SAURIA (LACERTILIA)</i>	GUŠTERI	7 176
	<i>AMPHISBENIA</i>	PRSTENAŠI	202
<i>CROCODYLIA</i>		KROKODILI	27
<i>RHYNCHOCEPHALIA</i>		TUATARA	1

Njihove najznačajnije prilagodbe na različite uvjete staništa su čvrste ljuske kože pomoću kojih konzerviraju vodu, polijeganje amniotskih jaja i izlučivanje netopive mokraćne kiseline kao konačnog produkta bubrega. Prema načinu prehrane, gmazovi se dijele na mesojede, biljojede i svejede (O'Malley, 2005).

MIKROKLIMATSKI UVJETI

Obzirom na velik broj vrsta, gmazovi značajno variraju u svom izgledu, veličini i prehrani. Također, svaka pojedina vrsta zahtijeva specifične mikroklimatske uvjete pri držanju u zatočeništvu, te stoga ne postoji osnovni obrazac držanja gmazova u zatočeništvu, dok za neke vrste uvjeti držanja u zatočeništvu nisu niti poznati (Oonincx i Leeuwen, 2017). Opće je pravilo držanja gmazova u zatočeništvu oponašanje što prirodnijih uvjeta života ovisno o biologiji same vrste (Kischinovsky i sur. 2018).

Osnovni uvjeti držanja gmazova u zatočeništvu podrazumijevaju slijedeće mikroklimatske uvjete:

Temperatura

Svi gmazovi su ektotermni (poikilotermni) organizmi što znači da o stupnju zagrijanosti tijela ovisi rad svih organa, a adekvatna zagrijanost organizma također ima utjecaj i na metabolizam kalcija i fosfora. Iz tog je razloga odgovarajući temperaturni gradijent jedan od najbitnijih mikroklimatskih uvjeta pri držanju gmazova u zatočeništvu. Svaka vrsta gmaza ima raspon temperatura optimalan za sve životne funkcije. Ovisno o načinu zagrijavanja, gmazovi se dijele na heliotermne ili tigmotermne životinje. Heliotermni gmazovi zagrijavaju tijelo sunčanjem pa u njih spadaju dnevne vrste, dok tigmotermni gmazovi zagrijavaju tijelo

mirovanjem na toplim površinama pa u njih spadaju vrste aktivne u sumrak i noću (O'Malley, 2005). Kao izvore grijanja možemo koristiti žarulje za grijanje u heliotermnih vrsta ili pločaste i kabelske grijače u tigmotermnih vrsta gmazova. U nastambe se preporuča postavljati termometre kako bi se temperatura na toplijoj i hladnijoj strani mogla pratiti i korigirati po potrebi. Preniske temperature u nastambama mogu dovesti do pada imuniteta i veće sklonosti organizma raznim zaraznim bolestima, do prestanka uzimanja hrane ili slabijeg probavljanja hrane, dehidracije i postupnom zatajenju vitalnih organa. Previsoke temperature rijeđe su problem držanja gmazova u zatočeništvu, a kada su prisutne, obično rezultiraju dehidracijom, suhom gangrenom vršnih dijelova tijela, te disekvizom (nepravilno presvlačenje kože) (Varga, 2004).

Svjetlost

Za gmazove u zatočeništvu svjetlost je bitna kako kvalitativno (valne duljine i intenzitet), tako i kvantitativno (duljina trajanja fotoperioda). Svjetlost utječe na metabolizam minerala, razmnožavanje i ponašanje. Vidljiva svjetlost je bitna za reprodukciju, infracrvena je odgovorna za zagrijavanje organizma, a uVA za ponašanje. UvB svjetlost valnih duljina 290 – 320 nm utječe na stvaranje vitamina D u koži i metabolizam kalcija i fosfora. UvB svjetlost u zatočeništvu potrebno je prilagoditi vrsti gmaza, podneblju iz kojega dolazi, te vrsti nastambe u kojoj je životinja smještena. UvB lampe se dijele na one koje daju usmjerenu svjetlost (kompaktne uvB lampe), raspršenu svjetlost (UvB cijevi), te na metal halogene lampe (Baines 2016). Generalno, prednost se daje uvB cijevima koje daju raspršenu svjetlost jer je postavljanjem takve lampe u nastambu životinja najbolje izložena UvB zrakama određeni period dana. Svaka uvB lampa ima maksimalnu udaljenost od životinje pri kojoj daje potreban Uv indeks i vrijeme trajanja, koje ovisi o samom proizvođaču (Baines, 2019). UvB svjetlost ne prolazi kroz obično staklo, te izlaganje gmazova svjetlosti na taj način nije adekvatno za stvaranje vitamina D u koži. Osim uvB svjetlosti, gmazovima je potrebno osigurati i uVA svjetlost koja utječe na cirkadični ritam i normalno ponašanje gmazova. Fotoperiod bi trebalo prilagoditi zemljopisnom podrijetlu same vrste koja se drži, a generalno bi trebao iznositi 10-12 sati na dan.

Vlaga

Vlaga u terariju trebala bi trebala biti što sličnija vlazi prirodnog podneblja iz kojeg pojedina vrsta dolazi. Za vrste kojima je potrebna srednja do visoka vlaga preporuča koristiti treset ili mahovinu, dok se za vrste koje ne trebaju vlagu, višu od sobne, može koristiti sušiji supstrat, poput pijeska.

Vlaga se u terariju može održavati prskanjem supstrata ili stjenki terarija, postavljanjem posuda s vodom ili komercijalno dostupnim slapovima za gmazove. Mnogi problemi gmazova u zatočeništvu vezani su uz prenisoku vlagu, poput problema s prevlačenjem kože, gangrene vršnih dijelova tijela i zatajenja bubrega. Vlagu je potrebno pratiti postavljanjem higrometra u nastambu.

Ventilacija

Ventilacija podrazumijeva kompletnu izmjenu zraka unutar nastambe. U manjim nastambama, ventilacija se osigurava postavljanjem ventilacijskih mrežica na vrh i bočne strane nastambe, ovisno o tipu nastambe, dok je u većim nastambama potrebno postaviti ventilacijske sustave koji pušu kroz za to predviđene otvore i time omogućuju kompletnu izmjenu zraka. Obzirom da jača ventilacija snižava temperaturu i utječe na vlagu, te parametre je potrebno detaljno pratiti kako bi bili u skladu s potrebama vrste.

Voda

Vodu bi u nastambama trebalo osigurati na način na koji je pojedina vrsta uzima i u prirodi, kako bi se osigurala pravila hidratacija organizma. Ovisno o vrsti, uzimanje vode se osigurava postavljanjem posuda za vodu, prskanjem bilja i stjenki terarija, komercijalno dostupnim slapovima ili postavljanjem takozvanog „*dripping*“ sistema. U poluvodenih vrsta gmazova, potrebno je koristiti dekloriranu vodu, te pratiti njenu kvalitetu. Također je potrebno mijenjati minimalno 30 odsto vode svaka dva tjedna. Kako bi voda što dulje ostala čista, preporuča se koristiti filtre za vodu.

Uređenje nastambe

U nastambama za gmazove trebale bi se nalaziti posude za hranu i vodu, te mjesta za skrivanje kako bi se životinja osjećala sigurnije. Prostor je potrebno i dodatno oplemeniti granama, kamenjem ili biljkama (Kischinovskiy, 2018). Supstrat koji se postavlja u terarij trebao bi biti u skladu sa biologijom vrste koja se drži, no istovremeno siguran za životinju. Kao supstrat, može se koristiti pijesak, treset, mahovina, papirnati ručnici, kamenje i sl. a vrlo je bitno da supstrat nije toksičan te da ga životinje ne gutaju kako ne bi došlo do začepa crijeva.

Društvena struktura

Kao i ostali uvjeti držanja gmazova u zatočeništvu i društvena struktura bi trebala oponašati prirodnu biologiju vrste. Neke su vrste gmazova solitarne, osim u sezoni parenja, poput kukuruznih zmija, dok su neke izrazito teritorijalne poput nekih vrsta gekona. Kada se vrste koje podnose držanje u grupi drže u istom prostoru, uvijek se preporuča da se jedan mužjak drži s više ženki. Veličina nastambe, mjesta za grijanje, hranjenje i skrivanje moraju odgovarati potrebama grupe (Wilkinson Leonatti, 2015). Kada se različite vrste gmazova drže u istom prostoru, veće su šanse za prijenos zaraznih bolesti sa asimptomatskih prenositelja na prijemljive jedinke, a generalno je pravilo da se ne miješaju životinje iz različitih podneblja obzirom da je pri tome nemoguće osigurati mikroklimatske uvjete adekvatne za sve vrste u istoj nastambi (Rossi, 2019).

Vrste i veličine terarija

Ovisno o namjeni, nastambe za gmazove mogu biti izrađene od različitih materijala poput stakla, plastike ili drveta. Nastambe mogu biti dizajnirane za smještaj arborealnih, terestričnih, vodenih ili poluvodenih vrsta. Obzirom na namjenu, nastambe mogu služiti za držanje izložbenih, pokusnih, uzgojnih i bolesnih, ili životinja koje služe za edukaciju. Veličina terarija ovisi o vrsti i broju životinja koje se drže u istoj nastambi, a ako se više jedinki drži u istoj nastambi potrebno je osigurati dovoljno mjesta za uzimanje hrane i vode, te mjesta za sunčanje i skrivanje kako bi sve jedinke dobile adekvatne mikroklimatske uvjete.

PREHRANA GMAZOVA

Različite vrste gmazova imaju različite prehrambene navike, a generalno gmazove možemo podijeliti u biljojede, svejede i mesojede (Donoghue i McKeown, 1999). Mesojedni gmazovi nadalje se dijele u one koji jedu kralješnjake i one koji se hrane beskralješnjacima. Prehrana gmazova i dalje ne predstavlja egzaktnu znanost, kao što je to u mnogih udomaćenih vrsta životinja, već je predmet istraživanja pojedinih vrsta kako u prirodi, tako i u zatočeništvu. Vrijeme prolaza sadržaja kroz probavni sustav značajno varira ovisno o vrsti gmaza, a može trajati od jednog dana kao što je to slučaj u manjih insektivora, do 38 sati u većih zmija. Temperatura okoliša značajno utječe na probavu, pa je tako probava brža pri višim temperaturama. Suboptimalne temperature dovode do maldigestije, nadima i opstipacije. Najčešći problem gmazova u zatočeništvu predstavlja prekomjerno hranjenje, što često dovodi do pretilosti i bolesti masne jetre (Boyer, 2019).

