

UDK 619

ISSN 1820-9955

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”
Novi Sad

Arhiv veterinarske medicine

Arh. vet. med.	vol. 6	br. 1	str. 1-112	Novi Sad, 2013.
----------------	--------	-------	------------	-----------------

CIP – Каталогизација у публикацији
Библиотека Матице српске, Нови Сад

619

Arhiv veterinarske medicine / glavni i odgovorni urednik
Dragica Stojanović. – Vol. 1, br. 1 (2008) – . – Novi Sad :
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, 2008 –. – 25 cm

Dva puta godišnje.

ISBN 1820-9955

COBISS.SR-ID 235692807

Originalni naučni rad

UDK 616.523:636.2(497.2)

DISTRIBUTION OF BOVINE HERPESVIRUS 1 IN CATTLE POPULATION AND BULLS FROM CENTERS FOR ARTIFICIAL INSEMINATION AND PRIVATE FARMS IN BULGARIA

Raiko Peshev¹, Lilly Christova²

¹National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute, Sofia, Bulgaria

²Institute of Biophysics and Biomedical Engineering,
Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

Abstract

The aim of the study is determination of the BHV 1 incidence among the bovine population in Bulgaria by using various ELISA tests for antibody detection and different methods for proving viral antigen. Commercial diagnostic ELISA kits were used for screening as well as for confirmation of the antibodies. Serological examination encompassed 2973 serum samples from bovine population in Bulgaria (cattle, calves and bulls) originating from 21 country regions. Total 408 cattle and 150 bulls' samples originating from artificial insemination centers (AIC), commune and private farms from 21 country regions were subjected to virology testing. Identification of isolated viruses was performed using conventional and nested PCRs for BHV 1 gB gene detection. The percentage of positively reacting cattle sera were significantly ($p < 0.001$) higher (38.3%) than that of bulls (29.3%) after ELISA testing of 2240 cattle serum samples and 733 bulls' sera. Seven strains with BHV 1 characteristics were isolated from Dobrich, Lovech – 2 strains, Plovdiv, Targovishte, Pazardjik and Svishtov regions after cultivation 408 samples from cattle and calves (buffy coats, nasal, eyes, vaginal swabs, tissues and organs) on cell cultures. Three BHV 1 strains were isolated from Sliven, Shumen and Blagoevgrad regions after examining 150 bulls' samples (nasal, eyes, preputial, semen samples and buffy coats). Confirmation of virus isolation was accomplished using PCR *gB gene based primers* (amplified 478 bp) The amplicons from 3 bulls isolated strains with the same size and location as the referent Oxford strain were observed. After performance of nested PCR for gB gen, products with size of 385 bp were obtained in all samples as well as in the referent Oxford strain.

Key words: BHV-1, Bulgaria, serum, tissues, swabs

DISTRIBUCIJA BOVINOG HERPESVIRUSA 1 U POPULACIJI GOVEDA I BIKOVA IZ CENTARA ZA VEŠTAČKO OSEMENJAVANJE I PRIVATNIH FARMI U BUGARSKOJ

Raiko Peshev¹, Lilly Christova²

Kratak sadržaj

Cilj ovog rada je određivanje incidence BHV1 u populaciji goveada u Bugarskoj primenom različitih vrsta ELISA testova za detekciju antitela i različitih metoda za dokazivanje prisustva virusnih antigena. Komercijalni ELISA dijagnostički kitovi su primenjeni kako za skrining tako i za potvrđivanje prisustva antitela. Serološko ispitivanje obuhvatilo je 2973 uzoraka seruma dobijenih od populacije goveda iz 21 regiona u Bugarskoj (goveda, telad i bikovi). virusološka analiza obuhvatila je ukupno 408 uzoraka dobijenih od goveda i 150 uzoraka dobijenih od bikova iz centara za veštačko osemenjavanje, državnih i privatnih farmi iz 21 regiona u zemlji. Za identifikaciju izolovanih virusa korišćene su konvencionalne i *nested* PCR metode za detekciju 1 gB gena. Analiza 2240 uzoraka seruma dobijenih iz populacije goveda i 733 uzorka od bikova pomoću ELISA metode pokazala je da je procenat pozitivnih reakcija seruma goveda bio značajno ($p < 0,001$) viši (38,3%) nego kod bikova (29,3%)

Sedam sojeva sa karakteristikama BHV1 izolovano je u oblastima Dobrich, Lovech – 2 soja, u regionima Plovdiv, Targovishte, Pazardjik i Svishtov nakon kultivacije 408 uzoraka od goveda i teladi na ćelijskim kulturama (sloj nataloženih leukocita i trombocita – *buffy coat*, nazalni bris, bris oka, vaginalni brisevi, tkiva i organi). Tri soja BHV1 izolovana su u oblastima Sliven, Shumen i Blagoevgrad nakon ispitivanja 150 uzoraka od bikova (nazalni brisevi, bris oka, prepucijuma, uzorci sperme i *buffy coat*). Konfirmacija izolacije virusa vršena je pomoću PCR metode sa prajmerima za multiplikaciju gB gena veličine 478 bp. Uočeni su ampliconi sojeva izolovanih od 3 bika, iste veličine i lokacije kao i referentni soj Oxford. Nakon *nested* PCR za gB gen, dobijen je proizvod veličine 385 bp u svim uzorcima, kao i u referentnom soju Oxford.

Ključne reči: BHV-1, Bugarska, serum, tkiva, brisevi

Bovine herpesvirus 1 (BHV 1) belongs to the subfamily alpha herpesvirinae, genus varicellovirus of the family Herpesviridae (Roizman et al. 2001) and

has a narrow specter of hosts in comparison with other representatives of this subfamily having broad range of hosts. A range of clinical signs are observed, depending on the virus introduction and BHV 1 infection route – infectious bovine rhinotracheitis (IBR), infectious pustular vulvovaginitis (IPV), infectious pustular balanopostitis in bulls (IPB) (Gibbs and Rweyemamu, 1977).

BHV 1 infection is initially manifested as a venereal form affecting genital tract in cattle (IPV) and bulls (IPB). IPV infection is characterized by small pustules on the vulva mucosa and caudal parts of the vagina. In IPB, the clinical symptoms are restricted to the mucosa of the preputium, penis and distal parts of urethra.

The virus can cross the placenta to infect the fetus and potentially cause the abortion. It can infect the male genital tract inducing balanopostitis or penopostitis. After initial or reactivated infection of bulls, the virus is shed through the preputium and semen infection occurs in 2 to 7 days (Straub, 1990). The virus spreading can occur through female animals (so-called vertical transmission) (Straub, 1990). The initial period of virus dissemination can prolong for several weeks and during the initial stage of infection, the virus cannot be isolated (Huck et al., 1971). Latently infected bulls can re-excrete the virus in stressful situations (transportation or dexamethasone treatment). The animals usually do not manifest clinical symptoms and can disseminate the virus over a long time period, even for years (Bitch, 1978; Pastoret, 1982). After natural or artificial insemination with the infected semen material for in vitro fertilization, the virus can infect female animals and the risks for national and international spread of the virus is increasing (Kendrick and Mc Entee, 1967).

Identification of latent virus carriers among the bulls requires adequately sensitive and specific serological tests. Usually, the serum neutralization tests (SNT) is used as the gold standard for detecting BHV 1 specific antibodies. Different laboratories apply diverse SNT variants. Positive correlation between duration of serum-virus mixture incubation period and reaction sensitivity is well established. For example, the serum titers are 16 times higher after 24 h incubation of the serum-virus mixture as compared with titers after 1 h incubation (Bitch 1978, OIE, 2004). Despite the fact that SNT is highly sensitive and specific; however, it requires cell cultures and sterile conditions. Moreover it is time consuming, laborious and cannot be automated. Thus, variants of ELISA are preferred techniques for detection of BHV 1 antibodies (Van Oirschot, 2000). Commercially available ELISAs are developed for accomplishing the control and eradication programs and their sensitivity is comparatively studied (Kramps et al., 1993).

Detection, isolation and identification of BHV1 is accomplished by the use of cell culture and various methods (Wyler et al., 1989): ELISAs with monoclo-

nal antibodies for antigen detection (Collins et al., 1988) as well as a range of polymerase chain reactions (PCR) proving gB, gC, gD genes and thymidine kinase (TK) (Wiedmann et al., 1993; Kibenge et al., 1994 and Vilcek et al., 1994). Highly sensitive PCR determining three to five molecules of BHV-1 in bovine semen (Engelenburg, 1993) and nested PCR detecting 0.25-2.5 TCID₅₀ of BHV 1 in bovine semen (Masri et al., 1996) was developed.

The aim of this study is determination of BHV 1 incidence among the bovine population in Bulgaria by using various ELISAs for antibody detection and different methods for detection of virus antigens

MATERIAL AND METHODS

Serological analysis

Serological examination of 2973 serum samples from bovine population in Bulgaria (cattle, calf and bulls) originating from 21 country regions was performed. Blood samples were coagulated, harvested, inactivated at 56°C for 30 min and subsequently, antibiotics were added. The samples were frozen at -20°C.

Commercial diagnostic ELISA kits were used for screening as well as for the confirmation of the antibodies (Institute Pourquier, France). The readings were performed at 450 nm optical density (OD) for both reactions.

The screening reaction is based on specific bounding of the antibodies from the examined sample to the BHV1 antigen immobilized on the ELISA microtiter plate. The bound antibodies were detected using the anti bovine immunoglobulin G (IgG) monoclonal antibodies marked by horse-radish peroxidase (HRPO). After addition of chromogen substrate, the presence of BHV1 antibodies in the sample results in specific color reaction indicating the seropositive result

Minimal mean OD value of positive control 0.350 and proportion between mean values for positive and negative controls equal or more than 3.5 was adopted as the criteria for reaction validity.

Percentage of positive (S/P) samples was determined by the formula:

$$S/P = \frac{OD\ 450\ nm\ sample - OD\ 450\ nm\ negative\ control}{Mean\ OD\ 450\ nm\ positive\ control - OD\ 450\ nm\ negative\ control} \times 100$$

The sera with $S/P \leq 45\%$ were considered negative and with $S/P \geq 55\%$ as positive to BHV 1 antibodies. Sera with S/P between 45 and 55% were considered doubtful and were retested after 3-4 weeks.

Verification of the results obtained in screening test was performed in a subsequent confirmation test. Wells with BHV 1 antigen and corresponding wells loaded with control antigen (uninfected cell culture) were used. The sera samples were filled into the both wells. The results were considered valid if a minimal mean OD 450 value for positive control was 0.350 (uncorrected) and the ratio between mean corrected OD 450 value for the positive control and the negative control was equal or greater than 3.5.

The result was obtained after OD correction using the following equation:

$$OD_{\text{BHV 1}} - OD_{\text{control}} = OD_{\text{corrected}}$$

where $OD_{\text{BHV 1}}$ wells coated with the BHV 1 antigen, OD_{control} uncoated wells

The results were obtained by calculation of sample positive control (S/P) by the ratio:

$$S/P = \frac{\text{Tested samples } (OD_{\text{corrected}})}{\text{Positive control (mean } OD_{\text{corrected}})} \times 100$$

All samples with $S/P \leq 45\%$ were considered negative, with S/P between 45 and 55% doubtful and with $S/P > 55\%$ were considered BHV1 positive .

Virus analysis

Total 408 cattle and 150 bulls' samples originating from artificial insemination center (AIC), community and private farms from 21 country regions were analyzed. Buffy coats, nasal, eye, preputial and vaginal swabs, as well as samples of the semen, tissues and organs from infected animals were treated by the method of Dilovski et. al (1982) and inoculated onto cell cultures. Primary rabbit and continuous cell lines from calf kidney – Madin-Darby bovine kidney (MDBK) were used for isolation and culturing. Eagle minimal essential medium (E MEM) with Hank's salts were used as growing and maintenance medium. Antibiotics penicillin 100 UI/mL, Streptomycin 100 γ /mL and 10% fetal calf serum (FCS) and 2% FCS were added as a growing and maintenance medium, respectively. Semi-confluent or confluent cell culture monolayers were inoculated with 0.2 mL of treated specimens and adsorbed for 2 h at 37°C with exception of buffy coats and semen samples (adsorbed for 1 h at 37°C).

After absorption, the cell monolayers were washed and maintenance medium was added. The cytopathic effect was determined microscopically 120 h after inoculation. Three consecutive passages of cell cultures were performed. Uninfected cell cultures were used as the negative control. The virus titers and serum neutralization titers were determined by the method described by Di-lovski et al. (1982).

Conventional PCR was developed for BHV 1 gB gene for the identification of isolated viruses (Fucsh et al., 1999). Primers gB₁ multiplying part from gB gen at position 883 - 902 and gB₂ at position 1341 - 1360 amplifying product with 478 bp size were used. Nested PCR multiplying BHV 1 gB gen was performed with nested primers gB N₁ at position 899 - 918 and gB N₂ at position 1264 - 1283 creating the product with 385 bp size. The strains DNA isolated from the infected cell cultures and DNA of referent BHV 1 were subjected to electrophoresis in 2% agarose-gel containing (1mg/mL) ethidium bromide. The electrophoresis was carried out at 120 V for 45 min in 0.5 TBE buffer (0.045 M Tris borate, 0.001 M EDTA pH 8.6). As positive and negative controls, the referent BHV 1 Oxford strain and uninfected MDBK cells were used, respectively. To control the contamination, sterile distilled deionized water was added instead of DNA.

RESULTS

The percentage of positive sera after using the confirmatory test was insignificantly ($p > 0.05$) higher than that in the screening test.

Analysis using ELISA revealed that out of 2240 serum samples from bovine population and 733 from bulls the rate of positive cattle serums (38.3%) was significantly higher ($p < 0.001$) than that of the bulls (29.3%) (fig.1).

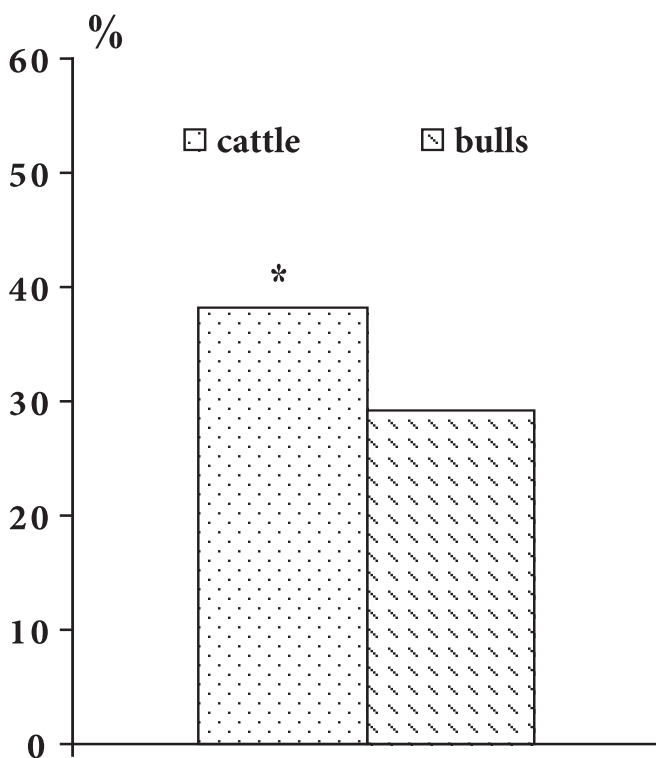


Fig.1. The percent distribution of positive cows and bulls samples after investigation by ELISA confirmatory test.

The percentage of positively reacting cattle and calf serums for different regions varied between 50 and 70%: Dobrich (72.9%), Burgas (72.2%), Pernik (67.6), Haskovo (66.1%), Lovech (63.0%), Shumen (54.7%) Plovdiv (54.1%); between 30 and 50% Sliven (47.5%), Razgrad (47.4%), Blagoevgrad (42.5%), Montana (36.9%), Targovishte (35.8%), Sofia (35.5%), V. Tarnovo (33.3%), and below 30% Smolian (26.5%), Gabrovo (15.6%), Yambol(14.5%), St. Zagora (12.1%).

The percentage of positively reacting bulls' sera were as following: Pernik (70.0%), Yambol (63.6%), Montana (62.5%), followed by Sofia region (55.2%), Pazardjik (53.2%) Varna (50.9%), Burgas (50.0%), ranged between 30 and 50% in Haskovo, Blagoevgrad, Shumen and Smolian regions and below 30% in Gabrovo, Sliven, Dobrich and St. Zagora regions.

The mean optical density of sera samples for cows and calves from 16 regions varied between (26.4% and 44.3%). For bulls' samples from the same

regions the mean optical density ranged between (87.1% and 147.6%). The significantly highest ($p<0.01$) OD rate was established in bulls from Smolian, Lovech, Pernik, Varna and Pazardjik regions. In the other investigated regions, the percent was between 65% and 96% (table1).

Table 1. The mean OD percent positivity (%) for investigated cows and bulls for 16 country regions.

Country regions	Optical densities percent positivity (%)	
	Cows	Bulls
1. Haskovo	36.2	101.34
2. Pazardjik	33.3	100.37
3.Pernik	29.65	112.34
4. Yambol	41.34	76.27
5. Sofia	35.62	64.33
6. Sofia district	33.79	87.67
7. Burgas	23.93	84.37
8. Gabrovo	29.39	94.31
9. Montana	35.1	98.31
10. Dobrich	35.64	93.18
11. Blagoevgrad	36.87	89.64
12. Smolian	28.47	147.63
13. Shumen	38.83	93.6
14. Lovech	37.71	103.94
15. Sliven	26.35	87.12
16. St. Zagora	37.81	96.39

Proportional distribution of positively reacting cattle and calf serums was significantly ($p<0.01$) higher than that of the bulls in all years of investigation, except for 2009 and 2011 (fig.2).

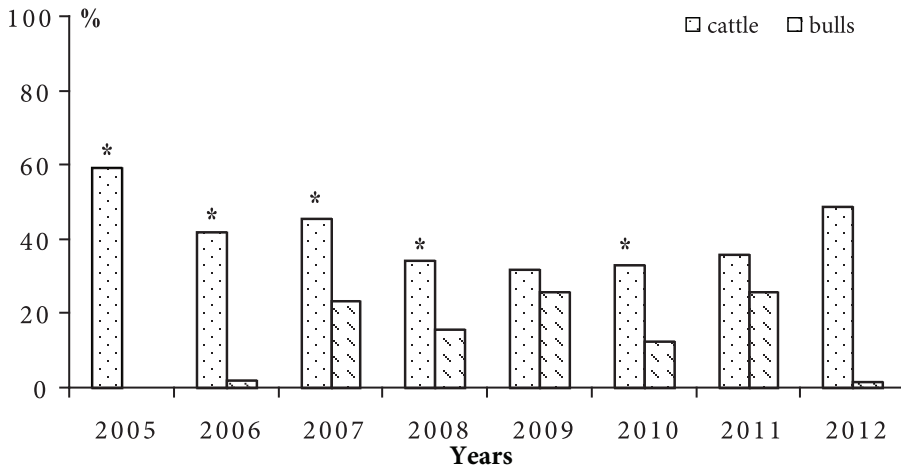


Fig. 2. The percent distribution of positively reacted bovines for eight years. With * are marked statistically significant differences ($p < 0,01$) between cattle and bulls.

After cultivating 408 samples originating from cattle and calves (buffy coats, nasal, eye, vaginal swabs, tissues and organs) on cell culture, seven strains manifesting BHV 1 properties were isolated from Dobrich, Lovech – 2 strains, Plovdiv, Targovishte, Pazardjik and Svishtov regions.

Three BHV 1 strains were isolated from Sliven, Shumen and Blagoevgrad regions after examining 150 bulls' samples (nasal, eye, preputial, semen samples and buffy coats).

The morphological characteristics were typical for BHV 1. In primary and permanent cell cultures, the cytopathic effect was visible 12 h after inoculation. Rounding and detachment of cell cultures were advanced 18-20 h later, and the number and space of clusters with damaged cells increased and vacuolation and granulation of cells were evident. A lot of spherical cells undergoing ballooning degeneration linked with cytoplasmic bridges and progressive detachment of cells after 72 h were visible. Single degenerating cells and full cell detachment 96-120 h after inoculation were observed.

Confirmation of virus isolation was accomplished using PCR *gB gene based primers* (amplified 478 bp). The amplicons from 3 bulls isolated strains with the same size and location as the referent Oxford strain were observed. After performing nested PCR for *gB* gen, products 385 bp in size were obtained in all samples as well as in the referent Oxford strain. Virus amplification was established neither in uninfected MDBK cells nor in sterile distilled water, which were used as negative controls in conventional and nested PCRs (fig. 3).

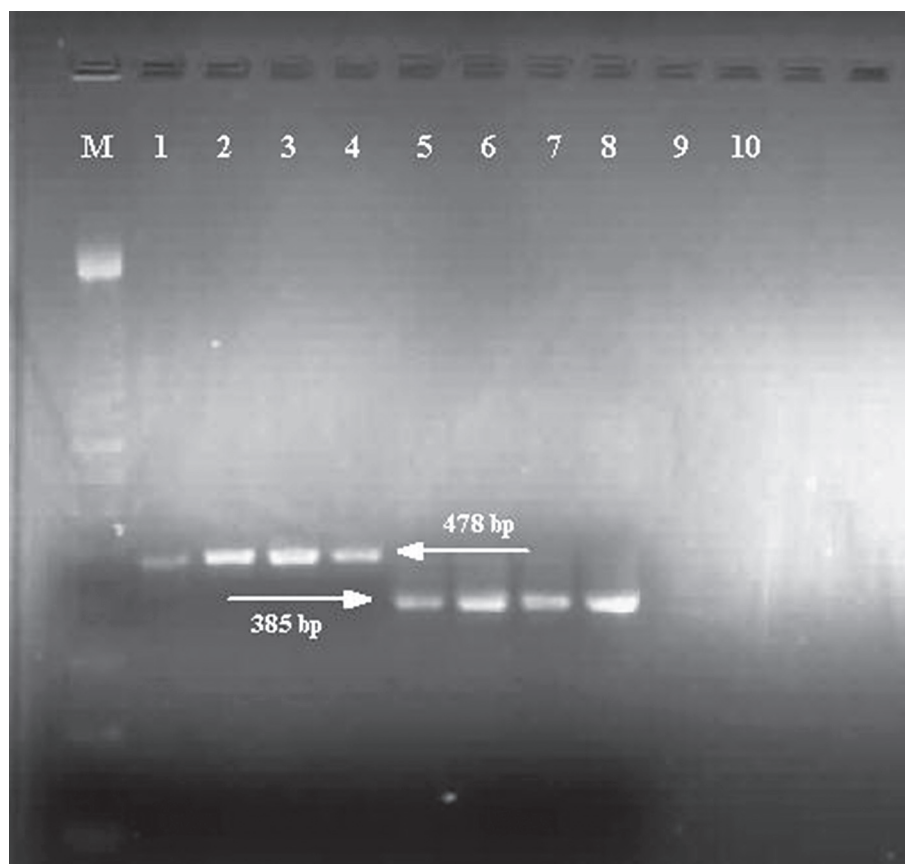


Fig 3. PCR proving DNA from 3 bulls isolates and referent Oxford strain with primers multiplying gB gen and nested PCR for the same samples. M – molecular size marker 1 kb ladder; lane 1 - isolate N 1, lane 2 – isolate N 2, lane 3 - isolate N 3, lane 4 - Oxford strain – gB gen; lane 5- isolate N 1, lane 6 – isolate N 2, lane 7- isolate N 3, lane 8 - Oxford strain - gB gen nested PCR, lane 9 - control uninfected MDBK cells, lane 10 – negative control distilled water.

DISCUSSION

In the last years, ruminants' population in Bulgaria has been decreasing dramatically and the number of animals on small private farms ranges between 2 and 5, while the number of animals on big farms is 100-200. Changes in the breeding system resulted in changes of the epizootological situation in Bulgaria. Results on seroprevalence in some regions indicate that BHV 1 infection is widespread in bovine population. In our previous investigation, we established the prevalence of infection in different country regions being 16-33% (Peshev

et al., 2009) whereas in the current investigation revealed a higher incidence rate (38.3%). Most probably, the reason for that is application of more sensitive ELISAs in current research than in the previous one.

Newly designed indirect BHV 1 ELISA method that we have applied for this screening is based on monoclonal antibodies with higher specificity and sensitivity, and the results can be compared with the data obtained by gB blocking ELISA or serum neutralization test (Beer et al., 2003; Isa et al., 2003). Most of the blocking and competitive reactions proving BHV 1 antibodies in infected or vaccinated animals are based on monoclonal antibodies created against epitopes of BHV 1 gB glycoprotein. This protein is essential for BHV 1 and is highly immunogenic for infected animals. We obtained higher percentage of positive serums (cattle, calf and bulls) than in the screening test because of the using highly sensitive confirmative ELISA. Higher sensitivity of this ELISA is due to the using of corrected OD (subtraction of control uninfected cell culture OD values). It can be concluded that the use of more sensitive confirming ELISA is mandatory for such epidemiological studies.

The BHV 1 infection is easily spread from animal to animal via the respiratory or reproductive transmission route, since after native or artificial insemination semen samples are potential source of BHV 1 infection (Guerin et al. 1993). Contaminated semen samples are potential threat to bovine population because BHV 1 can cause infectious pustular vulvovaginitis, endometritis, short estrus cycles, repeat breeding, abortion in cows and balanopostitis in susceptible bulls (Schultz and Sheffy, 1980). The virus in semen participates in seminal fluids, non-sperm cells and is adsorbed on spermatozoa (Engelburg et al. 1993). The cryoprotected semen in AIC is harvested at -196°C and distributed to other country regions and farms. The distribution rate of IBR infection determined in this research is lower in regions where the number of positive bulls is also lower. The bulls can spread the virus during clinical and subclinical infection. In that respect, regular testing and control of such animals is of crucial importance.

The specific humoral immune response to BHV 1 is the result of viral infection and the specific antibody titers can persist for several years (Kashoek et al., 1996). In our research, we established high percentage of serologically positive cows in seven regions, with an average rate of OD positivity varying between 26 and 44%, which can be as attributed to a recent BHV 1 infection. After examining the bulls originating from the same regions, we established three to four times higher average percentage of OD positive results, which strongly indicates the circulation of active BHV 1 infection among bulls' population.

The virus isolation test on different cell culture is frequently used and is adopted as a gold standard for sensitive and specific BHV 1 detection (Edwards et al., 1983; Brunner et al., 1998). Analytical sensitivity of virus isolation varied between <1 TCID₅₀ to 5 TCID₅₀/mL. BHV1 antigen can be determined by direct or indirect immunofluorescent tests or by enzyme immune test for antigen detection. Both immunofluorescence reactions exhibit lower sensitivity as compared to the enzyme immune methods (Collins et al., 1988). We used cell cultures for BHV 1 isolation and the highly sensitive ELISA, classical and nested PCRs for the confirmation of isolated BHV 1. Seven newly isolated strains from cows and three from bulls are an evidence for broad spreading of BHV 1 in bovine population in Bulgaria

Health status of animals depends on the raising system and the financial capacity of owners to implement the control and immunoprophylactic measures. The situation with BHV 1 distribution in different European countries is variable. The herd prevalence ranges from 10 to 80%. In Portugal, the prevalence is 47.2%, in dairy herds in Italy from 61 to 84%, for beef herds 59% and for mixed herds 89%. In Spain, the prevalence is between 38.4% and 50.4% Eiras et al. (2009). In Belgium, the positivity rate for dairy herds is 35%, for beef cows 31% and for mixed herds 43% (Boelaert et al. 2000). In Lithuania, using the Pourquier (ELISA IBR-IPV gB glycoprotein antibodies) the seroprevalence rate was established to be 33.86% for cows, 8.77% for heifers and 1.69% for bulls, whereas the average percentage is 14.01%.

Different European countries apply diverse strategies of BHV 1 control and eradication. In some countries, the disease is eradicated by testing and removing of positive animals. This is an expensive method and it is economically reasonable only at low level of virus infection in premises. In other countries, the protection against disease is carried out by intensive immunization programs using conventional inactivated, attenuated and gene-deleted vaccines. By the fact that the percent of infected animals in Bulgaria is high, the method for testing and removing is economically unprofitable. In Netherlands and Germany, disease control is accomplished using so-called DIVA strategy (differentiating infected from vaccinated animals) applying gene deleted vaccines and specially created tests discriminating infected from vaccinated animals. In conditions of broad distribution of infection, as in our country, this strategy can be used, and when the percentage of positive animals decreases to minimum, other positive animals can be removed from the farms. Animals imported from countries eradicating BHV 1 have to be vaccinated against BHV 1 on their farms of origin or during obligatory quarantine in the accepting country.

CONCLUSION

1. Incidence of BHV 1 infection among bovine population in Bulgaria is high (38.8%), which has been proved by an analysis of serum samples from 27 country regions using ELISA screening and confirmatory tests.
2. The use of more sensitive confirming ELISA is obligatory for epidemiological studies.
3. Immunoprophylactic measures against BHV 1 have to be implemented in both breeding animals and bulls.

LITERATURE

1. Beer M., König P., Schielke G., Trapp S.: Markerdiagnostik in der Bekämpfung des Bovinen Herpesvirus vom Typ 1: Möglichkeiten und Grenzen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 116, 5-6, 183-91, 2003.
2. Bitsch V.: The P 37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. *Acta Vet Scand.*, 19, 4, 497-505, 1978
3. Boelaert F., Biront P., Soumare B., Dispas M., Vanopdenbosch E., Vermeersch J.P., Raskin A., Duffey J., Berkvens D., Kerkhofs P.: Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. *Prev Vet Med* 45, 285-295, 2000
4. Brunner D., Engels M., Schwyzer M., Wiler R.: A comparison of three techniques for detecting bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in naturally and experimentally contaminated bovine semen. *Zuchthygiene* (Berlin), 23, 1-9, 1988
5. Collins, J.K., Ayers, V.K., Carman, J.: Evaluation of an antigen capture ELISA for the detection of bovine herpesvirus type 1 shedding from feedlot cattle. *Vet Microbiol.* 16, 101-107, 1988
6. Dilovski M., Haralambiev H., Tekerlekov P., Gerganov G., Diagnosis of viral disease in domestic animals. Kochov D.(ed), Zemizdat, Sofia, 1982.
7. Edwards S, Chasey D, White H.: Experimental infectious bovine rhinotracheitis: comparison of four antigen detection methods. *Res Vet Sci.*, 34, 42-45, 1983.
8. Eiras F.J., Diéguez C., Sanjuan M.L., Yus E., Arnaiz I.: Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 in cattle in Galicia (NW Spain) *Spanish Journal of Agricultural Research*, 7, 4, 800-806, 2009.
9. Fuchs M., Hubert P., Detterer J., Rziha H.J.: Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR

- that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E, *J. Clin. Microbiol.* 37, 2498–2507, 1999.
10. Gibbs E.P., Rweyemamu M.M.: Bovine herpesviruses. I. Bovine herpesvirus 1. *Veterinary Bulletin* 47, 317–343, 1977.
 11. Guerin G., Harlay T., Guérin B., Thibier M.: Distribution of BHV1 in fractions of semen from a naturally infected bull. *Theriogenology* 40, 997–1002, 1993
 12. Huck R. A., Millar P. G., Evans D. H., Stables J. W., Ross, A.: Penoposthitis associated with infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis (I.B.R-I.P.V.) virus in a stud of bulls. *Vet. Rec.* 88, 292–297, 1971
 13. Isa G., Schelp C., Truyen U.: Vergleichende Untersuchung von Rinderblutproben mit drei verschiedenen BHV-1 ELISA-Tests: Indirekter ELISA und gB-Blocking-ELISAs. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 116, 192 – 196, 2003
 14. Kaashoek M.J., Straver P.H., Van R.E., Quak J., van Oirschot J.T.: Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. *Vet. Rec.* 139, 416–421, 1996.
 15. Kendrick J.W., McEntee: The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus. *Cornell Vet.*, 57, 1, 3–11, 1967
 16. Kibenge F.S., Harris L.M., McKenna P.K., Wadowska D., Yason C.V.: Amplification of strains of bovine herpesvirus 1 by use of polymerase chain reaction with primers in the thymidine kinase region. *Am J Vet Res. Sep*, 55, 9, 1206–1212, 1994
 17. Kramps J. A., Quak S., Weerdmeester K., van Oirschot J. T.: Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet. Microbiol.* 35, 11–21, 1993.
 18. Kramps J.A., Banks M., Beer M., Kerkhofs P., Perrin M., Wellenberg G.J., Van Oirschot, J.T.: Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Vet Microbiol.*, 8, 102, 3–4, 169–81, 2004.
 19. Ludwig H.: The herpesviruses. Vol 2, Ed B. Roizman. Plenum Press, NewYork, 1983.
 20. Masri S. A., Olson W., Nguyen P. T., Prins S., Deregt D.: Rapid detection of bovine herpes 1 in the semen of infected bulls by a nested polymerase chain reaction assay. *Can. J. Vet. Res.* 60, 100–107, 1996.
 21. Madic, J., Magdalena J., Quak J., Van Oirschot J.T.: Isotype specific antibody responses in sera and mucosal secretions of calves experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Vet Immunol Immunopathol.*, 46, 3–4, 267–283, 1995.