Biljojedni gmazovi

U biljojedne gmazove spadaju neke vrste kornjača i guštera. Biljojedne gmazove potrebno je hraniti mješavinom bilja s visokim vrijednostima celuloze, kalcija i vitamina A, koje sadrže dovoljnu količinu biljnih proteina za osiguravanje energije i nisku razinu šećera, masti, goitrogena, fosfora, oksalata i fitata. Goitrogeni iz biljne hrane u gmazova mogu uzrokovati probleme sa štitnjačom, pa bi trebalo izbjegavati povrće poput kelja, zelja i brokule. Visoka razina šećera u probavnom sustavu biljojeda može izazvati fermentaciju i posljedični nadam, što je osobito opasno u kornjača zbog toga što pritisak unutar celoma može komprimirati pluća i velike krvne žile. Iz tog je razloga uputno izbjegavati voće u svakodnevnoj prehrani biljojednih vrsta. Voće se preporuča davati samo povremeno (npr. jednom u dva tjedna) u manjim količinama.

Oksalati i fitati u biljnoj hrani vežu na sebe kalcij i sprječavaju njegovu resorpciju u probavni sustav, što može biti predispozicija za poremećaje metabolična kalcija i fosfora, pa bi povrće poput špinata, peršina i vlasca trebalo izbjegavati.

Biljojedne gmazove najbolje je hraniti mješavinom samoniklog bilja poput maslačka, trputca, sljeza, pitome koprive, lišća duda, krasule i potočarke. Od ku-

povnih salata preporuča se mješavina crvenog i zelenog radića, rukola, matovilac, endivija, cikorija, korijander i kineski kupus. U prehranu velikih kopnenih kornjača potrebno je dodavati i sijeno koje usporava probavu i na taj način omogućava iskorištavanje hranljivih tvari u pojedinim segmentima crijeva. Nekim vrstama biljojednih guštera, poput bodljorepih agama (*Uromastyx* sp.) osim svježeg zelenog bilja u hranu je potrebno dodavati i mljevene grahorice i cjelovito zrnavlje poput zobi, susama, leće, graha i prosa.

Svejedi

U ovu skupinu spada većina guštera i neke vrste kornjača. Neke su vrste gmazova svejedi od rođenja, dok drugi mijenjaju način prehrane ovisno o starosti, pa su kao juvenilne jedinke mesojedi, dok u odrasloj dobi postaju svejedi.

Svejedne kornjače mogu se hraniti kombinacijom kvalitetnog bilja kako je opisano za biljojedne gmazove i insektima poput cvrčaka, crva brašnara, zoofobasa, larvi crne vojničke muhe, manjim miševima, skakavcima i paličnjacima. Može se davati i sirova riba u manjim količinama, svježe krto meso, pileća jetra i srce, te kvalitetna konzumna peletirana hrana.

Svejednim gušterima poput bradate agame prehrana bi se trebala sastojati od 60 procenata insekata i 40 procenata kvalitetne zelene hrane kako je opisano za biljojede. Od insekata bi trebalo izbjegavati one masne poput crva zbog toga što su bradate agame sklone debljanju i omašćenju jetre.

Jemenski kameleoni bi trebali jesti kombinaciju 40 – 70 procenata insekata i 30 – 60 procenata kvalitetne zelene hrane (Calvert, 2004).

Mesojedni gmazovi

Ovu skupinu dijelimo u gmazove koji se hrane kralješnjacima i one koji se hrane beskralješnjacima. U mesojedne gmazove spadaju sve zmije, te neki gušteri i kornjače. Mesojedi koji se hrane kralješnjacima spadaju u gmazove koje je najjednostavnije hraniti u zatočeništvu, a problemi povezani s prehranom su u njih vrlo rijetki obzirom da jedu cijeli plijen. Visceralni organi kralješnjaka sadrže vitamine topive u vodi i elemente u tragovima, a probavni sustav bogat je vitaminima B12, C i K. Najčešći problemi vezani uz prehranu mesojeda koji se hrane kralješnjacima nastaju kada se životinje hrane predugo smrznutim plijenom, obzirom da takav plijen s vremenom gubi nutritivna svojstva. Također problemi mogu nastati i prilikom hranjenja zmija živim plijenom, poput štakora koji mogu nanijeti ozbiljne ugrizne rane i uzrokovati teške sistemske infekcije. Iz tog se razloga zmije preporuča uvijek hraniti mrtvim plijenom.

Mesojedne gmazove koji se hrane kralješnjacima potrebno je hraniti u skladu s biologijom vrste, a učestalost hranjenja ovisi o dobi i metaboličkim potrebama jedinke. U plijen tih vrsta ubrajaju se glodavci, dvojezupci, ptice, žabe, zmije i manji gušteri, dok se najčešće vrste držane u zatočeništvu obično hrane mi-

ševima i štakorima različite veličine. Neke arborealne zmije je potrebno hranitipticama jer perje plijena prevenira opstipaciju i neophodno je u probavi tih vrsta.

Mesojedni gmazovi, koji se hrane insektima, predstavljaju najugroženiju skupinu gmazova u zatočeništu iz razloga što u prirodi jedu širok raspon različitih vrsta insekata, a izbor komercijalno uzgajanih insekata za hranu je naspram toga vrlo oskudan. Također, vlasnici često hrane gmazove puno većim količinama hrane nego što je potrebno, zbog čega često dolazi do pretilosti i bolesti masne jetre. Računa se da bi mlada bradata agama težine od oko 100 grama trebala pojesti dnevno oko 2 grama cvrčaka i 1 gram zelene hrane (Rendle, 2019).

Insekti koji se mogu davati ovoj skupini gmazova uključuju cvrčke, skakavce, paličnjake, larve crne vojničke muhe, crve brašnjare, zoofobase voštane crve, žohare i larve dudovih svilaca. Preporuča se izbjegavati insekte koji sadrže puno masti i malo ostalih hranjivih tvari poput većine crva. Obzirom da mesojedne vrste gmazova dobivaju hranjive tvari iz svog plijena, komercijalno uzgajana hrana, poput insekata i glodavaca trebala bi biti hranjena hranom koja zadovoljava sve nutritivne potrebe mesojednih gmazova, a insekte je potrebno dodatno suplemetirani vitaminima i mineralima 24 sata prije hranjenja gmazova.

Suplementi

Manjak kalcija vrlo je čest u herbivornih i insektivornih vrsta gmazova, pa se preporuča dodavati ga na hranu u obliku praha ili tekućine. Mladim životinjama u rastu i gravidnim jedinkama, suplemente kalcija potrebno je davati svaki drugi dan, a odraslim, zdravim jedinkama dva do tri puta tjedno, podrazumijevajući da jedu kvalitetnu raznoliku hranu i imaju sve potrebne mikroklimatske uvjete. Suplementi kalcij karbonata ili glubionata trebali bi biti bez dodatka fosfora i vitamina D3.

Dodavanje vitamina topivih u mastima nije preporučljivo u većine vrsta jer su njihove dnevne potrebe u gmazova nepoznanica, a u suvišku mogu izazvati oštećenja jetre i bubrega. Valja također napomenuti da u većine vrsta gmazova, oralno uneseni vitamin D, ne djeluje na isti način kao i vitamin D stvoren u koži uslijed izlaganja adekvatnoj uvB svjetlosti, te kao takav ne predstavlja adekvatnu zamjenu kvalitetnoj uvB rasvjeti.

LITERATURA

1. Baines F.M., Chattell J., Dale J., Garrick D., Gill I., Goetz M., Skelton, T. et al. 2016. How much UVB does my reptile need? The UV-Tool, a guide to the selection of UV lighting for reptiles and amphibians in captivity. *Journal of Zoo and Aquarium Research*, 4(1), 42-63. 2. Baines F., Cusack L.M., (2019): *Environmental Lighting*. In: *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*, third edition (Divers S. J., Stahl S. J., ur.). Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 131-41. 3. Boyer T.H., Scott P.W. 2019. *Nutrition*. U: *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*, third edition (Divers S. J., Stahl S. J., ur.). Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 201-23. 4. Calvert J., 2004. *Nutrition*. In: *BSAVA Manual of Reptiles*, 2nd Edition (Girling S. J., Raiti P., ur.). British Small Animal Veterinary

Association, Gloucester, Ujedinjeno kraljevstvo, 18-39. **5.** Doneley B. 2018. Taxonomy and Introduction to Common Species. U: Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice (Doneley B., Monks D., Johnson R., Carmel B., ur.). Willey Blackwell, Hoboken, USA, 1-14. **6.** Donoghue S., McKeown S., 1999. Nutrition of captive reptiles. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 2(1): 69-91. **7.** <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>, preuzeto 13.08.2022. **8.** Kischinovsky M., Raftery A., Sawmy S., 2018. Husbandry and Nutrition. U: Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice (Doneley B., Monks D., Johnson R., Carmel B., ur.). Wiley Blackwell, Hoboken, USA, 45-60. **9.** O'Malley B., 2005. General anatomy and physiology of reptiles. In: *Clinical anatomy and physiology of exotic species* (O'Malley B., ur.). Elsevier Saunders, London, Ujedinjeno kraljevstvo, 17-39. **10.** Oonincx D., Leeuwen J., 2017. Evidence-based reptile housing and Nutrition. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 20(3): 885-98. **11.** Rendle M. 2019. Nutrition. U: *BSAVA Manual of Reptiles*, third Edition (Girling S. J., Raiti P., ur.). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, Ujedinjeno kraljevstvo, 49-69. **12.** Rossi J.V., 2019. General Husbandry and Management. In: *Mader's Reptile and Amphibian Medicine and Surgery*, third edition (Divers S. J., Stahl S. J., ur.). Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 109-130. **13.** Varga M. 2004. Captive maintenance and welfare. U: *BSAVA Manual of Reptiles*, 2nd Edition (Girling S. J., Raiti P., ur.). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, Ujedinjeno kraljevstvo, 6-17. **14.** Wilkinson Leonatti S., 2015. Reptile wellness management. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 18(2): 281-304.