22. Sheffy B. E., Davies D. H.: Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140, 974-976, 1972
23. Schultz R.D., Sheffy B.E.: Current status of viral infection of bovine genital tract with emphasis on IBR/IPV virus. *In: Current therapy in theriogenology*, ed. Morrow DA, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA, 503-509. 1980.
24. Roizman B., Pellett P.E.: The family Herpesviridae: A brief introduction. *In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.), Fields Virology*, 4th ed., Lippincott Williams and Wilkins publishers, Philadelphia, 2381-2398, 2001.
25. Pastoret P.-P., Thiry E., Brochier B., Derboven G.: Bovid herpesvirus 1 infection of cattle: pathogenesis, latency, consequences of latency, *Ann. Rech. Vét.* 13, 221-235, 1982
26. Peshev R., Bostandjieva R.: Serological investigation of the incidence of bovine herpesvirus 1 infection in Bulgaria, *Veterinary medicine*, 13, 1-2, 11-15, 2009.
27. Straub O.C.: Infectious bovine rhinotracheitis virus. *In: Virus Infections of Ruminants*. Z Dinter and B Morein (Eds.), Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, 71-108, 1990.
28. Van Engelenburg F.A., Maes R.K., Van Oirschot J.T., Rijsewijk F.A.: Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *J Clin Microbiol.*, 31, 12, 3129 - 3135, 1993.
29. Van Oirschot J.T.: Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. *In: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 4th ed. Paris: Office International des Epizooties, 381-391, 2000.
30. Vilcek S., Nettleton P.F., Herring J.A., Herring A.J.: Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV 1) using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, 42, 53-64, 1994.
31. Wiedmann M., Brandon R., Wagner P., Dubovi E.J., Batt C.A.: Detection of bovine herpesvirus – 1 in bovine semen by a nested PCR assay, *J. Virol. Methods*, 44, 129-140, 1993.
32. Wyler R., Engels M., Schwyzer, M.: Infectious Bovine Rhinotracheitis/Vulvovaginitis (BHV 1). *In: Wittmann G. Eds. Herpesvirus disease of cattle, horses, and pigs*. Boston/Dordrecht/London: Kluwer Academic Publishers 1-72, 1989.

Primljeno: 12.12.2012.
Odobreno: 08.05.2013.

Originalni naučni rad

UDK 619:616.98: 638.154

KOMPARACIJA METODA ZA DETEKCIJU MIKROSPORIDIA IZ RODA *Nosema* KOD MEDONOSNE PČELE (*Apis mellifera*)

**Uroš Glavinić^{1*}, Aleksandar Stanković¹, Jevrosima Stevanović¹,
Predrag Simeunović¹, Nevenka Aleksić², Zoran Stanimirović¹**

¹ Katedra za biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

² Katedra za parazitske bolesti, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

Dve vrste mikrosporidija roda *Nosema* uzročnici su nozemoze kod odrasle medonosne pčele: *N. apis* i *N. ceranae*. Za postavljanje dijagnoze i utvrđivanje stepena infekcije koristi se nekoliko mikroskopskih i molekularno-bioloških metoda. Cilj našeg rada bilo je poređenje pouzdanosti tradicionalne mikroskopske metode i dve PCR metode: simplex- i duplex-PCR. Pregledano je ukupno 150 uzoraka pčela. Mikroskopskim pregledom, obavljenim prema preporukama OIE, prisustvo spora *Nosema* utvrđeno je u 68,7% uzoraka. Međutim, simplex-PCR metodom dobijeni su pozitivni rezultati u svih 150 uzorka (100,0%). Sa druge strane, primenom duplex-PCR metode infekcija je ustanovljena kod 84,0 %; u svim slučajevima determinisana je vrsta *N. ceranae*. Veća pouzdanost simplex-PCR metode u odnosu na mikroskopski pregled, kako u otkrivanju infekcije malog intenziteta, kao i mogućnost detekcije vegetativnih oblika nozeme, navodi nas da preporučimo uvođenje simplex-PCR metode kao obavezne za praćenje stanja pčelinjih društava na terenu; time bi se postigla rano utvrđivanje prisustva infekcije i blagovremena prevencija njenog širenja. Specijska identifikacija mikrosporidija roda *Nosema* najjednostavnija je i najisplativija metodom duplex-PCR. Međutim, simplex-PCR ima veću pouzdanost, te preporučujemo da se uzorci koji su negativni na osnovu mikroskopskog pregleda i duplex-PCR analize ispituju i simplex-PCR metodom.

Ključne reči: *Apis mellifera*, *Nosema* sp., mikroskopski pregled, simplex-PCR, duplex-PCR.

^{1*} E-mail: zoran@vet.bg.ac.rs

COMPARISON OF METHODS FOR DETECTION OF MICROSPORIDIA SPECIES OF THE GENUS *NOSEMA* IN HONEY BEES (*APIS MELLIFERA*)

Uroš Glavinić¹, Aleksandar Stanković¹, Jevrosima Stevanović¹,
Predrag Simeunović¹, Nevenka Aleksić², Zoran Stanimirović¹

¹ Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

² Department of Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Serbia

Abstract

Two microsporidia species of the *Nosema* genus cause nosemosis in the adult honeybee: *N. apis* and *N. ceranae*. For diagnostic purposes and the determination of infection level various microscopic and molecular biological methods are used. The aim of this research was to compare the reliability of the traditional microscopic assessment and two PCR techniques: simplex- and duplex-PCR. Honey bee samples were taken from 150 colonies. Microscopic examination, performed according to the recommendations of the OIE, revealed *Nosema* spores in 68.67% samples analysed, whilst with the simplex-PCR method all samples (100.0%) proved positive. On the other hand, duplex-PCR method used for the identification of *Nosema* species resulted in 84.0% positive samples, all of which were *N. ceranae*. Our recommendation of the simplex-PCR method for the monitoring of honey bees in field conditions is based on its higher reliability than the microscopic assessment in the detection of low-level infections, as well as its potential for the detection of vegetative *Nosema* sp. stages; thus the early detection and timely prevention of *Nosema* infection would be possible. *Nosema* species identification is simplest and most cost-effective if performed with the duplex-PCR analysis. However, the simplex-PCR is more reliable, thus, it is suggested that samples that were negative when assessed with microscopy and duplex-PCR analysis undergo simplex-PCR.

Key words: *Apis mellifera*, *Nosema* sp., microscopic examination, simplex-PCR duplex-PCR.

UVOD

Mikrosporidije roda *Nosema* predstavljaju česte parazite odraslih pčela (Higes i sar. 2010). Do danas su opisane dve vrste koje napadaju medonosne pčele: *Nosema apis* Zander (1909) i *N. ceranae* Fries (1996). Kod evropske me-

donosne pčele (*Apis mellifera*) parazitiraju obe vrste, a kod azijske (*Apis ceranae*) samo *N. ceranae* (Fries i sar., 1996). Tokom poslednjih nekoliko godina otkriveno je da *N. ceranae* dominira u odnosu na *N. apis* kod *A. mellifera* kako u Srbiji (Stevanovic i sar., 2011) i susednim zemljama (Tapasztai i sar., 2009; Tlak-Gajger i sar., 2010; Bacandritsos i sar., 2010), tako i širom sveta (Fries i sar., 2006; Klee i sar., 2007; Paxton i sar., 2007; Williams i sar., 2008; Giersch i sar., 2009; Chen i Huang, 2010). Obe vrste inficiraju epitelne ćelije srednjeg creva pčela, mada izvesni podaci ukazuju da se *N. ceranae* može naći i u drugim tkivima (Chen i Huang, 2010).

Pre otkrića *N. ceranae* smatralo se da je jedini uzročnik nozemoze vrsta *N. apis* (Office International des Epizooties - OIE, 2004). U akutnoj fazi bolest koju ona prouzrokuje karakteriše podrhtavanje pčela radilica, dilatacija abdomena, prisustvo fecesa na saću i ispred košnice, bolesnih ili uginulih pčela u njenoj blizini, zatim smanjenje produkcije legla i veličine pčelinjeg društva, naročito u proleće (Bailey, 1955). Nedavno je ovo oboljenje nazvano „nozemoza tipa A“, a ono koje izaziva *N. ceranae* „nozemoza tipa C“ (COLOSS, 2009). Utvrđeno je da se *N. ceranae* i *N. apis* bitno razlikuju po epizootologiji infekcije i patogenosti (Higes i sar., 2010). Karakteristike nozemoze tipa C jesu odsustvo sezonalnosti (uzročnik može da se dokaže tokom cele godine) i kontinuirano uginjavanje pčela (uglavnom izletnica) sa visokim intenzitetom infekcije, što dovodi do očiglednih posledica: depopulacija društva i smanjena produktivnost, a zatim odsustvo kliničkih simptoma pre uginuća, što se objašnjava dugim periodom inkubacije (Higes i sar., 2008).

Prema rezultatima nekih istraživanja, *N. ceranae* može biti uzrok kolapsa pčelinjih društava (colony collapse disorder - CCD), pojave u kojoj jaka društva neobjašnjivo, naizgled iznenada oslabe i najčešće uginu bez ikakvih vidljivih znakova bolesti (Higes i sar., 2008, 2009). Infekcija vrstom *N. ceranae* može da bude uzrok velikih gubitaka u pčelinjem društvu (Martin-Hernandez i sar. 2007; Higes i sar. 2008, 2009). Iz tih razloga značajno je kontinuirano praćenje i blagovremeno otkrivanje uzročnika (pre nego što se primete bilo kakvi problemi), tim pre što za kontrolu nozemoze za sada nema efikasnog preparata (Higes i sar. 2010).

U ovom radu upoređivana je pouzdanost standardnog mikroskopskog pregleda i dveju molekularno-bioloških metoda u detekciji mikrosporidija roda *Nosema*. Molekularne metode detekcije podrazumevaju *in vitro* kloniranje specifičnih sekvenci DNK putem reakcije lančane polimerizacije (*Polymase Chain Reaction* – PCR). Ispitivana je efikasnost dveju varijanti PCR metode: simplex-PCR (omogućava utvrđivanje prisustva uzročnika) i duplex-PCR (osim detekcije omogućava i određivanje vrste nozeme).

MATERIJAL I METODE RADA

Materijal

Istraživanjem je obuhvaćeno 150 uzoraka pčela *Apis mellifera*, prikupljenih sa pčelinjaka na teritoriji Srbije. Uzorkovanje je obavljeno u skladu sa uputstvima OIE-a (OIE, 2008). Svaki uzorak je sadržao 60 odraslih pčela izletnica sakupljenih sa leta košnice.

Mikroskopska detekcija spora nozeme i kvantifikacija stepena infekcije

Mikroskopski pregled uzoraka pčela u cilju utvrđivanja prisustva spora nozeme obavljen je prema preporukama OIE (2008). Iz svakog uzorka, abdomeni 60 pčela macerirani su u 2-3 ml vode i suspenzija zatim pregledana pod mikroskopom (x400).

Detekcija i determinacija vrste mikrosporidija roda *Nosema* putem PCR metoda

Za izolaciju DNK 1 ml homogenizovane suspenzije spora centrifugiran je 5 min. na 16100 g. Dobijeni talog je tretiran tečnim azotom, zatim izdrobljen sterilnim tučkom i obrađen pomoću seta za izolaciju DNK "DNeasy Plant Mini Extraction Kit" (Qiagen, Cat. No. 69104).

Korišćene su dve PCR metode, simplex-PCR (Stevanović i sar., 2011) i duplex-PCR (Martín-Hernández i sar., 2007). Za spravljanje PCR mešavine i programiranje termalnog PCR režima korišćeni su protokoli detaljno opisani u radu Stevanović i sar. (2011).

PCR amplifikacije obavljene su u aparatu Mastercycler Personal (Eppendorf) i MultiGene Gradient (Labnet International Inc.). Elektroforetska analiza PCR produkata (4 µl amlifikovane DNK) izvedena je na 1,4% agaroznom gelu (1xTBE), nakon čega je obavljeno bojenje etidijum-bromidom i vizuelizacija pod UV svetlošću. Kao marker za određivanje veličine traka izražene u baznim parovima (bp) korišćen je komercijalni O'RangeRuler™ 50bp DNK ladder (Fermentas).

REZULTATI I DISKUSIJA

Od ukupnog broja analiziranih uzoraka (N=150) mikroskopskim pregledom utvrđeno je prisustvo spora roda *Nosema* u 103 uzorka (68,7%), dok je metodom simplex-PCR (Tabela 1, Slika 1) prisustvo mikrosporidija roda *Nosema* utvrđeno u svim uzorcima (100,0%), kako u onima koji su na mikroskopskom pregledu bili pozitivni, tako i u onima koji su bili negativni (Tabela 1). Međutim, duplex-PCR analizom istih uzoraka, obavljenom radi determi-

nacije vrste nozeme, infekcija je dokazana u 126 uzoraka (84,0%), a u preostala 24 (16,0%) rezultat je bio negativan (Tabela 1, Slika 2). Uzorci u kojima je metodom duplex-PCR potvrđena infekcija (N=126) dali su amplikone veličine 218-219 bp, što znači da bili zaraženi samo vrstom *N. ceranae*, dok ni u jednom nisu dobijeni fragmenti dužine 321 bp, što ukazuje na odsustvo *N. apis*. Osim toga, nije zabeležen ni jedan slučaj mešovite infekcija vrstama *N. apis/N. ceranae* (Tabela 1).

Za postavljanje dijagnoze infekcije mikrosporidijama iz roda *Nosema* OIE nalaže mikroskopski pregled suspenzije dobijene maceriranjem najmanje 60 pčelinjih abdomena u 2-3 ml vode, što predstavlja relativno malo razblaženje i omogućava otkrivanje 5% obolelih pčela sa 95% sigurnosti (OIE, 2008). S obzirom da je ova tehnika relativno jeftina i istovremeno veoma pouzdana, može da se smatra metodom izbora za postavljanje dijagnoze nozemoze.

U poslednje vreme sve se češće koriste PCR metode za pregled pčela na prisustvo vrsta mikrosporidija roda *Nosema*. Međutim, prema važećim preporukama OIE-a (2008), PCR tehnika se preporučuje samo za utvrđivanje vrste uzročnika (ispitivanje da li je u pitanju *N. apis* ili *N. ceranae*) u uzorcima kod kojih su mikroskopiranjem dokazane spore. Zbog toga je u ovom radu upoređena pouzdanost mikroskopskog pregleda i dveju PCR metoda u dijagnostici nozemoze. Svi uzorci pčela pregledani su svim trima metodama. Korišćene su dve varijante PCR metode: duplex-PCR (Martín-Hernández i sar., 2007) i simplex-PCR sa prajmerima nos-16S-fw/rv (Stevanović i sar., 2011).

S obzirom da je simplex-PCR tehnikom otkriveno prisustvo mikrosporidija roda *Nosema* u svih 150 analiziranih uzorka, uključujući 47 u kojima mikroskopskom pregledom nije uočena nijedna spora, može se zaključiti da se ovom varijantom PCR metode detektuju i vegetativni oblici nozeme; ovo je od naročitog značaja u prvim danima infekcije, kada nema eliminacije spora, ili je ona vrlo oskudna (Higes i sar., 2007, 2008). Osim toga, simplex-PCR tehnika korišćena u ovom radu pokazala je veću efikasnost od real-time PCR (Bourgeois i sar., 2010) za koju se tvrdi da je veoma senzitivna, jer omogućava dokazivanje infekcije nozemom i kada je u uzorku prisutna makar jedna spora. Osim toga, simplex-PCR je daleko brža i manje skupa od real-time PCR tehnike. Simplex-PCR je pokazao višu efikasnost (100,0%) u poređenju sa duplex-PCR metodom, čija je efikasnost bila 84,0%, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (Stevanović i sar., 2011) prema kojima je efikasnost duplex-PCR-a bila 82%. Determinacija vrste primenom simplex-PCR nije moguća bez dalje analize koja podrazumeva digestiju amplikona restrikcionim endonukleazama (PCR-RFLP), čime se dobijaju species-specifični restrikcioni fragmenti (Stevanović i sar., 2011). Međutim, PCR-RFLP je skuplja i zahteva

više vremena i rada u poređenju sa metodom duplex-PCR. Uprkos tome, ukoliko je neophodno da tačnost rezultata diferencijalne dijagnostike *N. apis*/*N. ceranae* bude 100 %, PCR-RFLP predstavlja metodu izbora.