DIJAGNOSTIČKI POSTUPCI PRI UTVRĐIVANJU BOLESTI GMAZOVA

Maja Lukač

Kratak sadržaj

Klinički pregled gmazova često je vrlo kompleksan radi njihovih anatomskih i fizioloških karakteristika, poput debele kože guštera ili oklopa kornjača. Pojedine vrste gmazova također značajno variraju u veličini, a neke su vrste i otrovne. Kliničar bi također trebao biti upoznat s osnovama manipulacije pojedinim skupinama gmazova.

Sam klinički pregled počinje promatranjem životinje u mirovanju, ako je to moguće. Nakon toga, određuje se kondicija životinja. Klinički pregled organskih sustava obično počinje od glave, no najbolje je prvo raditi manje stresne radnje.

Obzirom da je detaljna klinička pretraga u gmazova vrlo ograničena i često nedovoljna za donošenje pravilne dijagnoze i terapije, za pravilnu dijagnostiku bolesti preporuča se napraviti dodatne dijagnostičke testove poput mikrobioloških pretraga, vađenja krvi, te rendgenoloških i ultrazvučnih pretraga.

Za mikrobiološke pretrage najčeće se uzimaju obrisci raznih promjena ili prirodnih otvora, te ispirci dušnika, ždrijela ili kloake, ovisno o mikroorganizmu na koji se sumnja. Pri vađenju krvi bitno je znati s kojeg mjesta se krv vadi pojedinoj skupini gmazova, koji antikoagulans koristiti kako bi se izbjeglo razaranje krvnih stanica, te koje parametre je potrebno odrediti za pravilnu dijagnostiku bolesti. Pri rendgenološkoj pretrazi potrebno je znati pravilno fiksirati životinju, te odrediti pravilnu poziciju snimanja ovisno o vrsti gmaza i bolesti na koju sumnjamo. Pri interpretaciji rendgenoloških nalaza također je vrlo bitno detaljno pregledati rendgenogram i ne donositi dijagnozu na temelju prve patologije koju uočimo, već nalaz interpretirati zajedno s anamnestičkim podacima i podacima dobivenim kliničkim pregledom.

Ključne riječi: bolesti, dijagnostički postupci, gmazovi

KLINIČKI PREGLED

Kao i u ostalih životinjskih vrsta, kompletan klinički pregled izuzetno je bitan radi postavljanja pravilne dijagnoze i pravilnog liječenja. Za kvalitetan klinički pregled potreban je veterinar educiran iz područja fiziologije i patologije gmazova, te educirano pomoćno osoblje upoznato s postupcima manipulacije raznih vrsta gmazova (Raftery, 2004).

¹Dr. Maja Lukač, DipECZM (Wildlife Population Health), docent, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb, Hrvatska
e-mail adresa autora za korespondenciju:maja.lukac@vef.hr

Anamneza

Danas se zna da većina bolesti gmazova u zatočeništvu proizlazi iz pogreška u držanju i hranjenju, radi čega je sama anamneza jedna od najbitnijih stavki pregleda gmazova. Anamneza bi trebala biti što detaljnija, te obuhvaćati informacije koje će s ostalim dijagnostičkim zahvatima olakšati dijagnostiku problema (Doneley, 2018). Anamnezu možemo podijeliti na općenita pitanja – zašto je životinja dovedena, koliko traju primijećeni simptomi, kada je nabavljena, koliko je stara, koje je podrijetlo životinje, je li prošla karantenu, te je li prethodno bolovala, a ako je, od čega i čime je liječena? Nadalje, veterinaru kliničaru, vrlo su bitna pitanja o samom načinu držanja jedinke u zatočeništvu – tipu nastambe, temperaturnom gradijentu u nastambi (temperature na toplijoj, hladnijoj strani i na mjestu za sunčanje, noćna temperatura, temperatura vode), na koji se način životinja zagrijava (lampe, pločasti, kabelski grijači), osvjetljenju u nastambi (koristi li se uvB rasvjeta, koji tip lampi se koristi, koliko traje fotoperiod, koliko često se lampe mijenjaju, na kojoj su visini smještene u odnosu na životinju), vlazi (kolika je, na koji se način postiže), podaci o oplemenjivanju prostora (koji se supstrat koristi, koje biljke, ima li u nastambi mjesta za skrivanje), higijeni (učestalost čišćenja, kojim sredstvima se obavlja), socijalnoj strukturi u terariju (drži li se životinja sama ili u grupi, ako je u grupi, kako je grupa sastavljena, je li u zadnje vrijeme uvođena nova jedinka u terarij), načinu uzimanja vode (na koji način je životinji ponuđena) i karanteni (je li životinja prošla karantenu, je li testirana na mikro i makroorganizme za vrijeme trajanja karantene). Zadnji set pitanja odnosi se na prehranu – čime se životinja hrani, koliko često i kojim količinama hrane, te upotrebljavaju li se suplementi (ako da, koji i koliko)?

Dobiveni podaci mogu nas uputiti na određeni problem, te usmjeriti na određene dijagnostičke postupke potrebne za dobivanje konačne dijagnoze (Longley, 2010).

Inspekcija

Sam klinički pregled najbolje je započeti pregledom životinje u mirovanju, ako je to moguće. Potrebno je pratiti bilo kakva odstupanja od fizioloških radnji specifičnih za vrstu koja se pregledava. Zdrave jedinke trebale bi imati normalne pokrete ekstremiteta i zauzimati obrambeni stav specifičan za vrstu. Oči bi trebale biti bistre i bez sekreta, a koža i oklop bez promjena. Također bi trebao biti prisutan i normalan refleks ispravljanja. Nemogućnost ispravljanja s dorzuma na ventrum u zmija može upućivati na brojne probleme, poput infekcija neurorespiratornim virusima, dehidraciju, opekline ili opću slabost. Ostale vidljive promjene mogu uključivati mehaničke ozlijede, deformacije ekstremiteta i oklopa u kornjača, otežano/ubrzano disanje, prolaps kloake, nepravilno presvlačenje kože, i sl. (Raftery, 2019).

Nakon pregleda u mirovanju, određuje se kondicija životinje. Obzirom da se u guštera, zalihe masti nalaze u kaudalnom dijelu celoma i repu, pretili gušteri imaju debeli rep i vidljivo proširenje kaudalnog dijela celoma, dok premršavi

gušteri imaju izrazito tanak rep i usukan kaudalni dio tijela, sa zdjelicom koja prominira ispod kože. Vidljivost promjena ovisi o vrsti guštera, te je kondiciju u nekih vrsta lakše odrediti nego u drugih. Mršave zmije imaju vidljivu atrofiju epaksijalne muskulature radi čega im je tijelo više trokutastog oblika, dok pretile životinje imaju vidljiva proširenja kaudalnog dijela celoma i nakupine masti oko kloake. U zmija je zbog anatomskih karakteristika teže procijeniti pretilost nego u ostalih vrsta gmazova, a znakovi su jasno vidljivi u izrazito pretilih jedinki. Premršave kornjače imaju vidljivu atrofiju vratne muskulature i vrlo su lagane, dok pretile imaju vidljive nakupine masti oko prednjih i zadnjih nogu. Nakupine masti oko ekstremiteta lako se mogu zamijeniti s edemima nastalim radi zatajenja bubrega, a stanje se može razlučiti uzimanjem krvi za biokemijsku i hematološku analizu. Vaganje životinja trebalo bi biti sastavni dio pregleda, čime se određuje ne samo gojno stanje, već i stupanj hidracije. Dehidrirane životinje često imaju suhu kožu i usukane oči i celom (Barrows, 2004).

Pregled organskih sustava

Pregled organskih sustava obično počinje od glave i nastavlja se prema repu, no uvijek je najbolje prvo raditi manje stresne radnje, da životinja ne zauzme obrambeni stav i time oteža klinički pregled. Svaki kliničar ima svoj način pregleda organskih sustava gmazova, a opća je prepruka da se pregled organskih sustava uvijek vrši na jednak način (Raftery, 2004).

Rostrum gmazova potrebno je pregledati na znakove ozljeda, koje mogu biti vrlo čest znak stresa u životinja koje pokušavaju izići iz nastambe i pri tome udaraju glavom u njene stjenke ili posljedica borbe s drugom životinjom u nastambi sa nepravilno složenom socijalnom strukturom grupe. U kornjača treba obratiti pažnju na duljinu kljuna. Predugi kljun može biti znak nepravilne prehrane ili metaboličkih problema. Nosnice bi trebale biti čiste i bez sadržaja, osim u vrsta koje imaju slanske žlijezde. Slušni aparat u gmazova predstavlja organ koji je vrlo ograničen za pregled. Zmije imaju samo unutarnje uho, dok gušteri, kornjače i krokodili imaju srednje i unutarnje uho (Raiti, 2010). Timpanične membrane tih vrsta potrebno je pregledati na bilo kakve promjene poput apscesa, nakupljanja tekućine, ektoparazita, zaostale kože, traume i sl. Oči gmazova razlikuju se ovisno o vrsti, pa tako zmije, neki skinkovi i gekoni imaju prozirnu kožu koja prekriva oko, a ona može zaostati prilikom presvlačenja. Blefaritis s otečenjem kapaka i konjunktiva čest je u kornjača i guštera uslijed bakterijskih, gljivičnih ili virusnih infekcija, a nastaje i kao posljedica nedostatka vitamina A i zatajenja bubrega. Usna šupljina pregledava se nakon otvaranja usta odgovarajućim instrumentima. Oni bi trebali biti sigurni za životinju, te bi se trebali dati lako dezinficirati (Barten, 2014). Zmijama je usta najlakše otvarati pincetom, a kornjačama peanima. Većini guštera usta se otvaraju na način da se jednom rukom povlači gornja čeljust, a drugom rukom koža donje čeljusti.