Zaključak

Tradicionalna mikroskopska metoda za utvrđivanje prisustva mikrosporidija roda *Nosema* (protokol OIE) pokazala je znatno manju pouzdanost (68,7%) od molekularno-bioloških metoda detekcije korišćenih u ovom radu, čija je efikasnost bila 84,0% (duplex-PCR), odnosno 100,0% (simplex-PCR). Dobijeni rezultati navode nas da preporučimo da se simplex-PCR uvede kao obavezna metoda za praćenje stanja pčelinjih društava na terenu sa ciljem što ranije detekcije i blagovremene prevencije širenja infekcije nozemom (pre pojave bilo kakvih simptoma). Za potrebe diferencijalne dijagnostike između infekcije vrstom *N. apis* i *N. ceranae* jednostavnija i isplativija metoda je duplex-PCR, ali je pouzdanija simplex-PCR posle koje sledi obrada ampikona restrikcionim enzimima (RFLP).

Zahvalnica

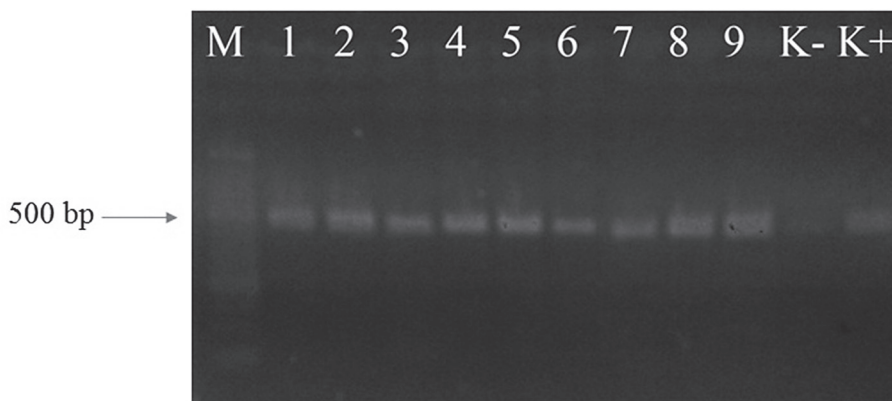
Rad je realizovan u okviru Projekta III46002 koji finansira Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

1. Bacandritsos N., Granato A., Budge G., Papanastasiou I., Roinioti E., Caldon M., Falcato C., Gallina A., Mutinelli F.: Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105, 335-340, 2010.
2. Bailey L.: The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honeybee. *Annals of Applied Biology*, 43, 379-389, 1955.
3. Bourgeois AL., Rinderer ET., Beaman DL., Danka GR.: Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 53-58, 2010.
4. Chen YP., Huang ZY.: *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie*, 41, 364-374, 2010.
5. COLOSS workshop Conclusions, Proc. Workshop: "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization" (COST Action FA0803) 2009; Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

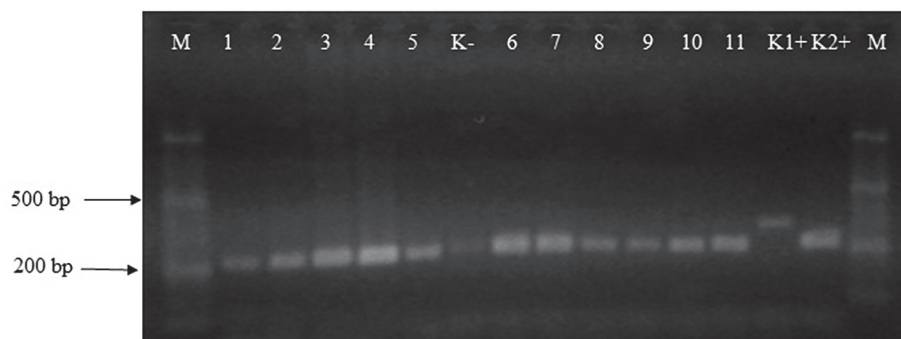
6. Fries I., Feng F., Da Silva A., Slemenda SB., Pieniazek NJ.: *Nosema ceranae* n .sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32, 356–365, 1996.
7. Fries I., Martín R., Meana A., García-Palencia P., Higes M.: Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 45, 230–233, 2006.
8. Giersch T., Berg T., Galea F., Hornitzky M.: *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*, 40, 117–123, 2009.
9. Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Garrido-Bailón E., González-Porto AV., Barrios L., Del Nozal MJ., Bernal JL., Jiménez JJ., García-Palencia P., Meana A.: How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10, 2659–2669, 2008.
10. Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., González-Porto AV., García-Palencia P., Meana A., del Nozal MJ., Mayo R., Bernal JL.: Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 110–3, 2009.
11. Higes M., Martín-Hernández R., Meana A.: *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41, 375–392, 2010.
12. Klee J., Besana AM., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam DQ., Chinh TX., Puerta F., Ruz JM., Kryger P., Message D., Hatjina F., Korpela S., Fries I., Paxton RJ.: Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96, 1–10, 2007.
13. Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador AM., Garrido-Bailón E., Higes M.: Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6331–6338, 2007.
14. Office International des Epizooties OIE (2004) Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00123.htm
15. Office International des Epizooties - OIE (2008) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chap. 2.2.4., Nosemosis of Honey Bees, http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.04_NOSE-MOSIS.pdf.
16. Paxton RJ., Klee J., Korpela S., Fries I.: *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, 38, 558–565, 2007
17. Stevanovic J., Stanimirovic Z., Genersch E., Kovacevic RS., Ljubenkovic J., Radakovic M., Aleksic N.: Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in

- the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*, 42, 49-58, 2011.
18. Tapaszti Z., Forgách P., Kovágó C., Békési L., Bakonyi T., Rusvai M.: First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Veterinaria Hungarica*, 57, 383-388, 2009.
 19. Tlak Gajger I.T., Vugrek O., Grilec D., Petrinc Z.: Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies. *Veterinarni Medicina* 55, 457-462, 2010.
 20. Williams GR., Shafer ABA., Rogers REL., Shutler D., Stewart DT.: First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidean parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, 189-192, 2008.



Slika 1. Rezultati dobijeni metodom simplex-PCR.

Legenda: Linija M, 50 bp marker; K+, pozitivna kontrola *Nosema* sp.; K-, negativna kontrola; 1-9, PCR produkti uzoraka inficiranih mikrosporidijama roda *Nosema*;



Slika 2. Rezultati dobijeni putem metode duplex-PCR.

Legenda: Linija M, 50 bp marker; K1+, pozitivna kontrola *N. apis*; K2+, pozitivna kontrola *N. ceranae*; K-, negativna kontrola; 1-11, PCR produkti uzoraka inficiranih vrstom *N. ceranae*;

Tabela 1. Rezultati ispitivanja pčela *Apis mellifera* na prisustvo mikrosporidija roda *Nosema*

Metoda	<i>Nosema</i> -pozitivni uzorci (broj i %)			<i>Nosema</i> -negativni uzorci (broj i %)
Mikroskopski pregled	103 (68,7)			47 (31,3)
Simplex-PCR	150 (100,0)			0 (0,0)
Duplex-PCR	126 (84,0)	<i>N. apis</i>	0 (0,0)	24 (16,0)
		<i>N. ceranae</i>	126 (100,0)	
		<i>N. apis/N. ceranae</i>	0 (0,0)	

Primljeno: 15.01.2012.
Odobreno: 08.05.2013.

Originalni naučni rad

UDK594.42:616.993(497.113)

NALAZ GENOMA UZROČNIKA *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* U KRPELJIMA SA PODRUČJA VOJVODINE, SRBIJA^{1*}

Aleksandar Potkonjak¹²., Sara Savić², Živoslav Grgić², Branislav Lako¹,
Vuk Vračar¹, Dragana Rajković³, Aleksandar Jurišić³, Aleksandra Petrović³

¹ Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman
za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija

² Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Srbija

³ Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za fitomedicinu
i zaštitu životne sredine, Novi Sad, Srbija

Kratak sadržaj

Krpelji su vektori za mnoga infektivna oboljenja i predstavljaju stalnu pretnju populaciji ljudi i životinja, naročito kada se radi o zoonozama. Uzročnik granulocitne anaplazmoze *Anaplasma phagocytophilum* je Gram negativna, obligatno intracelularna bakterija koja inficira ljude, kao i različite domaće i divlje životinje. Ovaj uzročnik je rasprostranjen širom sveta, a održava se u prirodi kroz enzootski krug između krpelja i domaćina kičmenjaka. Cilj ovog rada je da se ukaže na rasprostranjenost infekcije krpelja uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* na području Autonomne Pokrajine Vojvodine. Prikupljnje krpelja je obavljeno na 10 lokaliteta u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini, Srbija, koji predstavljaju ruralni tip staništa za krpelje. Oni su primenom nested PCR metode pregledani na prisustvo specifične DNK p44/msp2 uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Od deset pregledanih pulova krpelja prikupljenih na području Autonomne Pokrajine Vojvodine, primenom PCR metode, u šest pulova dokazano je prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. U 5 pulova krpelja vrste *Ixodes ricinus* je dokazano je prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Ovi krpelji su vodili poreklo sa sledećih lokacija: Institut za topolarstvo (2 lokaliteta), Fruška gora (2 lokaliteta) i Poloj-šuma Bačka

^{1*} Ovo istraživanje je finansirao Pokrajinski sekretarijat za nauku i tehnološki razvoj AP Vojvodine (naziv projekta: Istraživanje lajmske bolesti i drugih vektorski prenosivih zoonoza u Vojvodini, broj projekta: 114-451-1892/2011)

² E-mail: ale@polj.uns.ac.rs

Palanka (1 lokalitet). U jednom pulu krpelja vrste *Dermacentor reticulatus* sa područja Poloj-šuma Bačka Palanka smo dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Kako ova infekcija predstavlja problem u javnom zdravlju, neophodna su šira akarološka i epidemiološko-epizootiološka istraživanja u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini.

Ključne reči: krpelji, *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus*, *Anaplasma phagocytophilum*, anaplazmoza, PCR

FINDINGS OF THE *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* GENOME IN TICKS FROM VOJVODINA AREA, SERBIA

Aleksandar Potkonjak¹, Sara Savić², Živoslav Grgić², Branislav Lako¹, Vuk Vračar¹, Dragana Rajković³, Aleksandar Jurišić³, Aleksandra Petrović³

¹ University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine, Novi Sad, Serbia

² Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad, Serbia

³ University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Environmental and Plant Protection

Abstracts

Ticks are vectors for many infectious diseases and represent a constant threat to human population and other animals, especially with respect to zoonoses. The cause of granulocyte anaplasmosis *Anaplasma phagocytophilum* is a gram-negative, obligate intracellular bacterium that infects people as well as various domestic and wild animals. The agent is spread worldwide, persisting in the natural environment through an enzootic circle between ticks and their hosting vertebrae. The aim of this paper is to demonstrate the distribution of ticks' infection with *Anaplasma phagocytophilum* in the territory of the Autonomous Province of Vojvodina. Ticks were collected at ten locations in the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia, which are a rural habitat for ticks. By applying the nested PCR method, the ticks were examined for the presence of specific DNA p44/msp2 *Anaplasma phagocytophilum*. Of the ten examined pools of ticks collected in the area of the Autonomous Province of Vojvodina, the presence of genome of the agent *Anaplasma phagocytophilum* was confirmed in six pools applying the PCR method. In five pools of ticks of the species *Ixodes ricinus*, presence of agent *Anaplasma phagocytophilum* was confirmed. These ticks were found at the

following locations: Poplar Research Institute (2 locations), Fruška gora (2 locations) Poloj-forest Bačka Palanka (1 location). In one pool of ticks of the species *Dermacentor reticulatus* from the location Poloj-forest Bačka Palanka, we confirmed the presence of *Anaplasma phagocytophilum* genome. This infection can be a problem for public health, so further and more comprehensive acharological and epidemiological research is necessary in the Autonomous Province of Vojvodina.

Key words: ticks, *Dermacentor recitulatus*, *Ixodes ricinus*, *Anaplasma phagocitophilum*, anaplasmosis, PCR

UVOD

Krpelji su vektori za mnoga infektivna oboljenja i predstavljaju stalnu pret-nju populaciji ljudi i životinja, naročito kada se radi o zoonozama. Poznato je da krpelji mogu da budi vektori za različite vrste bakterija, poput uzročnika rikecioza (grupa pegavih tifusa Stenovitih planina), lajmske bolesti, Q gro-znice, erlihioza, anaplazmoze, tularemije, povratne groznice i drugih (Parola i Raoult, 2001). Osim navedenih bakterijskih infekcija, krpelji mogu da budu vektori i za virusne infekcije i poznato je da prenose 38 različitih vrsta virusa. Kao najznačajniji virusi koji se prenose krpeljima navode se virus krpeljskog encefalitisa, virus omsk hemoragične groznice, Powassan virus, Nairovirus (uzročnik krimsko-kongo hemoragične groznice), Coltivirus (Eyach virus), virus infektivnog encefalomijelitisa ovaca (louping ill virus), virus afričke kuge svinja, virus najrobi bolesti ovaca, Thogoto virus, Dhori virus i drugi (Charrel i sar., 2004; Labuda i Nuttall, 2004). Osim za bakterije i viruse, krpelji mogu biti vektori i za protozoe. Smatra se da su babezioza i tajlerioza dva najznačajnija oboljenja iz ove grupe (Bakheit i sar., 2007).

Uzročnik granulocitne anaplazmoze *Anaplasma phagocytophilum* je Gram negativna, obligatno intracelularna bakterija koja inficira ljude, kao i različite domaće i divlje životinja. Ovaj uzročnik je rasprostranjen širom sveta. Slučaje-vi oboljenja kod ljudi su registrovani u Severnoj Americi, Evropi i Rusiji (Chen i sar.,1994; Dumler i sar.,2001; Sidel'nikov i sar.,2003; Lotric-Furlan i sar.,2006; Thomas i sar.,2009). Uzročnik *Anaplasma phagocytophilum* se održava u priro-di kroz enzootski krug između krpelja iz roda *Ixodes* i domaćina kičmenjaka. Transovarijalna transmisija uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* do sada još nije dokumentovana, što ukazuje na neophodno prisustvo domaćina rezer-voara uzročnika koji su uključeni u razvojni ciklus (Rar i sar, 2011). Baldrige i saradnici navode da registrovana transovarijalna transmisija nekih varijanti uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja iz roda *Dermacentor* uka-

zuje da održavanje uzročnika granulocitne anaplazmoze u prirodi možda nije isključivo zavisno od horizontalne transmisije (Baldrige i sar., 2009).

Različite vrste krpelja iz roda *Ixodes* su uključene u prenošenje uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* na domaćine sisare (Bakken iDumler, 2000). Istraživanjima sprovedenim na severnoistočnom i serenjezapadnom području SAD dokazano je da je krpelj veste *Ixodes scapularis* kompetentni vektor uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* (Des Vignes i Fish, 1997; Telford III i sar., 1996). Burkot i Richter su utvrdili da su krpelji vrsta *I. pacificus* i *I. spinipalpis* kompetentni vektori uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* na zappadu SAD (Burkot i sar., 2001; Richter i sar., 1996).