Zdrava sluznica usne šupljine u većine je vrsta gmazova blijedo – ružičaste boje, a neke vrste poput kameleona i varana imaju pigmentiranu sluznicu usne

šupljine. Zubi gmazova, ovisno o skupini dijele se u pleurodontne zube (sve zmije i većina guštera), dentalne ploče (kornjače) ili akroodontne zube (agame i kameleoni). Akroodontni zubi čvrsto su vezani uz kost i ne zamjenjuju se tokom života poput pleuroodontnih pa ih je potrebno pregledati na znakove nakupljanja kamenca i parodontne bolesti (Eatwell, 2010). Jezik je u kornjača debeo i mesnat i ne može se u potpunosti izvući iz usne šupljine. Zmije i varani imaju aktivan jezik kojim njuše, a nalazi se u vrećastoj tvorbi ispred glotisa. Većina guštera ima mesnati jezik koji se više ili manje može izvući iz usne šupljine, dok kameleoni imaju vrlo dugačak jezik kojim hvataju plijen. Nemogućnost hvatanja plijena jezikom u ove vrste, često je prvi znak metaboličkih problema, obzirom da se u jeziku nalazi kost.

Glottis je smješten u dnu usne šupljine iza jezika. Zbog njegovog položaja, teže ga je pregledati u kornjača i guštera, dok je u zmija glottis smješten u prednjem dijelu usne šupljine i jednostavno ga je pregledati. U zdravih životinja, iz glottisa se ne bi trebao cijediti nikakav sekret.

Kožu gmazova potrebno je detaljno pregledati na prisustvo ozlijeda, opekli-
na, ožiljaka, znakova septikemije, dehidracije, ektoparazite, zaostalu kožu, promjene boje ili strukture i sl (Jessop, 2010). Na koži guštera su vidljive sekretorne žlijezde koje se nalaze na ventralnoj strani zadnjih nogu u femoralnoj regiji ispred ili iza kloake. Te su žlijezde obično bolje razvijene u mužjaka. Neke zmije također imaju mirisne žlijezde s obje strane kloake koje nisu vidljive na vanjskoj površini kože. Koštani sustav i mišićje potrebno je pregledati na bilo kakve znakove deformacija, prijeloma, atrofije i sl.

Palpacija

Palpacija celomne šupljine je u gmazova ograničena zbog debele kože i oklopa u kornjača. U kornjača je moguće palpirati celomnu šupljinu kroz preforalne otvore, a u većih je jedinki moguća i digitalna palpacija kloake. U guštera i zmija, palpacija celomne šupljine nešto je jednostavnija, no valja imati na umu da palpacijom ne možemo kao u sisavaca odrediti oblik i veličinu organa, već samo uočiti neke promjene poput tumora, pstipacije, graviditeta, mokraćnih kamenaca i sl.

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mikrobiološke pretrage

Uzorci za mikrobiološke pretrage najčešće podrazumijevaju obriske rana, prirodnih otvora ili kože, te ispirke kloake, želuca, nosnica i dušnika. Od uginulih životinja, a ovisno o sumnji na određeni mikroorganizam, uzimaju se razna tkiva i organi. Obrisci rana najčešće se uzimaju za standardnu mikrobiološku pretragu i određivanje antimikrobne osjetljivosti s ciljem brze i ciljane terapije ranjene jedinke. Pri izboru antibiotika, valja imati na umu da u gmazova uglavnom prevladava gram neaktivna bakterijska flora (Lukač i sur., 2017). Također nalaz bak-

terija u obriscima prirodnih otvora ne zahtijeva terapiju životinje, ako jedinka ne pokazuje kliničke simptome bolesti, obzirom da je miješana bakterijska flora normalan nalaz prirodnih otvora gmazova, a često je povezana i sa prehranom i načinom držanja jedinki. Obrisci ždrijela i kloake, te ispirci nosnica i dušnika, obično se uzimaju u svrhu dijagnostike raznih virusa i mikoplazmi, te se u tom slučaju radi molekularna dijagnostika bolesti. Upala gornjih dišnih prohoda povezana sa infekcijom mikoplazmama vrlo je česta u kopnenih kornjača, dok su neurorespiratorni virusi izrazito česti u zmija. Obrisci kože najčešće se uzimaju u guštera i zmija s promjenama kože u svrhu detekcije bakterije *Devriesea agamarrum* i gljivice *Nannizziopsis vriesii* u guštera, te gljivice *Ophidiomyces ophiodiicola* u zmija (Ossiboff, 2018; Rodriguez, 2018).

Parazitološka pretraga

Uzorke izmeta za pretragu na crijevne parazite preporuča se uzimati minimalno prilikom nabavke nove životinje i prije hibernacije (Pasmans, 2008). Prilikom svakog pregleda bolesne životinje, dobro je uputiti vlasnika da donese izmet životinje. Paraziti ne moraju biti izravan uzrok bolesti, ali se mogu namnožiti i uzrokovati probleme u životinja s oslabljenim imunitetom. Izmet gmazova može se pregledati mikroskopski, nativnim preparatom ili flotacijom raznim flotacijskim tekućinama. U izmetu zmija čest je nalaz pseudoparazita iz plijena koje je potrebno prepoznati pa takve životinje nije potrebno tretirati protiv parazita. Osim izmeta, u svrhu dokaza kriptosporidija zmija, mogu se uzimati i ispirci želuca obzirom da kriptosporidije zmija ne moraju uvijek lučiti u izmet (Bogan, 2019).

Krvne pretrage

Zbog ograničenosti kliničkog pregleda gmazova, krvne pretrage vrlo su korisne u dijagnostici bolesti gmazova. Obzirom da krvne stanice gmazova sadrže jezgre, krv je najbolje vaditi na litij ili natrij heparin, obzirom da EDTA razara stanice s jezgrom. Zbog istog se razloga hematološka krvna slika gmazova ne može određivati pomoću automatskih brojača, već isključivo ručno. Hematološkom pretragom, najčešće se mogu ustanoviti poremećaji kao što su anemije, upale, parazitemije i promjene hematopoetskog tkiva. Kompletna krvna slika gmazova obuhvaća crvenu i bijelu krvnu sliku. Crvenu krvnu sliku čine ukupan broj eritrocita, hematokrit, koncentracija hemoglobina i eritrocitne konstante, a bijelu ukupan broj leukocita, diferencijalna krvna slika te morfološka procjena krvnih stanica (Belić, 2017). Bikoemijska analiza krvi nam daje nam uvid u stanje unutarnjih organa, poput jetre i bubrega, te je vrlo korisna pri dijagnostici metaboličkih poremećaja. U većine vrsta gmazova krvne žile nisu vidljive zbog debele kože, te je potrebno znati postupak vađenja za svako pojedino mjesto.

Krv se kornjačama najčešće vadi iz dorzalne repne vene, jugularne vene i okcipitalnog sinusa, dok se supravertebralni sinus koristi samo pri eutanaziji ži-

votinja, jer se pri vađenju krvi s tog mjesta mogu oštetiti vratni kralješci (Hernandez – Divers, 2005).

U malih kornjača čiji je plastron još mekan, krv se može izvaditi i iz srca, na mjestu spoja humeralne i pektoralne pločice plastrona, no u tom je slučaju moguće izvaditi samo malu količinu krvi kako ne bismo ozlijedili životinju.

Glavno mjesto vađenja krvi u zmija je ventralna repna vena, a krv je moguće izvaditi i iz srca. Za pristup jugularnoj veni potrebno je preparirati kožu te se takav zahvat radi u općoj anesteziji i ne koristi se za rutinsku dijagnostiku.

Gušterima se krv može vaditi iz ventralne ili lateralne repne vene, abdominalne vene, jezične vene i brahijalnog pleksusa (Heard, 2004).

Krokodilima se krv najčešće vadi iz ventralne ili lateralne repne vene i supravertebralnog sinusa.

Prilikom vađenja krvi, treba imati na umu da uz mnoge krvne žile gmazova prolaze i limfne i da krv može prilikom vađenja biti razrijeđena limfom što kompromitira hematološke i biokemijske nalaze krvi. Pri interpretaciji krvnih nalaza, valja imati na umu da svaka vrsta gmaza ima svoje referentne intervale pojedinih krvnih parametara koji ne variraju samo između različitih vrsta, već i unutar same vrste ovisno o spolu, godišnjem dobu, starosti životinje i sl. (Campbell, 2007). Zdravim gmazovima sigurno je izvaditi 10 procenata ukupnog volumena krvi.

SLIKOVNA DIJAGNOSTIKA

Rendgenološka dijagnostika

Rendgenološka dijagnostika vrlo je korisna u dijagnostici bolesti gmazova obzirom da su palpacija i auskultacija vrlo ograničene oklopom i debelom kožom. Indikacije su brojne: dijagnostika i patologija graviditeta, trauma, metaboličke promjene kostiju, kongenitalne deformacije, opstipacije, strana tijela, krvarenja, osteomijelitis kao posljedica traume i mnoge druge. U kornjača se najčešće snimaju dorzo – ventralna i kranio – kaudalna projekcija, a u guštera i zmija, ovisno o vrsti i indikaciji dorzo – ventralna ili latero – lateralna projekcija. Kranio – kaudalna projekcija u kornjača vrlo je korisna pri dijagnostici upale pluća, dokaza strnog tijela u probavnom sustavu ili povećanja jetre. Dorzo – ventralnom projekcijom najlakše uočavamo promjene koštanog (deformacije i lomovi) i probavnog sustava (opstipacija), te graviditet i distocije (Pees, 2011).

U gmazova je moguće izvoditi i kontrastnu radiografiju, pri čemu se koristi barijev sulfat razrijeđen sa vodom 1:2, koji se aplicira sondom direktno u želudac. Najčešće indikacije uključuju strana tijela u probavnom sustavu i provjeru mjesta postavljanja ezofagostomalnog tubusa. Brzina prolaza kontrastnog sredstva ovisi o stupnju zagrijanosti i statusu hidracije organizma, a puno je sporija u biljojednih nego u mesojednih vrsta gmazova zbog kompleksnosti probavnog sustava (Heard, 2004).

Ultrazvučna dijagnostika

Ultrazvučna dijagnostika, neinvazivna je metoda koja se može često ponavljati. U većini slučajeva ne zahtijeva sedaciju ili opću anesteziju životinja. Indikacije su brojne, poput determinacije spola, dijagnostike stupnja graviditeta, stanja unutarnjih organa, detekcije tumora i slično. Obzirom na debelu kožu gmazova pri ultrazvučnoj pretrazi potrebno je nanijeti deblji sloj gela na kožu. Većina pretraga se radi s frekvencijama između 7 – 12 MHz, a u većih vrsta nižim frekvencijama od 5 – 3 MHz (Pees, 2011).