Primenom metoda molekularne biologije, prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* je dokazano u krpeljima vrste *I. ricinus* na području Evrope (Liz i sar., 2000; Katargina i sar., 2011; Ogden i sar., 1998; von Loewenich i sar., 2003), kao i kod krpelja vrste *I. persulcatus* u Rusiji (Eremeeva i sar., 2006; Rar i sar., 2010; Shpynov i sar., 2006), Kini (Cao i sar., 2003), Japanu (Ohashi i sar., 2005) i Koreji (Kim i sar., 2006). Postoje sopštenja koja ukazuju na nalaz genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja-*Dermacentor silvarum* u Kini (Cao et al., 2006), kao i krpelja *Ixodes ovatus* u Japanu (Ohashi i sar., 2005), *Ixodes trianguliceps* u Engleskoj (Bown i sar., 2003) i *Ixodes ventalloi* u Portugalu (Santos i sar., 2004). Obe vrste krpelja *Ixodes trianguliceps* i *Ixodes ventalloi* podržavaju održavanje uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* u prirodi, ali smatra se da nemaju značajnu ulogu u prenošenju ovog uzročnika na ljude ili životinje, zbog samog načina života ovih endofilnih krpelja (Rar i Golovljova 2011). Yoshimoto i saradnici su utvrdili da je krpelj vrste *Haemaphysalis megaspinosa* dominantni vektor uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* u populaciji goveda na području Japana (Yoshimoto i sar., 2010). Wirtgen i saradnici navode da su dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* u krpeljima *Dermacentor reticulatus* i predlažu da se ova vrsta doda na listu potencijalnih vektora uzročnika granulocitne anaplazmoze (Wirtgen i sar., 2011.)

Prevalencija infekcije krpelja uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* je nešto viša u SAD u odnosu na druga geografska područja (Rar i Golovljova, 2011). Telford III i saradnici saopštavaju da se inficiranost adulta vrste *Ixodes scapularis*, na severu SAD, kreće od 7,6 do 53%, dok je ova vrednost kod nimfi krpelja iste vrste nešto niža i kreće se od 1,5 do 20,6% (Telford III i sar., 1996). Kod krpelja vrste *Ixodes ricinus* i *Ixodes persulcatus* prevalencija infekcije uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* se kreće od 1% do 5% (Aleksiev et al., 2001; Liz et al., 2000; Katargina et al., 2011; Ogden et al., 1998; Cao et al., 2003; Ohashi et al., 2005; Rar et al., 2010; Shpynov et al., 2006). Samo u sporadičnim saopštenjima ove vrednosti su nešto više, pa tako Rosef navodi da je 17% krpe-

lja zaraženo uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* na području Norveških ostrva (Rosef i sar., 2009), dok Cinco saopštava da je u Italiji 24% krpelja inficirano istim uzročnikom (Cinco i sar., 1997). Massung navodi da utvrđene vrednosti prevalencije infekcije krpelja uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* na određenom području mogu da variraju u odnosu na vreme prikupljanja krpelja (Massung i sar., 2002) dok Katargina navodi da vrednosti zaraženosti krpelja pokazuju sezonske i godišnje varijacije, kao i zavise od primenjenih metoda prikupljanja i pregleda krpelja (Katargina i sar., 2011).

Milutinović i saradnici su prvi u Srbiji identifikovali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod 40 od 287 ukupno pregledanih krpelja (Milutinović i sar., 2008).

Cilj ovog rada je da ukaže na rasprostranjenost infekcije krpelja uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* na području Autonomne Pokrajine Vojvodine.

MATERIJAL I METODE RADA

Prikupljanje uzoraka krpelja i definisanje lokaliteta

Prikupljanje krpelja u slobodnoj prirodi je obavljeno u periodu njihove sezonske aktivnosti između februara i oktobra meseca 2012. godine, jednom nedeljno, između 10 i 18 časova, kada su bili pogodni vremenski uslovi. Za prikupljanje krpelja korišćen je flag-čas metod, koji podrazumeva prevlačenje dva bela flanelska platna različite površine (1 x 1 m i 2 x 1,6 m) po vegetaciji niskog rasta i zemlji, u okviru izabranih preseka, tokom 60 minuta. Na svakih 20 m, tokom prevlačenja flanelskog platna, vršen je pregled platna sa obe strane i prikupljanje krpelja uz upotrebu pincete. Izbor lokaliteta je učinjen na osnovu poznavanja ekoloških faktora poput pogodnosti staništa za krpelje (flora i fauna), površine staništa, pristupačnosti staništu, gustini populacije krpelja, klimatskih i meteoroloških faktora. Prikupljanje krpelja je obavljeno na 10 lokaliteta u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini, Srbija, koji predstavljaju ruralni tip staništa za krpelje. To su bile sledeće lokaliteti: Subić (2 lokaliteta), Institut za topolarstvo (3 lokaliteta), Titel-šuma (1 lokalitet), Poloj-šuma Bačka Palanka (2 lokaliteta) i Fruška gora (2 lokaliteta). Prikupljeni uzorci su organizovani u 10 pulova, nakon određivanja taksonomske pripadnosti vrsti upotrebom ključa po Estrada-Pena (Estrada-Pena i sar., 2004). U 6 pulova su bili prisutni adulti krpelja vrste *Ixodes ricinus* (2 lokaliteta Institut za topolarstvo, 2 lokaliteta Fruška gora, 1 lokalitet Poloj-šuma Bačka Palanka i 1 lokalitet Titel-šuma), u 2 pula su bili prisutni adulti krpelja vrste *Dermacentor marginatus* (2 lokaliteta Subić) i u 2 pula su bili prisutni adulti krpelja vrste *Dermacentor reticulatus* (1

lilitet Institut za topolarstvo i 1 lokalitet Poloj-šuma Bačka Palanka). Prikupljeni krpelji su čuvani u 70% rastvoru alkohola do ekstrakcije DNK.

Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK iz tkiva celih krpelja je obavljena primenom QuickGene DNA tissue kit, prema instrukciji proizvođača Fujifilm Co., Tokyo, Japan. Kvalitet ekstrahovane DNK je procenjen primenom PCR za ITS2 region gena ribozomalne DNK krpelja, sa prajmerskim parom 5.8S F3/1 (50-GGG TCG ATG AAG AAC GCA GCC AGC-30) i 28S R1/1 (50-TTC AGG GGG TTG TCT CGC CTG ATG-30), po prethodno saopštenoj metodi (Fukunaga i sar., 2000).

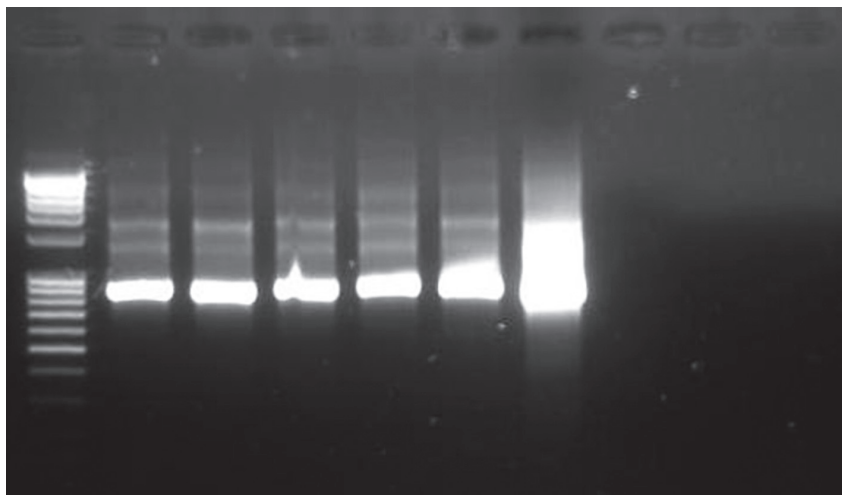
Dokazivanje specifične DNK p44/msp2 uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*

Za dokazivanje DNK *Anaplasma phagocytophilum* korišćena je nested PCR metoda sa prajmerima dizajniranim za visoko konzervirani deo genoma p44/msp2 paraloga p3726F [50-GCT AAGGAG TTA GCT TAT GA-30], p3761F [50-CTG CTC T(T/G)G CCA A(A/G)A CCT

C-30], p4183R [50-CAA TAG T(C/T)T TAG CTA GTA ACC-30] i p4257R [50-AGAAGA TCA TAA CAA GCA TTG-30] prema prethodno saopštenoj metodologiji (Ohashi i sar., 2005; Milutinović i sar. 2008).

REZULTATI I DISKUSIJA

Od deset pregledanih pulova krpelja prikupljenih na području Autonomne Pokrajine Vojvodine, primenom PCR metode, u šest pulova dokazano je prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. U tabeli 1. su prikazani podaci o nalazu genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*, lokalitetu, kao i vrsti, broju i polu krpelja. Na slici 1. je prikazana gel elektroforeza produkata PCR reakcije za dokazivanje genoma *Anaplasma phagocytophilum*. Na slici 2. je prikazana karta sa označenim lokalitetima sa kojih su prikupljeni pozitivni i negativni pulovi krpelja na prisustvo genoma *Anaplasma phagocytophilum*.



Slika 1. Gel elektroforeza produkata PCR reakcije za dokazivanje genoma *Anaplasma phagocytophilum* (Molekularni marker se vidi skroz levo, kao i PCR pozitivni uzorci sa oko 300 do 400 baznih parova).



Slika 2. Mapa sa označenim lokalitetima sa kojih su prikupljeni pozitivni i negativni pulovi krpelja na prisustvo genoma *Anaplasma phagocytophilum* (Crvane tačke – Lokaliteti na kojima je dokazano prisustvo genoma *Anaplasma phagocytophilum* u krpeljima vrste *Ixodes ricinus*, Žuta tačka – Lokalitet na kome je dokazano prisustvo genoma *Anaplasma phagocytophilum* u krpeljima vrste *Dermacentor reticulatus*, Zelene tačke – Lokaliteti na kojima nije dokazano prisustvo genoma *Anaplasma phagocytophilum* u krpeljima)

Tabela 1. Podaci o nalazu genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*, lokalitetu, kao i vrsti, broju i polu krpelja

Broj	Vrsta krpelja	Broj i pol krpelja	Lokalitet	Nalaz genoma <i>A. phagocytophilum</i>
1	<i>D. marginatus</i>	5 mužjaka	Subić	Negativan
2	<i>D. marginatus</i>	6 ženki	Subić	Negativan
3	<i>I. ricinus</i>	5 ženki	Institut za topolarstvo	Pozitivan
4	<i>D. reticulatus</i>	6 ženki	Institut za topolarstvo	Negativan
5	<i>I. ricinus</i>	4 mužjaka	Institut za topolarstvo	Pozitivan
6	<i>I. ricinus</i>	4 ženke	Titel-šuma	Pozitivan
7	<i>I. ricinus</i>	10 ženki	Poloj-šuma Bačka Palanka	Negativan
8	<i>D. reticulatus</i>	3 ženke, 2 mužjaka	Poloj-šuma Bačka Palanka	Pozitivan
9	<i>I. ricinus</i>	4 ženke	Fruška gora	Pozitivan
10	<i>I. ricinus</i>	7 mužjaka	Fruška gora	Pozitivan

Prisusto genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* u Republici Srbiji su prvi dokazali Milutinović i saradnici. Oni su pregledali ukupno 287 krpelja sa područja Republike Srbije. Od 40 krpelja kod kojih je dokazano prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* samo 3 krpelja su vodila poreklo sa područja Autonomne Pokrajine Vojvodine (Batrovci i Kljajićevo). Isti autori su iako su registrovali istovremenu infekciju uzročnikom *Borrelia burgdorferi* kod 18 pregledanih krpelja, to nije bio slučaj sa krpeljima prikupljenim sa područja Autonomne Pokrajine Vojvodine (Milutinović i sar., 2008).

U 5 pulova krpelja vrste *Ixodes ricinus* je dokazano je prisusto genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Ovi krpelji su vodili poreklo sa sledećih lokacija Institut za topolarstvo (2 lokaliteta), Fruška gora (2 lokaliteta) i Poloj-šuma Bačka Palanka (1 lokalitet). Brojni drugi autori su dokazali pri-

susto genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja vrste *Ixodes ricinus*na području Evrope. Milutinović i saradnici navode da postoji značajna regionalna variabilnost u vrednostima prevalencije infekcije krpelja vrste *Ixodes ricinus* uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* (Milutinović i sar, 2008). Liz i saradnici su ustanovili 6 pozitivnih krpelja vrste *Ixodes ricinus* na prisustvo DNA uzročnika granulocitne anaplazmoze od 417 pregledanih krpelja sa područja Švajcarske (Liz i sar., 2000). Katargina i saradnici su dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod 13,4% krpelja vrste *Ixodes ricinus* u Evropskom delu Rusije, kod 4,2% krpelja vrste *Ixodes ricinus* u Belorusiji, kod 2,6% kod krpelja vrste *Ixodes ricinus* sa Sarema ostrva u Estoniji, kao i 1,7% krpelja vrste *Ixodes ricinusa* kopnenog dela Estonije. Isti istraživači nisu dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja vrste *Ixodes persulcatus* (Katargina i sar., 2011). Nalaz genoma u krpeljima vrsta *Ixodes ricinus* i *Ixodes trianguliceps*na području Velike Britanije su ustanovili Ogden i saradnici 1998. godine. Kod 4,1% krpelja vrste *Ixodes ricinus* od ukupno pregledanih 1022 krpelja na području Nemačke je dokazan genom uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Kachrimanidou i saradnici su dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* u 4 pula od pregledanih 45 pulova krpelja vrste *Ixodes ricinus* sa područja Grčke (Kachrimanidou i sar., 2011). Na području Austrije su Polin i saradnici, 2004. godine dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja vrste *Ixodes ricinus* (Polin i sar., 2004). Severinsson i saradnici su u Švedskoj pregledali 139 pulova sa 1245 krpelja na prisustvo uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* i dokazali da se zaraženost krpelja ovim uzročnikom kretala od 1,3% do 15% (Severinsson i sar., 2010). Strašek Smrdel i saradnici su ustanovili nisku vrednost prevalencije infekcije krpelja vrste *Ixodes ricinus* uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* u Sloveniji koja je za 2005. godinu iznosila 0,31%, a za 2006. godinu 0,63% (Smrdel i sar., 2010). Sofia Santos i saradnici su primenom PCR metode dokazali prisustvo uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja *Ixodes ricinus* sa kopnenog dela Portugala (Sofia Santos i sar., 2004). Koči i saradnici su dokazali genom uzročnika granulocitne anaplazmoze kod 9% krpelja *Ixodes ricinus*u Moldaviji (Koči i sar., 2007). Sanogo i saradnici saopštavaju da je samo 0,3% krpelja *Ixodes ricinus* uklonjenih sa tela ljudi bez znakova infekcije bilo pozitivno na uzročnika granulocitne anaplazmoze na području severnoistočne Italije (Sanogo i sar., 2004). Grzeszczuk i Stanczak su ustanovile da je 23,7% krpelja vrste *Ixodes ricinus*, uklonjenih sa kože ljudi u Poljskoj, bilo inficirano uzročnikom granulocitne anaplazmoze (Grzeszczuk i Stanczak, 2006). Halos i saradnici su ustanovili prevalenciju infekcije krpelja *Ixodes ricinus* uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum*na području Italije od

10%, dok su Mantelli i saradnici registrovali 15% zaraženih krpelja u Francuskoj (Halos i sar., 2006; Mantelli i sar., 2006).

U ovom istraživanju u jednom pulu krpelja vrste *Dermacentor reticulatus* sa područja Poloj-šuma Bačka Palanka smo dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* (tabela 1., slika 1. i slika 2). Značaj ove vrste krpelja u održavanju i prenošenju uzročnika granulocitne anaplazmoze krpelja još uvek nije pouzdano utvrđen. Sixl i saradnici nisu dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod 178 pregledanih krpelja vrste *Dermacentor reticulatus* prikupljenih sa područja Austrije (Sixl i sar., 2003). U svom istraživanju inficiranosti krpelja vrste *Dermacentor reticulatus* sa područja Nemačke uzročnicima *Borrelia* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* i *Anaplasma phagocytophilum*, Richter i saradnici nisu dokazali prisustvo genoma ovih uzročnika u pregledanim krpeljima. Oni smatraju da su krpelji vrste *Dermacentor reticulatus* retko inficirani ovim uzročnicima, kao i da nemaju značajnu ulogu vektora i prenošenju i održavanju ovih infekcija (Richter i sar., 2013). Suprotno ovoj grupi istraživača, Wirtgen i saradnici saopštavaju da su u toku sprovođenja monitoringa u Velikoj Britaniji (WIL-DSCREEN network) dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod 5 krpelja *Dermacentor reticulatus*, od ukupno 35 pregledanih. Ovi istraživači su predložili da se vrsta *Dermacentor reticulatus* doda na listu potencijalnih krpelja vektora uzročnika granulocitne anaplazmoze (Wirtgen i sar., 2011.) Ne treba izgubiti iz vida da kod krpelja iz roda *Ixodes* još uvek nije dokazano transovarialno prenošenje uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*; kao što su to dokazali Baldridge i saradnici kod krpelja vrste *Dermacentor albipictus* (Baldridge i sar., 2009). Na osnovu navedenih istraživanja moguće je da krpelji iz roda *Dermacentor* imaju značajniju epidemiološku ulogu u prenošenju i održavanju uzročnika granulocitne anaplazmoze.