Endoskopija

Endoskopija predstavlja vrlo korisnu dijagnostičku metodu i jedinu pri kojoj se organi u živoj životinji vide u prirodnoj veličini, obliku, poziciji i boji. Samo izvođenje endoskopije zahtijeva skupu opremu, te puno iskustva i prakse. Indikacije su brojne, poput determinacije spola mladih i monomorfnih vrsta, praćenja spolnog ciklusa, dijagnostike promjena unutarnjih organa, stranih tijela i sl. Tehnike izvođenja mogu se podijeliti na invazivne koje zahtijevaju opću anesteziju jer se endoskopom ulazi u celomnu šupljinu (pleuroperitonealna endoskopija) i neinvazivne, pri čemu se endoskopom ulazi u prirodne otvore (traheoskopija, pulmoskopija, ezofagoskopija, gastroskopija). Endoskopske pretrage mogu se izvoditi rigidnim ili fleksibilnim endoskopom, a za većinu vrsta gmazova koriste se endoskopi širine 1,9 – 4 mm (Silverman, 2005).

LITERATURA

1. Barrows M., McArthur S., Wilkinson R. 2004. Diagnosis. In: *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles* (McArthur S., Wilkinson R., Meyer J., eds.). Blackwell Publishing, Ltd, Oxford, England, 109-140. **2.** Barten, S.L., Fleming, G.J. 2014. Current herpetologic husbandry and products. In: *Current Therapy in Reptile Medicine and Surgery* (Mader D.R., Divers S.J., eds.). Elsevier Saunders, St Louis, 2-12. **3.** Belić, M., Turk, R., Lukač, M., Veršec, I., Robić, M. 2017. Hematologija gmazova. *Veterinarska stanica*, 48 (5), 379-90. **4.** Bogan J.E.Jr. 2019. Gastric Cryptosporidiosis in Snakes, a Review. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 29(3-4), 71-86. **5.** Campbell, T., Ellis C., 2007. *Avian and exotic animal hematology and cytology*. Ames, Iowa: Blackwell. **6.** Doneley, B., Carmel B., 2018. The Reptile Consultation. In: *Reptile Medicine and Surgery in Clinical Practice* (Doneley B., Monks D., Johnson R., Carmel B., eds.). Wiley Blackwell, Hoboken, USA, 125 – 33. **7.** Eatwell, K. 2010. Lizards. In: *BSAVA Manual of Exotic Pets, fifth Edition* (Meredith, A., Johnson – Delaney C., eds.). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, Ujedinjeno kraljevstvo, 273– 293. **8.** Heard, D., Harr K., Wellehan J. 2004. Diagnostic sampling and laboratory tests. In: *BSAVA Manual of Reptiles, 2nd Edition* (Girling, S. J., Raiti P., eds.). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, Ujedinjeno kraljevstvo, 71 – 87. **9.** Hernandez – Divers, S.J. 2005. Diagnostic Techniques. In: *Reptile Medicine and Surgery, Second Edition* (Mader, D. R., ed.). Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 490 – 532. **10.** Jessop, M., Bennett T.D. 2010. Tortoises and turtles. U: *BSAVA Manual of Exotic Pets, fifth Edition* (Meredith, A., Johnson – Delaney C., eds.). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, Ujedinjeno kraljevstvo, 249 – 272. **11.** Longley L. 2010. Reptiles

– an introduction. In: Small Animal Exotic Pet medicine (Nind F, Longley L., ed.). Elsevier Saunders, New York, USA, 111 – 29. **12.** Lukač, M., Horvatek Tomić, D., Mandac, Z., Mihoković, S., Prukner-Radovčić, E. 2017. Aerobna bakterijska i gljivična flora usne šupljine i kloake kravosasa (*Elaphe quatuorlineata*) u Hrvatskoj. Veterinarski arhiv, 87 (3): 351-61. **13.** Ossiboff, R.J. 2018. Serpentes. In: Pathology of Wildlife and Zoo Animals (Terio, K. A., McAloose D., St. Leger J., eds.). Elsevier, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, 897 – 919. **14.** Pasmans F, Blahak S, Martel A, Pantchev N. 2008. Introducing reptiles into a captive collection: the role of the veterinarian. The Veterinary Journal, 175(1):53-68. **15.** Pees. M. 2011. Radiographic Investigation. In: Diagnostic Imaging of Exotic Pets (Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, M.E., Pees M., Tully T., eds.). Schlutersche Verlagsgesellschaft mbH & Co., Hanover, Njemačka, 310 – 333. **16.** Raftery A. 2004. Clinical examination. U: BSAVA Manual of Reptiles, 2nd Edition (Girling S. Raiti P. ed.). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, Ujedinjeno kraljevstvo, 51 – 63. **17.** Raftery A., 2019. Clinical examination. In: U: BSAVA Manual of Reptiles, third Edition (Girling S.J., Raiti P. eds.). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, Ujedinjeno kraljevstvo, 89 – 100. **18.** Raiti, P. 2010. Snakes. U: BSAVA Manual of Exotic Pets, fifth Edition (Meredith, A., Johnson – Delaney C., ur.). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, Ujedinjeno kraljevstvo, 294– 315. **19.** Rodriguez, C.A., Henao Duque A.M., Steinberg J., Woodburn D.B. 2018. Chelonia. U: Pathology of Wildlife and Zoo Animals (Terio, K. A., McAloose D., St. Leger J., eds.). Elsevier, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, 825 – 54. **20.** Silverman, S. 2005, Diagnostic Imaging. In: Reptile Medicine and Surgery, Second Edition (Mader, D. R., ur.). Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 471 – 89.

AFRIČKI PATULJASTI JEŽEVI – ŠTA ZNAMO DO SADA?

Miloš Vučićević

Kratak sadržaj

Afrički patuljasti ježevi su monogastrični svaštojedi, prosečnog životnog veka u zatočeništvu oko četiri godine. Aktivni su tokom noći, solitarni su i mogu se socijalizovati da budu pitomi ljubimci. Osetljivi su na promene temperature i one niže od 18 °C ih uvode u dormaciju koja je štetna po njihovo zdravlje. Krzno im je položeno do podloge te je neophodno svaki dan proveriti prisustvo dlaka ili končića oko ekstremiteta. Veoma rano, već u drugoj godini života ježeva pojavljuju se bolesti koje mogu značajno uticati na kvalitet i dužinu njihovog života. Česte su ektoparazitoze koje se karakterišu intenzivnim pruritusom i opadanjem bodlji. Kod mladih, promene su uglavnom u predelu lica, dok su kod starijih jedinki one na dorzalnom delu tela. Okoštavanje kičme je prisutno već od 18 meseci starosti i manifestuje se otežanim defeciranjem i kretanjem. Wobbly hedgehog syndrome je progresivno neurodegenerativno oboljenje, zastupljeno kod oko 50% jedinki i često je i u populaciji ježeva u našoj zemlji. Neoplazme su takođe često zastupljene i najčešće se uočavaju one u usnoj duplji i neoplazme materice (uz krvarenja iz vagine). Histopatološka ispitivanja tumora rađena na uzorcima iz Nastavne bolnice za male životinje Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu ukazala su na veliku zastupljenost promena sa malignim potencijalom, sa izuzetkom tumora materice koji su najčešće benigne prirode. Kod starijih jedinki su česti problemi sa zubima i desnama. Sve navedeno ukazuje na značaj redovnih kontrolnih pregleda, prema našoj proceni, optimalno na svaka tri meseca. Brzina napredovanja procesa uslovljava da uspešnost mnogih intervencija zavisi od toga da li su promene dijagnostikovane u ranoj fazi bolesti zbog toga što je stopa izlečenja značajno manja ukoliko je jedinka iscrpljena bolešću. Takođe, preventivne intervencije, kao što je ovariohisterektomija mogu povoljno uticati na kvalitet života.

Ključne reči: afrički patuljasti jež, *Ateletrix albiventris*, Wobbly hedgehog syndrome

BIOLOGIJA, ANATOMIJA I FIZIOLOGIJA AFRIČKOG PATULJASTOG JEŽA

Afrički patuljasti jež (*Ateletrix albiventris*) je vrsta poreklom iz centralne i zapadne Afrike. Pripada redu insektivora i porodici *Erinaceidae*. Prirodno stanište za ove životinje su savane, žbunovita i kamenovita područja. One su aktiv-

¹Dr sci. vet. med. Miloš Vučićević, docent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, R. Srbija
e-mail adresa autora za korespondenciju: vucicevic@vet.bg.ac.rs

ne noću i uglavnom solitarne. Sa drugim jedinkama svoje vrste dolaze u kontakt jedino za vreme parenja i u periodu odgoja mladunčadi (Santana i sar., 2010). Hibernacija se kao fiziološko stanje za evropske šumske ježeve, ne javlja kod afričkog patuljastog ježa. Ukoliko su ove jedinke izložene niskim temperaturama, ulaze u stanje dormacije praćeno padom mentalne i motorne aktivnosti i parcijalnom ili kompletnom areaktivnošću, koje je uzrokovano usporavanjem metaboličkih funkcija organizma. Kako zdrave jedinke u prirodnim uslovima ne dolaze u ovo stanje, ono se smatra nepoželjnim i potencijalno životno ugrožavajućim kod afričkog patuljastog ježa.

Jedna od najuočljivijih anatomske karakteristike ove vrste su kutane bodlje koje pokrivaju čitav dorzum. Njihova dužina može da bude između 0,5 i 2 cm. Iako su varijacije u boji moguće, najčešće su smeđe-bele (Wissink-Argilaga, 2020). Bodlje su u svom korenu povezane sa mišćnim vlaknima koja omogućavaju njihovo kontrolisano podizanje i spuštanje. Ostatak tela, odnosno kaputum, toraks, abdomen, ingvinalna regija i ekstremiteti su pokriveni retkom dlakom najčešće bele boje. Kada je jež uplašen, osim podizanja bodlji, dolazi i do kontrakcije *m. panniculus carnosus*, što dovodi do sklupčavanja, dok kontrakcija *m. circulus orbicularis* izaziva prevlačenje kože lateralnog abdomena (tzv. suknje) preko uvučenih ekstremiteta i glave (Ivey i Carpenter 2012). Bodlje bivaju zamenjene prvi put tokom maturacije, kada se meke bodlje mladunaca menjaju čvršćim, a potom tokom života, individualno, na svakih 12 do 18 meseci.