ZAKLJUČAK

U 6 pulova krpelja sa područja Autonomne Pokrajine Vojvodine je dokazano prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Utvrđeno je prisustvo *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja vrste *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. Neophodna su dalja istraživanja da bi se dokazao vektorski potencijal *Dermacentor reticulatus*, kao i utvrdila genetska sličnost patotipova *Anaplasma phagocytophilum* dokazanih u krpeljima vrsta *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus*. Kako ova infekcija predstavlja problem u javnom zdravlju, neophodna su šira akarološka i epidemiološko-epizootička istraživanja u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini.

LITERATURA

1. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Van De Pol I., Schouls L.M.: Identification of Ehrlichia spp. and Borrelia burgdorferi in Ixodes ticks in the Baltic regions of Russia., *J. Clin. Microbiol.* 39, 2237–2342, 2001
2. Bakken J.S., Dumler J.S.: Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.*, 31, 554–560, 2000
3. Baldridge G.D., Scoles G.A., Burkhardt N.Y., Schloeder B., Kurtti T.J., Munderloh U.G.: Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and Anaplasma phagocytophilum variants in Dermacentor albipictus (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 46, 3, 625, 2009
4. Bown K.J., Begon M., Bennett M., Woldehiwet Z., Ogden N.H.: Seasonal dynamics of Anaplasma phagocytophila in a rodent-tick (Ixodes trianguliceps) system, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 63–70, 2003
5. Burkot T.R., Maupin G.O., Schneider B.S., Denatale C., Happ C.M., Rutherford J.S., Zeidner N.S.: Use of a sentinel host system to study the questing behavior of Ixodes spinipalpis and its role in the transmission of Borrelia bissettii, human granulocytic ehrlichiosis, and Babesia microti., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65, 293–299, 2001
6. Cao W.C., Zhan L., He J., Foley J.E., De Vlas S.J., Wu X.M., Yang H., Richardus J.H., Habbema J.D.: Natural Anaplasma phagocytophilum infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75, 664–668, 2006
7. Cao W.C., Zhao Q.M., Zhang P.H., Yang H., Wu X.M., Wen B.H., Zhang X.T., Habbema J.D.: Prevalence of Anaplasma phagocytophila and Borrelia burgdorferi in Ixodes persulcatus ticks from northeastern China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68, 547–550, 2003
8. Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov, V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süss J., Zlobin V.I., De Lamballerie X.: Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10, 1040–55., 2004
9. Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H.: Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 589–595, 1994
10. Cinco M., Padovan D., Murgia R., Maroli M., Frusteri L., Heldtander M., Johansson K.E., Engvall E.O.: Coexistence of Ehrlichia phagocytophila and Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 3365–3366, 1997

11. Des Vignes F., Fish D.: Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by host-seeking *Ixodus scapularis* (Acari:Ixodidae) in southern New York state. *J. Med. Entomol.*, 34, 379–382, 1997
12. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwaet F.R.: Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophilum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 2145–2165, 2001
13. Ereemeeva M.E., Oliveira A., Robinson J.B., Ribakova N., Tokarevich N.K., Dasch G.A.: Prevalence of bacterial agents in *Ixodes persulcatus* ticks from the Vologda Province of Russia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1078, 291–298, 2006
14. Estrada-Pena A., Bouattour A., Camica J.L., Walzer A.R.: Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, Spain; Atalanta, Houten, The Netherlands, 2004.
15. Fukunaga M., Yabuki M., Hamase A., Oliver J.H. Jr, Nakao M.: Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. *J. Parasitol.*, 86, 38–43, 2000
16. Grzeszczuk A., Stanczak J.: High prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks removed from human skin in north-eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 13, 1, 45-48, 2006
17. Halos L., Vourc’h G., Cotte V., Gasqui P., Barnouin J., Boulous H.J., Vayssier-Taussat M.: Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in questing *Ixodes ricinus* ticks from France. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1078, 316–319, 2006
18. Kachrimanidou M., Papa A., Chochlakis D., Pavlidou V., Psaroulaki A.: Molecular Evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* Ticks from Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11, 10, 1391-1393, 2011
19. Katargina O., Geller J., Alekseev A., Dubinina H., Efremova G., Mishaeva N., Vasilenko V., Kuznetsova T., Järvekülg L., Vene S., Lundkvist Å, Golovljova I.: Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in Estonia, the European part of Russia and Belarus. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18, 1, 40-46., 2012
20. Kim C.M., Yi Y.H., Yu D.H., Lee M.J., Cho M.R., Desai A.R., Shringi S., Klein T.A., Kim H.C., Song J.W., Baek L.J., Chong S.T., O’guinn M.L., Lee J.S., Lee I.Y., Park J.H., Foley J., Chae J.S.: Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 5766–5776, 2006

21. Koči J., Movila A., Taragel'ová V., Toderas I., Uspenskaia I., Derdákova M., Labuda M.: First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infections with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. *Exp. Appl. Acarol.*, 41, 1-2, 147-152, 2007
22. Labuda M., Nuttall P.A. Tick-borne viruses. *Parasitology*, 129, Suppl: S221-45, 2004
23. Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., Massung R.F., Gern L., Rutti B., Brossard M.: PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1002-1007, 2000
24. Lotric-Furlan S., Rojko T., Petrovec M., Avsic-Zupanc T., Strle F.: Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 118, 708-713, 2006
25. Mantelli B., Pecchioli E., Hauffe H.C., Rosà R., Rizzoli A.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Anaplasma phagocytophilum* in the wood tick *Ixodes ricinus* in the Province of Trento, Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 25, 737-739, 2006
26. Massung R.F., Mauel M.J., Owens J.H., Allan N., Courtney J.W., Stafford 3rd K.C., Mather T.N.: Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 467-472, 2002
27. Milutinović M., Masuzawa T., Tomanović S., Radulović Ž., Fukui T., Okamoto Y.: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp. Appl. Acarol.*, 45, 3-4, 171-183, 2008
28. Ogden N.H., Bown K., Horrocks B.K., Woldehiwet Z., Bennett M.: Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K.. *Med. Vet. Entomol.*, 12, 423-429, 1998
29. Ohashi N., Inayoshi M., Kitamura K., Kawamori F., Kawaguchi D., Nishimura Y., Naitou H., Hiroi M., Masuzawa T.: *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 1780-1783, 2005
30. Parola P., Raoult D., Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.*, 32, 897-928, 2001
31. Polin H., Hufnagl P., Hauns Schmid R., Gruber F., Ladurner G.: Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 5, 2285-2286, 2004
32. Rar V., Golovljova I.: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "Candidatus *Neoehrlichia*" bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect. Genet. Evol.*, 11, 8, 1842-1861, 2011

33. Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V. Doroschenko E.K., Pukhovskaia N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I.: Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in Asian part of Russia. *Ticks Tick Borne Dis.*, 1, 57–65, 2010
34. Rar V.A., Epikhina Z.I., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I.: Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11, 8, 1013–1021, 2011
35. Richter Jr. P.J., Kimsey R.B., Madigan J.E., Barlough J.E., Dumler J.S., Brooks D.L.: *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae). *J. Med. Entomol.*, 33, 1–5, 1996
36. Richter D., Kohn C., Matuschka F.R.: Absence of *Borrelia* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in questing adult *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasitol. Res.*, 112, 1, 107–111, 2013
37. Rosef O., Paulauskas A., Radzijeuskaja J.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. *Acta. Vet. Scand.*, 51, 47, 2009
38. Sanogo Y.O., Parola P., Shpynov S., Camicas J.L., Brouqui P., Caruso G., Raoult D.: Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in northeastern Italy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 990, 182–190, 2003
39. Santos A.S., Santos-Silva M.M., Almeida V.C., Bacellar F., Dumler J.S.: Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerg. Infect. Dis.*, 10, 1643–1648, 2004
40. Severinsson K., Jaenson T.G., Pettersson J., Falk K., Nilsson K.: Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. *Parasit. Vectors*, 3, 66, 2010
41. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tarasevich I., Raoult D.: Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1078, 378–383, 2006
42. Sidel'nikov J.N., Mediannikov O.J., Ivanov L.I., Zdanovskaya N.I.: The first case of granulocytic ehrlichioses in Far East of Russia. *Clin. Med.*, 2, 67–68, 2003
43. Sixl W., Petrovec M., Marth E., Wüst G., Stünzner D., Schweiger R., Avšič-Županc T.: Investigation of *Anaplasma phagocytophila* infections in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in Austria. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 990, 1, 94–97, 2003

44. Smrdel K., Serdt M., Duh D., Knap N., Županc-Avšič T.: *Anaplasma phagocytophilum* in ticks in Slovenia. *Parasit Vectors*, 3, 102, 2010
45. Telford III S.R., Dawson J.E., Katavolos P., Warner C.K., Kolbert C.P., Persing D.H.: Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 11, 6209–6214, 1996
46. Thomas R.J., Dumler J.S., Carlyon J.A.: Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert. Rev. Antiinfect. Ther.*, 7, 709–722, 2009
47. von Loewenich F.D., Baumgarten B.U., Schröppel K., Geissdörfer W., Röllinghoff M., Bogdan C.: High diversity of *ankA* sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 5033–5040, 2003
48. Wirtgen M., Nahayo A., Linden A., Losson B., Garigliany M.M., Desmecht D.: Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Vet. Rec.*, 168, 9, 2011
49. Yoshimoto K., Matsuyama Y., Matsuda H., Sakamoto L., Matsumoto K., Yokoyama N., Inokuma H.: Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from *Haemaphysalis megaspinosa* in Hokkaido, Japan. *Vet. Parasitol.*, 168, 1, 170-172, 2010

Primljeno: 06.11.2012.
Odobreno: 08.05.2013.

Originalni naučni rad

UDK616.995.121(497.11)“2002-2011“

KARAKTERISTIKE TRIHINELOZE KOD LJUDI NA TERITORIJI VOJVODINE U PERIODU 2002-2011^{1*}

Miroslav I. Urošević², Jelena Petrović², Milorad Mirilović³,
Zoran A. Ristić⁴, Igor Jajić⁵

¹ Institut za prehrambene tehnologije, Novi Sad

² Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad,

³ Fakultet veterinarske medicine, Beograd

⁴ Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad

⁵ Poljoprivredni Fakultet, Novi Sad

Kratak sadržaj

Na osnovu aktuelnih podataka o pojavi ovog oboljenja i brojnih naučnih istraživanja, uočava se da je Trihineleza već nekoliko decenija naša stvarnost, a teritorija Srbije epidemiološko područje. Nepovoljna epidemiološka situacija je posledica raširenosti žarišta trihineleze i nesprovođenja validne kontrole infestiranosti mesa i mesnih produkata proizvedenih u domaćinstvima. Cilj ovog rada je da predstavi karakteristike registrovanih epidemija trihineleze u Vojvodini, po starosnoj i polnoj strukturi obolelih osoba na osnovu podataka Instituta za javno zdravlje Vojvodine u Novom Sadu. Analizom broja obolelih i hospitalizovanih ljudi na teritoriji Autonomske pokrajine Vojvodine u ispitivanom vremenskom intervalu od deset godina (od 2002. do 2011. godine), ustanovljeno je da je obolelo ukupno 983 osoba. Posmatrajući svaku godinu posebno ustanovljava se da je najveći broj obolelih ljudi od trihineleze bio 2005. godine. U toj godini obolelo je 277 lica, uz to, epidemiološka situacija je bila vrlo nepovoljna u 2002. godini kada je obolelo 275 ljudi. Važno je napomenuti, da je u ove dve godine (2002. i 2005. godina) bilo i tri smrtna ishoda koja su nastali kao direktna posledica migracije i velikog naseljavanja infektivnih larvi *T. spiralis* u organizmu obolelih. Sa druge strane, u analiziranom desetogodišnjem periodu najmanji broj obolelih ljudi (10) zabeležen je 2010. godine. U kontroli

^{1*} Rad je realizovan po projektima „TR31084“ i „TR31034“ koji se finansiraju od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

E-mail: urosevic.miro2012@gmail.com

² E-mail: urosevic.miro2012@gmail.com

bolesti najvažnija je primarna prevencija koja podrazumeva odgovarajuće držanje životinja, a osnovna mera za sprečavanje obolevanja ljudi je pregled mesa domaćih svinja, divljih svinja, konja, ali i mesa drugih životinja koje mogu biti izvor infekcije. Glavni rizik za pojavu bolesti je konzumiranje sirovog i nedovoljno termički obrađenog mesa ukoliko uzorci poprečno-prugaste muskulature sa predilekcionih mesta nisu pregledani standardnim metodama, trihineloskopijom i veštačkom digestijom

Ključne reči: Trihinelozu; Vojvodina, epidemija, ljudi, pol, starost

CHARACTERISTICS OF HUMAN TRICHINELLOSIS IN THE TERRITORY OF VOJVODINA IN THE PERIOD 2002-2011

**Miroslav I. Urošević¹, Jelena Petrović², Milorad Mirilović³,
Zoran A. Ristić⁴, Igor Jajić⁵**

¹ Institute of Food Technology, Novi Sad

² Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad,

³ Faculty of Veterinary Medicine, Beograd

⁴ Faculty of Science, Novi Sad

⁵ Faculty of Agriculture, Novi Sad

Abstract

Current data on the incidence of the disease and abundant research strongly indicate that Trichinellosis has been widely present throughout past few decades, and is endemic in some regions of Serbia. Unfavourable epidemiological situation is due to high prevalence of infection sources and inadequate control of home-processed meat and meat products. The aim of this article was to describe the features of recorded trichinellosis outbreaks in Vojvodina according to gender structure of patients, based on the records obtained from the Institute for Public Health of Vojvodina in Novi Sad. Analysis of the number of diseased and hospitalized patients from the territory of Autonomous Province of Vojvodina in the ten-year period (2002-2011) revealed a total number of 983 patients with trichinellosis. The highest incidence of the disease was recorded in 2005, when 277 people were diagnosed with trichinellosis. Unfavourable epidemiological situation was observed also in 2002, with 275 affected patients. It is to be emphasized that in 2002 and 2005 three lethal outcomes were recorded,

as a direct consequence of intensive migration and abundant invasion of *T. spiralis* larvae. The lowest incidence of the disease was recorded in 2010, that is, only 10 diseased patients. Primary prevention implying appropriate animal husbandry is the crucial point for the disease control, while thorough and systematic inspection of meat of home-produced pigs, wild boars, horses and other animals that can be a potential source of infection. The major risk factor for the occurrence of the disease is consuming raw or undercooked meat that was not subjected to standard examination methods, i.e. examining the skeletal striated musculature from predilection sites by trichinoscopy or artificial digestion.

Key words: Trichinellosis; Vojvodina, epidemics, humans, gender, age

UVOD

Trihinelozu je parazitska bolest uzrokovana sa nematodama iz vrste *Trichinella spp.* Ova važna zoonoza je prisutna pre svega kod divljih karnivora sklonih kanibalizmu, i koji se hrane lešinama drugih životinja. Razvojni ciklus infekcije sa *Trichinella spp.* moguć je kako kod divljih životinja (kao što je silvatični ciklus, i obuhvata lisice, vukove, divlje svinje, medvede, jazavce) tako i u populacijama farmskih životinja (odnosno „domaći“ ciklus). Ishrana sa drugim životinjama i/ili njihovim ostacima ima ključni značaj u prenošenju trihineloze (Kapel, 2000).