Vid afričkih patuljastih ježeva je loš i daleko se više oslanjaju na druga čula za snalaženje u prostoru i pronalaženje hrane (Johnson, 2006).

Ježevi su monogastrične životinje, kod kojih postoji refleks vomitusa (Meredith i Delaney, 2010). Ova vrsta spada u brahidonte s zubnom formulom I3/2:-C1/1:P3/2:M3/3 (Ivey i Carpenter, 2012). Zbog plitkog korena zuba, sklone su dentalnim patološkim stanjima.

Tabela 1. Osnovni biološki podaci o afričkim patuljastim ježevima

Telesna masa	mužjaci – 400-700 g
	ženke – 300-600 g
Životni vek	4-6 godina
	7+ godina (anegdotalno)
Puls	180-280 o/min
Respiracije	25-50 r/min
Rektalna temperetura	(35,4-37 °C)

Ponašanje karakteristično za oba pola ove vrste, kako u zatočeništvu tako i u divljini, je nanošenje pljuvačke na bodlje. Ovaj oblik ponašanja je najčešće stimulisan prisustvom nepoznatog ili iritabilnog mirisa, što stimuliše hiperprodukciju pljuvačke. Sam proces može trajati i preko 10 minuta.

Vokalizacija afričkih patuljastih ježeva se manifestuje velikim brojem različitih zvukova, naročito kod jedinki koje su uplašene, trpe izrazitu bolnost ili kod mužjaka prilikom parenja.

Određivanje pola kod afričkog patuljastog ježa je relativno jednostavno. Kod mužjaka je anogenitalna distanca veća, a testisi se nalaze intraabdominalno. Ta kođe su prisutne i akcesorne polne žlezde koje u periodu polne aktivnosti mogu biti značajno uvećane. Kod ženki, anogenitalna distanca je znatno manja. Prvo parenje kod afričkog patuljastog ježa najčešće dolazi sa 6 do 8 meseci, iako postoje podaci da polna zrelost nastupa već oko drugog meseca starosti. Estrus traje 3 do 17 dana, a postoje podaci o indukovanoj ovulaciji kod ove vrste. Period gestacije iznosi 34 do 37 dana, a ženke imaju legla sa 1 do 7 mladih. Partus u zatočeništvu uglavnom nastupa noću, a kanibalizam može biti prisutan ukoliko je majka izložena stresogenim faktorima (Meredith i Delaney, 2010). Kolostrum se luči u prvih 12 do 72h, a u slučaju odgajanja mladunaca bez majke, može se koristiti mleko u prahu za ishranu novorođenih mačića. Mladunci sisaju 4 do 6 nedelja, a čvrstu hranu počinju da jedu od 3. nedelje života (Carpenter and Marion, 2017).

OPŠTI KLINIČKI PREGLED I OSNOVNE DIJAGNOSTIČKE PROCEDURE

Prilikom uzimanja anamneze od vlasnika afričkog patuljastog ježa, trebalo bi prikupiti informacije o načinu držanja i ishrane, zbog toga što mnoga patološka stanja koja se pojavljuju kod ove vrste životinja mogu biti posledica grešaka u držanju. Većina afričkih patuljastih ježeva će se sklupčati odmah po vađenju iz transportera i to znatno otežava klinički pregled. Jednika koja se oseća ugroženo proizvodiće zvuke pri ekspirijumu koji mogu da podsećaju na kijanje, ali ih ne treba pomešati s patološkim respiratornim zvucima (Headly, 2014). Ježa treba spustiti na sto za pregled i dati mu vremena da se opusti u novoj sredini. Gruba procena stanja ekstremiteta može biti izvršena postavljanjem ježa u providnu kutiju i posmatranjem kutije sa donje strane. Ukoliko je afrički patuljasti jež sklupčan, uzimanje jedinke u jednu ruku tako da ventrum bude u kontaktu sa šakom (upotreba zaštitnih rukavica može biti potrebna), ljuljanje ili stavljanje u plitku toplu vodu mogu stimulisati životinju da se otklupča. Merenje telesne temperature može biti stresno za jedinku i najčešće ne daje relevantan rezultat, obzirom da u stresnoj situaciji životinja ima povišenu telesnu temperaturu. Adspekcija i procena kretanja se vrše na ravnoj površini stola za pregled. Auskultacija grudnog koša i palpacija abdomena nisu uvek moguće kod manje saradljivih jedinki. Ukoliko je moguće, vrši se i pregled usne duplje i zuba. Za otvaranje usta se mogu koristiti štapići za uši ili drveni štapić. Pregled spoljašnjeg ušnog kanala se vrši otoskopom. Osnovni neurološki pregled kod budne životinje je sličan onom kod pasa i mačaka i trebalo bi da obuhvati procenu funkcije kranijalnih nerava i procenu propriocepcije (Berg i sar., 2021).

Kod afričkih patuljastih ježeva, obavljanje detaljnog kliničkog pregleda uz uzimanje uzoraka krvi nije moguće bez uvođenja u opštu inhalacionu anesteziju.

Jedinka se postavlja u anesteziološki boks a nakon ulaska u anesteziju, prebacuje se maska. Na oči treba naneti malu količinu kapi ili gela kako bi se sprečilo sušenje rožnjače.

Kod egzotičnih životinja je bezbedna količina krvi za uzorkovanje 1% telesne mase. Ipak, kod jedinki lošijeg opšteg stanja poželjno je uzorkovati maksimalno 0,5%. Za uzorkovanje krvi se mogu koristiti *v. cava cranialis*, *v. jugularis* za veće količine uzorka, a *v. cephalica* i *v. femoralis* za manje količine. Za uzorkovanje iz *v. cava cranialis* se koristi brizgalica od 1ml sa iglom promera 25 ili 27 G. Iгла su uvodi direktno uz mesto uzglobljavanja klavikule i manubrijuma, pod uglom od 20° u od osu na suprotni kuk. Nakon uvođenja igle, polako se započinje s izvlačenjem uz konstantno blago povlačenje klipa do pojave krvi u brizgalici. Poznate su referentne vrednosti za hematološke i biohemijske analize krvi afričkog patuljastog ježa (Ivey i Carpenter 2004).

Uzorkovanje urina može biti izvršeno skupljanjem uzorka nakon slobodnog uriniranja, kateterizacijom ili ultrazvučno vođenom cistocintezom, s tim da poslednje dve metode zahtevaju opštu anesteziju i analgeziju (Wissink-Argilaga, 2020). Referentne vrednosti za parametre uzorka urina afričkog patuljastog ježa još uvek nisu utvrđene. Prisustvo eritrocita, leukocita, skvamoznih ćelija, ćelija visokog mitotskog indeksa i proteina može se smatrati nefiziološkim (Evans i Souza, 2010).

Uzorkovanje izmeta se vrši sakupljanjem uzorka nakon slobodne defekacije ili uzimanjem rektalnog brisa (Wissink-Argilaga, 2020). Uzorkovanje se najčešće vrši radi izvođenja parazitoloških analiza.

Prema iskustvu autora, ultrazvučni pregled kod afričkog patuljastog ježa se može izvoditi i bez opšte inhalacione anestezije kod saradljivih jedinki. Za pregled se može koristiti konveksna ili linearna sonda, frekvence preko 8 MHz. Čest i slučajan nalaz je uvećanje nadbubrežnih žlezda.

Rendgensko snimanje kod afričkog patuljastog ježa se ne razlikuje značajno od rendgenskog snimanja drugih malih životinja. Kod nesaradljivih jedinki preporučuje se opšta inhalaciona anestezija.

NADOKNADA TEČNOSTI I APLIKACIJA LEKOVA

Specifične potrebe za nadoknadu tečnosti kod afričkog patuljastog ježa nisu utvrđene, te se kod ove vrste upotrebljava formula 100 ml/kgTM/dnevno. Put aplikacije tečnosti može biti subkutani, intravenski, intraperitonealni i intraosealni. Prednost subkutane aplikacije tečnosti u bolusu su brzina i jednostavnost. Poželjno mesto aplikacije je prelaz dorzuma prekrivenog bodljama u ventrum. Brža resorpcija tečnosti se postiže intraperitonealnom ili intraosealnom aplikacijom, ali ova dva puta zahtevaju da jedinka bude anestezirana. Intravenski kateter može da se postavi jedinkama u opštoj anesteziji ali je fiksiranje i održavanje katetera otežano kod budnih životinja (Headly, 2014).

Ne postoje lekovi koji su registrovani za primenu kod afričkih patuljastih ježeva, već se koriste lekovi namenjeni za primenu kod pasa i mačaka, kao i lekovi

iz humane palete (Joanna Headly, 2014). Lekovi koji se upotrebljavaju kod afričkih patuljastih ježeva i njihove doze i putevi aplikacije, navedeni su u literaturi (Carpenter i Marion, 2017).

OBOLJENJA KOŽE

Šuga je jedno od najčešćih kožnih oboljenja kod afričkih patuljastih ježeva i infekcije vrstama iz rodova *Caparinia*, *Chorioptes* i *Notoedres* su veoma česte. Prema iskustvu autora, skoro svi afrički patuljasti ježevi imaju određen broj ovih parazita na koži. Infekcije su najčešće supkliničke, ali se mogu manifestovati pruritusom, seborejom, perutanjem, opadanjem dlake i bodlji uz stvaranje rana na koži uzrokovanih češanjem. Predilekciona mesta su leđa i glava. Dijagnoza se postavlja na osnovu mikroskopskog pregleda skarifikata ili selotejp uzorka kože. Terapija se vrši višekratnom aplikacijom ivermektina u razmaku od 14 dana. Sredinu u kojoj je jedinka boravila i sve površine sa kojima je dolazila u kontakt treba dezinfikovati nakon primene terapije.

Dermatofitoza uzrokovana rodovima *Trichophyton* i *Microsporum* je oboljenje sa zoonoznim potencijalom koje se sporadično pojavljuje kod afričkih patuljastih ježeva. Predilekciono mesto za pojavu simptoma ovog oboljenja su leđa. Dijagnoza se postavlja na osnovu mikrobiološkog pregleda (Weishaupt i sar, 2014), a ovo stanje se leči topikalnom primenom antimikotika.