Na osnovu aktuelnih podataka o pojavi ovog oboljenja i brojnih naučnih istraživanja, uočava se da je trihinelozu već nekoliko decenija naša stvarnost, a teritorija Srbije epidemiološko područje. Iz ovih razloga je nacionalno veterinarsko zakonodavstvo od samog početka pa do današnjih dana trihinelozu davalo značajno mesto. Ipak, u skladu sa strategijom naše zemlje ka pristupanju Evropskoj Uniji i obavezom za harmonizacijom propisa vezanih za zdravlje ljudi i životinja, postoji prostor za korekciju i dopunu zakonske regulative koja se odnosi na trihinelozu svinja. (Urošević i sar., 2012-A)

Trihinelozu ljudi najčešće se javlja kada čovek konzumira svinjsko meso i prerađevine od mesa u kojima se nalaze infektivne larve *T. spiralis*. Nakon konzumiranja invadiranog mesa, ukoliko se unese dovoljan broj infektivnih larvi (minimalno 50 - 70), dolazi do ispoljavanja kliničke slike, koja je karakteristična za pojedine faze bolesti. Posle faze inkubacije, koja većinom traje šest do petnaest dana (maksimalno četrdeset i dva dana), dolazi do ispoljavanja kliničke slike u kojoj su dominantna tri simptoma: groznica, otok i bol u mišićima. Nakon inkubacionog perioda javlja se povišena telesna temperatura, koja traje jednu do tri nedelje i najčešće se kreće u intervalu od 40 do 41°C.

Ona je permanentna i praćena je jakom glavoboljom i iznemoglošću organizma. (Mirilović, 2006).

Nepovoljna epidemiološka situacija je posledica raširenosti žarišta trihineloze i nesprovođenja validne kontrole infestiranosti mesa i mesnih produkata proizvedenih u domaćinstvima. Analiza registrovanih epidemija trihineloze u AP Vojvodini u periodu 1984- 1993. godine pokazuje da je osnovni rezervoar zaraze domaća svinja a do zaražavanja najčešće dolazi za vreme svinjokolja (Šeguljev i sar., 1995).

Prema dostupnim podacima, nema mnogo naučnih publikacija, koje obrađuju slučajeve trihineloze ljudi u Vojvodini. Izuzetak su radovi Šeguljev i sar. (2011)., gde se navodi da epidemija trihineloze u Srednjobanatskom okrugu, počela krajem 2001. godine spada među najveće epidemije trihineloze u Vojvodini. U periodu od 20.12.2001. do 22.1.2002. godine u ovoj epidemiji je obolelo 313 osoba, od kojih su 288 sa područja AP Vojvodine, a 25 su iz drugih područja Srbije ili iz drugih zemalja. Najveći broj obolelih je naveo podatak da je jeo dimljenu kobasicu koja je proizvedena u privatnoj klanici i prodavana u više objekata na području Srednjeg Banata. Pored dimljene kobasice, veterinarska sužba je prisustvo trihinele dokazala i u salamurenoj slanini istog proizvođača. Visoka incidencija trihineloze 2005. godine posledica je javljanja tri epidemije trihineloze koje su se širile infestiranim dimljenim kobasicama iz nelegalne proizvodnje i prodaje. U ovim epidemijama, oboleli su direktno kupovali kobasice od neregistrovanog privatnog proizvođača (dve epidemije) ili su ih kupovali na pijaci (jedna epidemija). U ovim epidemijama je registrovano preko 200 slučajeva trihineloze kod stanovnika Vojvodine, ali je ukupan broj obolelih i veći jer su inficirane namirnice konzumirale i osobe sa drugih područja Srbije ili su ove namirnice eksportovane i u druge zemlje. (Šeguljev i sar., 2011). I danas se Srem može smatrati hiperendemskim područjem jer je preko 30% svih porodičnih epidemija sa ovih prostora. Prva autohtona porodična epidemija trihineloze je registrovana na području Severnobačkog okruga 2002. godine, a na području Severnobačkog okruga 2008. godine. Ovi podaci pokazuju da su žarišta trihineloze danas rasprostranjena u čitavoj Vojvodini i da svaki propust u kontroli inficiranosti mesa nosi rizik od obolevanja ljudi od trihineloze. (Šeguljev i sar., 2011).

O značaju trihineloze u Vojvodini, govore i nalazi Ristića i sar. (2010), gde se navodi da prisustvo žarišta brojnih zoonoza u AP Vojvodini, čini ovu grupu oboljenja značajnim epidemiološkim problemom, uprkos činjenici da je ukupan broj obolelih i umrlih od pojedinih zoonoza mali, a prosečna registrovana incidencija, sa izuzetkom lajmske bolesti i trihineloze, ispod 1/100.000.

To je bio povod da napravimo analizu pojave trihineloze na teritoriji Vojvodine u periodu od 2002. do 2011. Cilj ovog rada je da predstavi karakte-

ristike registrovanih epidemija trihineloze u Vojvodini, po starosnoj i polnoj strukturi obolelih osoba.

MATERIJAL I METODE

Analiza je napravljena na osnovu podataka Instituta za javno zdravlje Vojvodine u Novom Sadu. Obuhvaćen je desetogodišnji period od 2002-2011. godine.

Pri razmatranju starosnih kategorija obolelih ljudi sve obolele osobe smo podelili u osam starosnih grupa, i to: 0-6 god.; 7-14 god.; 15-19 god.; 20-29 god.; 30-39 god.; 40-49 god.; 50-59 god. i starije od 60 godina.

REZULTATI

Analizom broja obolelih i hospitalizovanih ljudi na teritoriji Autonomne pokrajine Vojvodine u ispitivanom vremenskom intervalu od deset godina (od 2002. do 2011. godine), ustanovljeno je da je obolelo ukupno 983 osoba. Od ovog broja bilo je 555 bolesnika muškog pola i 428 bolesnika ženskog pola. Broj obolelih muškaraca predstavlja 56,45% od ukupno obolelih, a broj obolelih žena predstavlja 43,54% od ukupno obolelih.

Posmatrajući svaku godinu posebno ustanovljava se da je najveći broj obolelih ljudi od trihineloze bio 2005. godine. U toj godini obolelo je 277 lica, što predstavlja 28,18% od svih obolelih ljudi u toku desetogodišnjeg perioda istraživanja. Uz to, epidemiološka situacija je bila vrlo nepovoljna u 2002. godini kada je obolelo 275 ljudi što predstavlja 27,98% od ukupnog broja obolelih za ceo period istraživanja. Broj obolelih ljudi tokom ove dve godine bio je 552 što predstavlja 56,15% obolelih ljudi u AP Vojvodini u periodu od 2002. do 2011. godine, što je i prikazano u tabeli 1. Važno je napomenuti, da je u ove dve godine (2002. i 2005. godina) bilo i tri smrtna ishoda koja su nastali kao direktna posledica migracije i velikog naseljavanja infektivnih larvi *T. spiralis* u organizmu obolelih. Ova tri letalna ishoda predstavljaju broj svih umrlih ljudi u ispitivanom periodu. U analiziranom desetogodišnjem periodu najmanji broj obolelih ljudi (10) zabeležen je 2010. godine što predstavlja 1,02 % od ukupnog broja obolelih osoba za ceo ispitivani period.

Na osnovu urađenih analiza ustanovili smo da je najveći broj obolelih ljudi bio u šestoj starosnoj grupi, odnosno pripadao je starosnoj kategoriji od 40 do 49 godina. U navedenoj kategoriji obolelo je ukupno 195 osoba, a od tog broja bilo je 111 osoba muškog pola i 84 obolelih ženskog pola. U odnosu na ukupan broj obolelih (983) broj obolelih u ovoj starosnoj grupi predstavlja 19,83% (tabela 2). Uz to, vrlo visok procenat obolelih (17,50%) pripada starosnoj ka-

tegoriji od 30 do 39 godina starosti, gde je obolelo 172 ljudi. Ove dve starosne kategorije ukupno imaju 367 obolelih osoba, odnosno u njima se nalazi 212 bolesnika muškog pola i 155 bolesnika ženskog pola, što predstavlja 37,33% od svih obolelih ljudi u AP Vojvodini. Najpovoljnija epidemiološka situacija bila je u prvoj starosnoj grupi do 6 godina života, gde je obolelo ukupno 40 ili 4,06% od ukupnog broja obolelih.

DISKUSIJA

Navedeni rezultati se mogu se donekle uporediti sa istraživanjima Mirilovića (2006) o pojavi trihineloze u Srbiji u periodu od 1994. do 2003. godine. Tokom 1995. i 1997. godine, bilo je tri smrtna ishoda koji su nastali kao direktna posledica migracije i velikog naseljavanja infektivnih larvi *T. spiralis* u organizmu obolelih. Ova tri letalna ishoda predstavljaju polovinu umrlih ljudi u celom ispitivanom periodu. Letalni ishodi, kao posledica trihineloze, javili su se još i 1998., 2001. i 2002. godine - tokom svake od navedenih godina bio je po jedan smrtni slučaj. U analiziranom desetogodišnjem periodu najmanji broj obolelih ljudi (178) bio je 2003. godine ili 3,45% od ukupnog broja obolelih ljudi za ceo ispitivani period.

Sa druge strane, epidemiološka situacija trihineloze je u većini zemalja Evropske unije relativno povoljna. U 2007. godini prosečna incidencija je 0,2/100.000. Od 867 registrovanih slučajeva, preko 90% je iz Rumunije, Poljske i Bugarske. Krajem prošlog veka velike epidemije trihineloze su registrovane u Francuskoj i Italiji, a uzrokovane su infestiranim konjskim mesom (Mantovani i sar., 1980; Ancelle i sar., 1988). Mada je opisano više manjih epidemija trihineloze posle konzumiranja mesa mesom divljači, glavni izvor zaraze za većinu epidemija je meso domaće svinje (Dupouy-Camet, 2006).

Svinjsko meso je glavni izvor zaraze trihineloze u AP Vojvodini i za razliku od većine zemalja Evropske unije u našoj pokrajini je epidemiološka situacija nepovoljna. Prosečna incidencije trihineloze u AP Vojvodini u posmatranom periodu je 6,40/100.000. (Ristić i sar., 2010).

Pošto su svinjokolji češći u zimskim mesecima, trihinelozu ima sezonski karakter, sa maksimalnim brojem obolelih u januaru (42,15%). Od trihineloze obolevaju osobe svih dobnih grupa a veća incidencija za osobe muškog pola (7,41/100.000) u odnosu na osobe ženskog pola (5,44/100.000), može se smatrati posledicom veće ekspanzije. (Ristić i sar., 2010).

Mirilović je u svom istraživanju (2006) o desetogodišnjem periodu praćenja trihineloze (1994-2003) podelio sve obolele u pet starosnih grupa. Ustanovljeno je da je najveći broj obolelih ljudi bio u trećoj starosnoj grupi, odnosno pripadao

je starosnoj kategoriji od 20 do 39 godina. U ovoj kategoriji obolelo je ukupno 1.968 ljudi, a od tog broja bilo je 1.102 obolelih muškog pola i 866 obolelih ženskog pola. U odnosu na ukupan broj obolelih (5.157) broj obolelih u ovoj starosnoj grupi predstavlja 38,16%. Takođe, vrlo visok procenat obolelih (31,61%) nalazi se u starosnoj kategoriji od 40 do 59 godina starosti, gde je bilo obolelo 1.630 ljudi. Ove dve starosne kategorije ukupno imaju 3.598 obolelih ljudi, odnosno u njima se nalazi 2.032 bolesnika muškog pola i 1.566 bolesnika ženskog pola, što predstavlja 69,77% od svih obolelih ljudi u Republici Srbiji. Najpovoljnija epidemiološka situacija bila je u starosnoj grupi do šest godina gde je odolelo ukupno 204 deteta ili 3,96% od ukupnog broja obolelih. (Mirilović, 2006)

Tokom posmatranog desetogodišnjeg perioda u Vojvodini je registrovano 1 300 slučajeva trihineloze kod ljudi. Kod tri bolesnika oboljenje je imalo smrtni ishod sa letalitetom od 0,2%. (Šeguljev i sar., 2011)

Mada distribucija inficiranih namirnica iz mesarskih radnji ili neregistrovane prodaje nosi rizik od izbijanja epidemija većih razmera, u Vojvodini su najbrojnije porodične epidemije trihineloze, uzrokovane mesom iz sopstvenog uzgoja odnosno mesnim prerađevinama proizvedenim za sopstvene potrebe i čine 78,0% svih registrovanih epidemija. Ove epidemije, koje su ograničene na članove porodice, rođake i prijatelje obično su manjih razmera. Epidemiološkim ispitivanjem je utvrđeno da su oboleli najčešće konzumirali dimljene kobasice, pošto se ova namirnica nakon svinjokolja prva konzumira, dok se ostali infestirani proizvodi, konzervirani dimljenjem ili salamurenjem, upotrebljavaju kasnije (Šeguljev i sar., 2011)

Pravovremena i tačna dijagnoza važna je zbog primene adekvatne specifične terapije i kao pomoć u epidemiološkom nadzoru bolesti. Uprkos postojanju zakonskih propisa kojima su regulisane mere sprečavanja i suzbijanja trihineloze, epidemiološka situacija u AP Vojvodini je i dalje nepovoljna. Osnovni izvor zaraze trihineloze u Vojvodini je domaća svinja, a najrizičnije namirnice su dimljene kobasice. Nepovoljna epidemiološka situacija je posledica raširenosti žarišta trihineloze i nesprovođenja validne kontrole mesa i mesnih produkata proizvedenih u domaćinstvima i klanicama, kao i nelegalne proizvodnje i prodaje trihineloznih namirnica (Šeguljev i sar., 2011).

Mada su u evropskim zemljama registrovane epidemije trihineloze prouzrokovane mesom divljači i mesom konja, najznačajniji izvor zaraze je domaća svinja (Dupouy-Camet, 2006; Pozio i sar., 2003). Tokom desetogodišnjeg praćenja situacije u Vojvodini je samo za jednu porodičnu epidemiju dobijen podatak da je u smesu za kobasice dodavano i meso divlje svinje. Retrogradnim ispitivanjem mesa divlje svinje, veterinarska služba je dokazala prisustvo trihinele. (Šeguljev i sar., 2011).

ZAKLJUČAK

Infekcija trihinelom i danas ima važan zdravstveni značaj. To je, pre svega, zbog epidemijskog potencijala infekcije. U kontroli bolesti najvažnija je primarna prevencija koja podrazumeva odgovarajuće držanje životinja, a osnovna mera za sprečavanje obolevanja ljudi je pregled mesa domaćih svinja, divljih svinja, konja, ali i mesa drugih životinja koje mogu biti izvor infekcije. Glavni rizik za pojavu bolesti je konzumiranje sirovog i nedovoljno termički obrađenog mesa ukoliko uzorci poprečno-prugaste muskulature sa predilekcionih mesta nisu pregledani standardnim metodama, trihineloskopijom i veštačkom digestijom. Ovim direktnim metodama, koje se vrše nakon klanja dokazuje se prisustvo inkapsuliranih larvi.

Domaće svinje su glavni izvor trihineloze za ljude. Oboljenje nastaje nakon konzumiranja nedovoljno termički obrađenog mesa u kome se nalaze žive larve. Iako registrovani slučajevi zoonoza potvrđuju postojanje autohtonih žarišta brojnih oboljenja, ove grupe u AP Vojvodini ne predstavljaju realnu situaciju s obzirom na ograničene mogućnosti etiološke dijagnostike.

Potpuniju sliku o učešću zoonoza u nacionalnoj patologiji pružila bi ciljana laboratorijska ispitivanja, usmerena na utvrđivanje prokuženosti potencijalno ekspanzirane populacije, postavljanje etiološke dijagnoze kod pacijenata sa suspektim simptomima i otkrivanje rezervoara, odnosno postojanje autohtonih žarišta ovih oboljenja. Poznavanje realne epidemiološke i epizootološke situacije zoonoza je preduslov za organizovano planiranje i sprovođenje mera za njihovo suzbijanje i zaštitu ljudi od infekcije.

Obzirom na velike razlike u pravilnicima koji se primenjuju u Srbiji u odnosu na Evropsku Uniju, mišljenja smo da je neophodno pristupiti njihovom prilagođavanju, ne samo zbog zdravstvene bezbednosti hrane, već i uslova koje zahtevaju uvoznici našeg mesa u EU. Takođe, neophodno je podizanje svesti vlasnika i držalaca svinja, kao klanica o pravilnom uzimanju uzoraka za trihinoskopski pregled, i o značaju istog.

Efikasna kontrola zoonotskih bolesti će zahtevati dodatne napore u proučavanju uloge divljih životinja kao rezervoara zoonoza. Ovo uključuje i epidemiološke studije, kao i obezbeđenje efikasne kontrole mesa divljači, sprovođenje sigurnosnih mera u rukovanju sa divljači i metodama evisceracije i bezbedno odlaganje konfiskata. Primena ovih mera zahteva podizanje svesti i saradnju lovaca, i mora da se zasniva kako na njihovom treningu, tako i na motivaciji.