Piodermija afričkih patuljastih ježeva se pojavljuje pretežno kod gojaznih jedinki, koje ne mogu da ispoljavaju fiziološke higijenske oblike ponašanja. Ulažna vrata za piogene bakterije su laceracije nastale na koži koje su posledica trenja. Stanje se manifestuje gubitkom dlake, crvenilom kože, otokom i pojavom iscetka. Dijagnoza se postavlja mikroskopskim pregledom otisak preparata i mikrobiološkim pregledom. Ovo stanje se tretira primenom sistemskih i lokanih antibiotika prema antibiogramu (Quesenberry i Carpenter, 2011).

Upala spoljašnjeg ušnog kanala može biti uzrokovana infekcijom šugarcem iz roda *Notoedres* ili bakterijama iz rodova *Pseudomonas* ili *Streptococcus*. U slučaju da je u spoljašnjem ušnom kanalu prisutan šugarac, javlja se pruritus uz nalaz krasta. Kod bakterijskih infekcija spoljašnjeg ušnog kanala javlja se iscedak iz uha, često neprijatnog mirisa. Dijagnoza se postavlja na osnovu mikroskopskog pregleda brisa ušnog kanala i mikrobiološkog pregleda. Terapija zavisi od uzročnika i podrazumeva sistemsku i lokalnu primenu antibiotika i antiparazitika.

U literaturi postoje podaci o alergijskim i autoimunim oboljenjima kože kod afričkog patuljastog ježa ali je njihova zastupljenost veoma niska (Quesenberry i Carpenter, 2011).

OBOLJENJA OKA

Traumatske povrede oka kod afričkih patuljastih ježeva su veoma česte zbog činjenice da su u pitanju noćne životinje koje se slabo oslanjaju na čulo vida, kao i činjenice da im se oči nalaze u blago egzoftalmičnom položaju. Ukoliko je

povreda oka značajna, preporučuje se enukleacija. Afrički patuljasti ježeви dobro podnose ovu proceduru i ne primećuje se razlika u kvalitetu života kod jedinki nakon enukleacije jednog ili čak oba oka (Williams i sar., 2017). Kod starijih jedinki obavezno treba proveriti da li se retrobularno nalazi masa (apsces ili tumor) koja potiskuje oko ka spolja.

PATOLOGIJA ZUBA I USNE DUPLJE

Patologija zuba i usne duplje je veoma česta kod afričkih patuljastih ježeva i uključuje stvaranje kamenca, periodontitis, gingivitis, recesiju gingiva i frakture zuba. Takođe, trauma usne duplje, usled pada ili alotriofagije, može da nastane kod afričkih patuljastih ježeva. Kliničke manifestacije svih navedenih oboljenja su smanjen unos hrane, pojačana salivacija i gubitak telesne mase. Dijagnoza se postavlja pregledom usne duplje i po potrebi, radiološkim snimanjem. Sanacija nakupljanja kamenca na zubima se vrši na isti način kao kod pasa i mačaka. Kod frakture zuba indikovana je ekstrakcija. Upale desni se leče antibioticima i glukokortikosteroidima.

OBOLJENJA GASTROINTESTINALNOG SISTEMA I JETRE

Ulkus želuca afričkog patuljastog ježa se manifestuje prevashodno pojavom melene uz bolnost abdomena i smanjenje telesne mase. Dijagnoza se postavlja posredno, isključivanjem drugih diferencijalnih dijagnoza, kao što su bakterijski enteritisi, parazitoze ili prisustvo stranog tela. Terapija ulkusa želuca uključuje primenu blokatora protonske pumpe, parenteralnu ishranu i nadoknadu tečnosti.

Enteritisi su jedno od najčešćih oboljenja digestivnog sistema afričkih patuljastih ježeva. U većini slučajeva oni su uzrokovani bakterijama iz familije *Enterobacteriaceae* ili parazitima iz roda *Giardia*. Klinički simptomi enteritisa obuhvataju: letargiju, smanjen apetit, anoreksiju i izmenjen izgled i konzistenciju fecesa. Abdomen je bolan na palpaciju i u nekim slučajevima mogu da se pojave primese krvi u fecesu. Da bi se utvrdio uzročnik zapaljenja potrebno je uraditi koprološku analizu. Terapija oboljenja zavisi od uzročnika i uključuje upotrebu antiparazitika i sistemskih antibiotika. Ukoliko je jedinka u teškom opštem kliničkom stanju, imperativna je primena analgetika uz parenteralnu ishranu i nadoknadu tečnosti (Quesenberry i Carpenter, 2011).

Hepatična lipidoza se relativno često pojavljuje kod ove vrste životnja. Uzroci za razvoj ovog oboljenja mogu biti: nutritivni disbalans, gojaznost, gladovanje, graviditet, infektivna oboljenja, kardiomiopatije i intoksikacije. Klinički simptomi su: letargija, inapetencija i gubitak telesne mase, dijareja, ikterus (naročito uočljiv u aksilarnoj regiji) i drugi. Dijagnoza hepatične lipidoze se postavlja ultrazvučnim pregledom i analizom biohemijskih parametara funkcija jetre. Terapija je ista kao kod drugih vrsta malih sisara.

OBOLJENJA RESPIRATORNOG SISTEMA

Afrički patuljasti ježevi su podložni infekcijama respiratornog sistema uzrokovanim bakterijama najčešće iz rodova *Corynebacterium*, *Bordetella* i *Pasteurella* (Ivey i Carpenter, 2012). Faktori spoljašnje sredine povećavaju podložnost ka ovim infekcijama. Klinički simptomi oboljenja respiratornog sistema su: iscedak iz očiju i nosa, patološki zvuci pri auskultaciji grudnog koša i abdominalno disanje. Dijagnostičke procedure obuhvataju mikrobiološko ispitivanje i radiološku dijagnostiku. Za terapiju respiratornih oboljenja najčešće se koriste antibiotici širokog spektra i potporna terapija.

OBOLJENJA UROGENITALNOG SISTEMA

Oboljenja s posledičnim oštećenjem bubrega su česta kod afričkih patuljastih ježeva. Iskustvo autora govori da postoji visoka prevalencija oštećenja bubrega kod jedinki starijih od dve godine. Tačna etiologija ovih promena nije poznata, a kao mogući uzroci se navode senilni tip degeneracije i suficit proteina u ishrani (Meredith i Delaney, 2010). Najčešći patohistološki nalaz je tubulointersticijalni nefritis uz sporadične nalaze nefrolita. Klinički se oštećenje bubrega, kod afričkih patuljastih ježeva, manifestuje polidipsijom i poliurijom, smanjenim apetitom, gubitkom telesne mase i eventualno uremijom, ascitesom i proteinurijom. Dijagnoza se postavlja na osnovu podataka prikupljenih biohemijskom analizom parametara bubrega i ultrazvučnim pregledom. Rendgenski snimanje je indicirano u slučaju sumnje na nefrolitijazu ili urolitijazu. Terapija kod oštećenja bubrega podrazumeva nadoknadu tečnosti i elektrolita parenteralno i smanjenje unosa proteina hranom. Odmakli stadijum oštećenja bubrega kod afričkog patuljastog ježa može biti indikacija za eutanaziju.

Cistitis se kod afričkih patuljastih ježeva pojavljuje relativno retko. Simptomi, dijagnostika i terapija su podudarni sa onima kod pasa i mačaka.

Postoje i podaci o pojavi piometre kod afričkog patuljastog ježa, međutim ovo stanje nije toliko često kod ove vrste životinja (Gardhouse i Eshar, 2015).

OBOLJENJA UZROKOVANA NEPRAVILNOM ISHRANOM

Gojaznost, kao posledica ishrane *ad libitum* i nedovoljnog kretanja je relativno česta kod afričkih patuljastih ježeva. Statistički podaci ukazuju da je oko 10 procenata afričkih patuljastih ježeva koji se drže kao kućni ljubimci gojazno (Gardhouse i Eshar, 2015). Gojaznost može da dovede do drugih oboljenja kod ove vrste kao što su hepatična lipidoza i piodermija. Saniranje ovog stanja obuhvata postepeno smanjivanje dnevnog unosa hrane uz eventualnu tranziciju na ishranu manje bogatu mastima, kao i stimulaciju aktivnosti jedinke.

POREMEĆAJI MUSKULOSKELETNOG SISTEMA

Anularna pedalna konstrikcija je često stanje kod afričkog patuljastog ježa i nastaje kao posledica obmotavanja dlake, žice, konca ili nekog drugog materijala

oko ekstremiteta. Usled izmenjenog protoka krvi dolazi do lokalne kongestije, edema, hipoksije i nekroze. Vlasnici ovo najčešće ne uoče odmah, zbog specifičnog spuštenog stava afričkog patuljastog ježa, koji otežava vizuelizaciju nogu. Terapijski protokol kod ovog stanja zavisi od stepena oštećenja tkiva. U nekim slučajevima može podrazumevati uklanjanje stranog tela koje vrši strangulaciju, sanaciju rane i parenteralnu primenu antibiotika i analgetika uz potpornu terapiju u vidu parenteralne nadoknade tečnosti i ishrane. Ukoliko je nekroza opsežna pristupa se amputaciji ekstremiteta (Johnson, 2012).

Bolest intervertebralnog diska (engl. *Intervertebral disc disease*) se kod afričkog patuljastog ježa manifestuje progresivnom ataksijom zadnjih ekstremiteta, urinarnom stazom i gubitkom propriocepcije. Patohistološki nalaz kod ovog oboljenja je degeneracija intervertebralnog diska i dorzalna protruzija koja u nekim slučajevima rezultira oštećenjem kičmene moždine. Pretpostavlja se da ovo oboljenje nastaje zbog degeneracije *annulus fibrosus*-a i posledične inflamacije sa koštanom proliferacijom. Dijagnoza se postavlja na osnovu rendgenskog snimka kičmenog stuba. Moguća je samo potporna terapija (Raymond i sar, 2009).

Spondiloza se pojavljuje kod nekih afričkih patuljastih ježeva kao senilno oboljenje, mada po iskustvu autora može da se javi i kod jedinki starosti 18 meseci. Klinički se uočavaju izmenjen stav i otežano kretanje, otežana defekacija i mikcija. Dijagnoza ovog oboljenja se postavlja rendgenskim snimanjem. Potporna terapija obuhvata dugoročnu primenu analgetika (Gardhouse i Eshar, 2015).

Pododermatitis se razvija kao posledica ishemičnog oštećenja palmarne i plantarne regije ekstremiteta i bakterijske infekcije nastalih žuljeva. Bolnost dovodi do hramanja, otežanog kretanja, letargije i inapetence. Potencijalni uzrok nastanka ovog stanja je boravak jedinke u uslovima neadekvatne higijene i kretanje po čvrstoj podlozi. Dijagnoza se postavlja kliničkim pregledom, a rendgenska dijagnostika se primenjuje radi utvrđivanja eventualnih promena na kostima distalnih ekstremiteta. Terapija zavisi od stepena progresije stanja i ima ulogu da uspori napredovanje procesa. Ako nema promena na kostima, primenjuje se lokalna terapija žuljeva antiseptičkim preparatima uz potpornu parenteralnu terapiju analgeticima. Ukoliko su promene na kostima uočljive, indikovana je amputacija ekstremiteta.

OBOLJENJA NERVNOG SISTEMA

Ataksija kod afričkog patuljastog ježa može biti uzrokovana stanjem dormacije, neurodegenerativnim promenama, traumom, intoksikacijom, ishemičnom povredom CNS-a, hepatičnom encefalopatijom, srčanim oboljenjima, malnutricijom i neoplazmama (Meredith i Delaney, 2010)

Vobli sindrom (engl. *Wobbly hedgehog syndrome*) je najčešće neurološko oboljenje afričkog patuljastog ježa. Ovo oboljenje je neurodegenerativno, progresivno, neizlečivo i nepoznate etiologije. Statistički su najčešće pogođene jedinke uzrasta ispod dve godine, ali se može javiti kod svih starosnih kategorija. Klinički,

dolazi do napredujuće ataksije, naginjanja u jednu stranu, gubitka koordinacije, anoreksije, paraplegije i tetraplegije. Brzina napredovanja je individualna i može iznositi nekoliko dana do 15 meseci (Quesenberry i Carpenter, 2011). Sumnja se postavlja na osnovu kliničkog pregleda i isključivanja drugih potencijalnih uzroka neuroloških simptoma, ali se definitivna dijagnoza može postaviti jedino postmortalnim patohistološkim pregledom mozga. Patohistološki, dolazi do spongioznih lezija bele mase, degeneracije i gubitka mijelinskog omotača, aksonske degeneracije i reaktivne mikroglioze. Lezije su najizraženije na malom mozgu, produženoj moždini i cervikalnom i torakalnom delu kičmene moždine (Diaz-Delgado i sar., 2018). Makroskopske lezije nisu uočljive. Terapija je samo potporna, u vidu parenteralne nadoknade tečnosti i ishrane. U slučajevima kad oboljenje progredira i jedinka više ne može samostalno da se hrani, indikovana je eutanazija.

NEOPLASTIČNA OBOLJENJA

Afrički patuljasti ježevi imaju visoku predispoziciju ka razvoju tumora, gde prevalencija iznosi 29 do 51,1 odsto. Prosečan uzrast jedinki u kome dolazi do razvoja neoplastičnih alteracija iznosi oko 3 godine (Heatly i sar., 2005). Organski sistemi koji su najčešće pogođeni neoplastičnim promenama su: koža, reproduktivni sistem, gastrointestinalni sistem, hemolimfatični sistem i endokrini sistem. Tumori kod ove vrste životinja su najčešće maligni (85 odsto). Postoje anegdotalni podaci o upotrebi hemioterapije i radioterapije u lečenju malignih oboljenja kod ove vrste životinja, ali ne postoje jasno definisani terapijski protokoli.

Neoplazme reproduktivnog sistema ženki predstavljaju oko 30 procenata od svih neoplastičnih oboljenja koja se pojavljuju kod afričkih patuljastih ježeva. Najčešći tip tumora organa reproduktivnog sistema ženki su stromalni tumori endometrijuma, endometrijalni polipi i endometrijalna hiperplazija. U manjem broju slučajeva se pojavljuju disgerminomi, endometrijalni sarkomi i tumori granulozna ćelija. Prosečan uzrast u kome se pojavljuju tumori reproduktivnog sistema ženki iznosi 2,3 godine. Klinički simptomi kod tumora organa reproduktivnog sistema ženki su hemoragični vaginalni iscedak, bolnost u abdomenu, anemija, letargija, inapetencija i loše opšte stanje. Dijagnoza se postavlja ultrazvučnim pregledom abdomena. Ukoliko se ustanove mase na reproduktivnom sistemu ženki, indikovano je njihovo uklanjanje (Okada i sar., 2018).

Na drugom mestu po učestalosti se nalaze neoplazme kože, prvenstveno fibrosarkomi i karcinomi skvamoznih ćelija. Klinička slika zavisi od tipa tumora, lokalizacije i veličine promene, a tačna dijagnoza se postavlja biopsijom.

Tumori usne duplje predstavljaju oko 20 odsto ukupnog broja svih neoplastičnih oboljenja afričkih patuljastih ježeva. Najučestaliji su sarkomi skvamoznih ćelija i fibrosarkomi. Prisustvo tumora u usnoj duplji se najčešće manifestuje otežanim uzmanjem hrane, hipersalivacijom, mljackanjem i krvavim iscetkom iz usta. Dijagnoza se postavlja na osnovu nalaza biopsije i rendgenskog snimanja.

Tumore usne duplje je najčešće nemoguće ukloniti sa bezbednim marginama, te se u većini slučajeva preporučuje simptomatska terapija uz primenu visokih doza glukokortikosteroida.

Tumori mlečne žlezde se pojavljuju kod oko 8 odsto ženki afričkih patuljastih ježeva. U najvećem broju slučajeva se radi o adenokarcinomima, mada postoje i podaci o pojavi adenoma mlečne žlezde kod afričkih patuljastih ježeva. Dijagnoza se postavlja na osnovu nalaza biopsije i ultrazvučnog nalaza. Ukoliko je to moguće, indikovano je hirurško uklanjanje mase.

LITERATURA

1. Berg C.C., Doss G.A., Guevar J. 2021. Neurologic examination of healthy adult African pygmy hedgehogs (*Atelerix albiventris*). Journal of the American Veterinary Medical Association, 258(9):971-6.
2. Carpenter J.W., Marion C. 2017. Exotic Animal Formulary-E-Book. Elsevier Health Sciences.
3. Díaz-Delgado J., Whitley D.B., Storts R.W., Heatley J.J., Hoppes S., Porter B.F. 2018. The pathology of wobbly hedgehog syndrome. Veterinary pathology, 55(5): 711-8.
4. Evans E.E., Souza M.J. 2010. Advanced diagnostic approaches and current management of internal disorders of select species (rodents, sugar gliders, hedgehogs). Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice, 13(3): 453-69.
5. Gardhouse S., Eshar D. 2015. Retrospective study of disease occurrence in captive African pygmy hedgehogs (*Atelerix albiventris*). Israel Journal of Veterinary Medicine, 70(1): 32-6.
6. Hedley J. 2014. African pygmy hedgehogs: general care and health concerns. Companion Animal, 19(1): 40-4.
7. Heatley J.J., Mauldin G.E., Cho D.Y. 2005. A review of neoplasia in the captive African hedgehog (*Atelerix albiventris*). In Seminars in Avian and Exotic Pet 8. Ivey E., Carpenter J.W. 2012. African hedgehogs. In Ferrets, rabbits, and rodents (pp. 411-427). WB Saunders.
9. Johnson D.H. 2012. Emergency presentations of the exotic small mammalian herbivore trauma patient. Journal of Exotic Pet Medicine, 21(4):300-15.
10. Meredith A., Delaney C.J. 2010. BSAVA Manual of Exotic Pets 5th edition.
11. Okada K., Kondo H., Sumi A., Kagawa Y., 2018. A retrospective study of disease incidence in African pygmy hedgehogs (*Atelerix albiventris*). Journal of Veterinary Medical Science, 80(10): 1504-10.
12. Quesenberry K., Carpenter J.W. 2011. Ferrets, Rabbits and Rodents-E-Book: Clinical Medicine and Surgery. Elsevier Health Sciences.
13. Raymond J.T., Aguila R., Dunker F., Ochsenreiter J., Nofs S., Shellabarger W., Garner M.M., 2009. Intervertebral disc disease in African hedgehogs (*Atelerix albiventris*): four cases. Journal of Exotic Pet Medicine, 18(3): 220-3.
14. Santana E.M., Jantz H.E., Best T.L., 2010. *Atelerix albiventris* (Erinaceomorpha: Erinaceidae). Mammalian Species, 42(857): 99-110.
15. Weishaupt J., Kolb-Mäurer A., Lempert S., Nenoff P., Uhrlaß S., Hamm H et al. 2014. A different kind of hedgehog pathway: tinea manus due to *Trichophyton erinacei* transmitted by an African pygmy hedgehog (*Atelerix albiventris*). Mycoses, 57(2): 125-7.
16. Williams D., Adeyeye N., Visser E., 2017. Ophthalmological abnormalities in wild European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*): a survey of 300 animals. Open Veterinary Journal, 7(3): 261-7.
17. Wissink-Argilaga N., 2020. African pygmy hedgehogs. Handbook of Exotic Pet Medicine, 13-26.

CIP - Каталогизација у публикацији - Народна библиотека Србије,
Београд

636.09:616(082)

614.31(082)

САВЕТОВАЊЕ ветеринара Србије (33 ; 2022 ; Златибор)

Zbornik radova i kratkih sadržaja / 33. savetovanje veterinara Srbije,
Zlatibor, 8-11. septembar 2022. = 33rd Conference of Serbian Veterinarians,
Zlatibor, September 8-11. 2022. ; [urednici Vladimir Dimitrijević i Miodrag
Lazarević]. - Beograd : Srpsko veterinarsko društvo, 2021 (Beograd : Naučna
KMD). - VIII, 584 str. : ilustr. ; 24 cm

Tiraž 500. - Summaries. - Bibliografija uz svaki rad.

ISBN 978-86-83115-47-1

а) Ветеринарска медицина - Зборници б) Ветеринарска
епизоотиологија -
Зборници с) Животне намирнице - Хигијена - Зборници

COBISS.SR-ID 73633289



www.svd.rs

**Bulevar oslobođenja 18,
11000 Beograd
Tel./Faks: 00 381 11 2685 187
svd1890@gmail.com**