Generalna strategija prevencije podrazumeva primenu mehanizama kojima se može sprečiti/prekinuti infestacija hrane i transmisija bolesti. U budućnosti, prevencija trihineloze u većoj meri će zavisiti od kontrole kontaminira-

nosti hrane životinjskog porekla. S veterinarske tačke gledišta, preporučljiva je upotreba senzitivnijih seroloških metoda (ELISA, IIF) za pregled zaraženosti životinjskog mesa na *T. spiralis* umesto važećeg mikroskopskog ispitivanja nekoliko grama mesa. Zdravstveno prosvetavanje opšte populacije od najveće je važnosti u prevenciji infestacije trihinelom. Znanje konzumenta o osnovnim principima bezbednosti hrane je važna, ali nedovoljna komponenta prevencije. Na farmama, uništavanje populacije glodara i sprečavanje kontakata između svinja i divljih životinja važne su strategije u sprečavanju humane trihineloze.

LITERATURA

1. Ancelle T., Dupouy-Camet J., Bougnoux M.E., Fourestie V., Petit H., Mougeot G.: Two outbreaks of trichinosis caused by horsemeat in France in 1985. *Am J Epidemiol*, 127, 1302-1311, 1988.
2. Dupouy-Camet J.: Trichinellosis: still a concern for Europe. *Euro Surveill* 2006; 11, 1; pii=590. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=>
3. Kapel C.M.: Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission, *Vet. Parasitol.*, 93, 263-278, 2000.
4. Mantovani A., Filippini I., Bergomi S.: Indagini su un'epidemia di trichinellosi umana verificatasi in Italia. *Parassitologia*, 22, 107-34, 1980.
5. Mirilović M.: Economic analysis of epizootic-epidemiologic status of trichinellosis in Serbia and development of eradication programme. PhD-Thesis, Faculty of veterinary medicine, Belgrade University, Belgrade, Serbia. 2006.
6. Pozio E., Marucci G.: Trichinella-infected pork products: a dangerous gift. *Trends Parasitol.*, 19, 338, 2003.
7. Ristić M., Šeguljev Z., Vidić B., Petrović V., Ilić S.: struktura zoonoze u AP Vojvodini u periodu 2000-2009. godina. *Arh. vet. med.*, 3, 1, 1-112, 2010.
8. Radosavljević V., Čekanac R., Merčep M., Jakovljević B.: Epidemija trihineloze u vojničkom kolektivu. *Vojnosanitetski Pregled* 65, 12, 887-892, 2008.
9. Šeguljev Z., Vuković B., Petrović M., Muškinja N., Ilić S.: Zooantroponoze u Vojvodini. IV. Epidemiološke karakteristike trihineloze u Vojvodini. *Med pregl*, 3-4, 75-79, 1995.
10. Šeguljev Z., Vidić B., Ilić S., Petrović V., Petrović M., Prica N.: Epidemije trihineloze u AP Vojvodini u periodu 2000-2009. godine. *Vet. glasnik* 65, 5/6, 409 - 417, 2011.
11. Tešić M., Baltić M., Božić D., Stojiljković Lj., Plavšić B., Tajdić N., Mirilović M., Rajković M.: Effects of the application of trichinellosis control program in an endemic area in Serbia. *Acta Veterinaria*, 61, 1, 77-87, 2011.

12. Urosevic I.M., Aleksic Z., Petrovic J., Pusic I., Radovic I., Stojanac N.: Swine trichinellosis in Serbia – legislation in relation to the European Union. In: Proceeding of 2nd International epizootiology days and XIV Serbian epizootiology days. Belgrad, 149-156, 2012.
13. Urosevic I.M., Paulsen P., Petrovic J., Ristic A.Z., Jajic I.: The importance of trichinellosis and other zoonoses of the wildlife in the West-Balkan region. In: Poceedings (International symposium of hunting) „Modern aspects of sustainable management of game population“. Zemun – Belgrade, Serbia Faculty of agriculture, 2012, 113-117.
14. Zivojinovic M., Dimitrijevic G., Lazic M., Petrovic M., Sofronic-Milosavljevic Lj.: Trichinella prevalence in swine in an endemic district in Serbia: Epidemiology and control. *Veterinary Parasitology* 159, 358–360, 2009.

Prilog 1.

Tabela 1. Broj obolelih ljudi od trihineloze po polu i godinama u AP Vojvodini od 2002. do 2011. godine

godina	muško	žensko	ukupno	%
2002	154	121/1	275/1	28
2003	32	20	52	5,29
2004	24	22	46	4,68
2005	146/2	131	277/2	28,2
2006	63	35	98	9,97
2007	36	21	57	5,80
2008	32	23	55	5,60
2009	23	21	44	4,48
2010	6	4	10	0,10
2011	39	30	69	7,02
ukupno	555/2	428/1	983/3	100

Prilog 2.

Tabela 2. Broj obolelih ljudi oba pola, po starosnim kategorijama u AP Vojvodini u periodu od 2002 do 2011. godine

Pol	Starost obolelih (godina života), po grupama								
	do 6	7-14	15-19	20-29	30-39	40-49	50-59	>60	Svega
Muški	17	64	37	92	101	111	69	64	555
Ženski	23	29	25	64	71	84	74	58	428
Ukupno	40	93	62	156	172	195	143	122	983
%	4,06	9,46	6,31	15,87	17,50	19,83	14,55	12,41	100,00

Primljeno: 15.02.2013.
Odobreno: 08.05.2013.

Originalni naučni rad

UDK 636.4:612.617

MODEL SARADNJE REPRO-CENTARA I LABORATORIJE ZA REPRODUKCIJU U KONTROLI KVALITETA SEMENA NERASTOVA

Aleksandar Milovanović¹, Tomislav Barna¹,

Dubravka Milanov¹, Miodrag Lazarević²

¹ Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad

² Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Kratak sadržaj

U ovom radu su opisani postupak i rezultati kontrole kvaliteta semena nerastova u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ na osnovu kontinuirane saradnje sa farmskim centrima za proizvodnju semena nerastova. U analizi kvaliteta semena je korišćena kompjuterska analiza (CASA-computer assisted sperm analysis), protočna citometrija i cito-morfološki pregled. Odabrani parametri kvaliteta semena su upoređivani sa reproduktivnim parametrima krmača kao što su oprasivost, broj prasadi po leglu, odnos živorođene i mrtvorodene prasadi. Ocena kvaliteta semena na osnovu progresivne pokretljivosti, koncentracije spermatozoida, morfoloških odlika i oštećenja hromatina je korišćena za davanje preporuka o načinu pripreme semena, određivanje stepena razređenja ili sprovođenje eventualne terapije nerastova, odnosno, njihovog isključenja iz priploda. Ove analize semena se dopunjavaju sezonskim bakteriološkim pregledom i kontrolom u slučaju pada kvaliteta semena. Za svakog nerasta je otvorena kartoteka kvaliteta semena sa grafičkim prikazom i reproduktivnim pokazateljima, radi lakšeg praćenja. Kontinuirana sistematska analiza kvaliteta semena, kombinovana sa više savremenih metoda, dopunjena povremenim bakteriološkim pregledom, daje mogućnost pouzdane procene kvaliteta semena nerastova.

Ključne reči: nerastovi, reprodukcija, seme

MODEL FOR COOPERATION BETWEEN BOAR STUDS AND LABORATORIES FOR REPRODUCTION IN BOARS' SEMEN QUALITY CONTROL

Aleksandar Milovanović¹, Tomislav Barna¹,
Dubravka Milanov¹, Miodrag Lazarević²

¹ Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad

² Faculty of veterinary medicine University of Belgrade

Abstract

In this article we presented procedures and results of boar semen quality control performed at the Scientific Veterinary Institute "Novi Sad" based on continuous cooperation with the farms' centers for boar semen production. The data obtained by computer analysis (CASA-computer assisted sperm analysis), flow cytometry and cyto-morphologic examination were used for semen quality evaluation. The selected parameters were compared with the reproductive results in sows, such as: farrowing rate, number of piglets per litter, ratio of piglets born alive and stillborn piglets). Semen quality evaluation based on spermatozoa progressive motility, sperm concentration, morphological characteristics and chromatine structure damage were used to give recommendations for semen processing, dilution degree, prospective therapy of boars, or, at least, their culling. Analysis of semen was complemented with seasonal bacterial cultivation and controls in cases of sudden drop on semen quality. Separate files containing semen quality graphs and reproductive indicators for easier monitoring were created for every boar. Systematic semen analyses performed by the use of several modern methods, along with periodic bacteriological control, offer possibilities for reliable assessment of boars' semen quality.

Key words: sperm quality, boar, reproduction

Uzimanje sperme nerasta i proizvodnja semena za veštačko osemenjavanje krmača i nazimica vrši se u centrima za veštačko osemenjavanje, farmskim centrima, manjim reproduktivnim centrima u privatnom vlasništvu ili u vlasništvu udruženja (asocijacija) odgajivača svinja. Zastupljena je i proizvodnja semena od strane veterinarskih i paraveterinarskih službi, kao i nekontrolisani prirodni pripust. Sa stanovišta intenzivne proizvodnje, centri za v.o. i farmški centri dominantni su nosioci genetskog i tehnološkog napretka i po pravilu, iskazuju volju za primenu tehnoloških inovacija.

U našoj zemlji ne postoji definisan pravilnik o kvalitetu semena, obaveznoj

povremenoj eksternoj kontroli kvaliteta proizvedenih doza semena nerasta i obaveznoj proizvođačkoj deklaraciji na pakovanju semena nerastova.

Većina svinjarskih farmi ima zatvoren sistem proizvodnje i potrošnje semena u okviru svojih organizacionih jedinica. Analize se, i u ovim slučajima, uglavnom sprovode u ekscesnim situacijama, kada je kvalitet semena kod značajnijeg broja nerastova loš, a seme neupotrebljivo. Rukovodstvo na većini velikih komercijalnih svinjarskih farmi često nema jasnu viziju o značaju i potrebnim merama kako bi se obezbedila kvalitetna proizvodnja semena. Tako su objekti za nerastove, uglavnom, direktno povezani sa tovilištima, bukarištima, bez ograničavanja i kontrole ulaza radnika i nezaposlenih lica u centre. Probleme kvaliteta semena centri rešavaju novonabavljenim, skupim uvoznim nerastovima koji se smeštaju u prostorije sa priplodnim grlima iz sopstvene proizvodnje. Ova grla su često opterećena određenim infektivnim oboljenjima koja kod uvezenih grla nisu postojala. Upravo iz tog razloga, nerastovi iz uvoza za kratko vreme obole od domicilnih virusnih i bakterijskih bolesti, izazvanih bilo specifičnim ili ubikvitarnim mikroorganizmima. Unakrsna infekcija je praktično neizbežna. Oboljenja, po pravilu, dovode do smanjenja kvaliteta semena, plodnosti, a često i do isključenja iz dalje proizvodnje. Oscilacije u ishrani, plesniva hrana, prisustvo mikotoksina u proizvodnim šaržama za nerastove, nisu retkost na našim farmama.

Higijena držanja priplodnih nerastova i proizvodnja semena često nisu na zadovoljavajućem nivou. Neophodno je prilagođavanje tehnologije razređivanja i pakovanja semena u jednokratne, plastične bočice kako bi se naknadna kontaminacija svela na najmanju moguću meru. Priručne laboratorije na farmama ponekad nemaju opremu za određivanje broja spermatozoida (fotometri, denzitometri), tako da se razređenje sperme radi iskustveno, na osnovu subjektivne procene, neracionalno i nekvalitetno. Sve ove okonolosti zbirno dovode do toga da je prosečna oplodnja krmača ispod 80%, do malog broja oprasene prasadi po leglu, neujednačenih legala i povećanog broja mrtvorode ne prasadi. Nerastovi bez kvalitetne kontrole sperme se uključuju u eksploataciju, pa tek nakon učestalih povraćanja krmača, manjeg broja prasadi u leglu i nakon dužeg perioda isključe iz priploda, mada su uvezeni kao elitna priplodna grla i skupo plaćeni.

Nasuprot ovome, progresivna rukovodstva farmi (tzv. „menadžment“), donose dugoročne planove i programske ciljeve za priplodne nerastove koji su iznad nominalnih zahteva važećih Pravilnika. Stroge higijenske mere i putevi kretanja ljudi i opreme su na ovim farmama deo standardne operativne prakse. Upravo su takve farme orijentisane ka daljem unapređenju poslovanja kroz bolju kontrolu kvaliteta semena koju pruža savremena laboratorijska dijagnostika.

Kontrola kvaliteta semena u veterinarskoj medicini ima dugu istoriju i evoluciju kroz brojne metode ispitivanja. Tradicionalne - klasične metode ispitivanja podrazumevaju određivanje progresivne pokretljivosti, vitalnosti, koncentracije i morfologije spermatozoida. Podaci iz literature (Graham i sar., (1980); Amann (1989); Quintero-Moreno i sar., (2004); Didion (2008)), ukazuju da su ovi parametri u različitoj korelaciji sa plodnošću, od $r=0,06$ do $r=0,86$, i da ni jedan od ovih testova nije u konzistentnoj korelaciji sa plodnošću. Amann (1989) je ove razloge grupisao: na nedostatak pouzdanih povratnih informacija o plodnosti nerastova, složenu fiziologiju semena, a delom i na netačnost *in vitro* analiza. Amann i Hammerstedt (1993) čak navode da se uključivanjem većeg broja testova dolazi do podataka o sve manjem procentu spermatozoida koji su u mogućnosti da oplode jajnu ćeliju. Juonala i sar. (1998) preporučuju da se veličina legla kod prvopraskinja ne uzima u obzir prilikom procene kvaliteta semena, usled brojnih sporednih uticaja na opRASIVOST.

Postoje Neki parametri kvaliteta semena koji se mogu kompenzovati povećanjem broja spermatozoida u dozi. Suprotno ovome, priplodnjaci sa ejakulatima slabije plodnosti kod kojih se nedostaci ne mogu kompenzovati ili poboljšati povećanjem broja spermatozoida u dozi, uglavnom se teže otkrivaju. Mehanizam njihove slabije plodnosti je verovatna posledica slabijeg vezivanja spermatoziida za jajnu ćeliju i/ili održivosti embriona tokom razvoja (Saacke i sar., 1994). Prema tome, potrebna su dalja istraživanja na ćelijskom i molekulskom nivou, kako bi se i takve jedinice uočile (Evans, 1999). Jedan od tih metoda odnosi se na test strukture hromatina (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA). On pruža informacije o statusu DNK i njegovom uticaju na plodnost (Evenson, 1999).

Dakle, za konzistentan i efikasan rad na tehnologiji proizvodnje sperme nerastova za veštačko osemenjavanje je potrebno više faktora: sofisticirana oprema, iskustvo, dovoljna frekvencija uzoraka na mesečnom (godišnjem) nivou kroz redovnu kontrolu semena, redovno atestiranje instrumenata, konstantna revizija plodnosti nerastova (povratne informacije), dobra saradnja laboratorije i terena, kao i upornost u iznalaženju konačnog rešenja aktuelnog problema.

Postupak kontrole kvaliteta semena nerasta kontinuiranim laboratorijskim nadzorom (ugovornom saradnjom farme sa Institutom)

Farme sa kontinuiranim nadzorom kvaliteta semena treba da dostavljaju uzorke na analizu u intervalima od 1,5-2 meseca. Uzorci se dopremaju u frižider x-xtorbi na $+17^{\circ}\text{C}$, u kome se čuvaju do kraja analize (1-7 dana). Po dopremanju, uzorci se evidentiraju na prijemnom odeljenju kroz jedinstveni

broj protokola, usaglašava se stanje uzoraka sa zahtevom za ispitivanje i oni se usmeravaju na ispitivanje, u zavisnosti od potreba. Status uzoraka (da li je ispitivanje završeno) može se prekontrolisati i na elektronskoj stranici Instituta upisom broja protokola.

U Laboratoriji za reprodukciju za rutinski pregled semena koji se radi u sklopu kontinuiranog nadzora kvaliteta, odabrane su sledeće tehnike:

- kompjuterska analiza semena (ISAS / - Integrirani sistem za analizu semena, Proiser, Španija) kojom se određuje koncentracija, ukupna i progresivna pokretljivost spermatozoida, progresivna i neprogresivna pokretljivost, udeo brzih, srednje brzih, sporih i nepokretnih spermatozoida (% i koncentracija spermatozoida u 1 ml i njihov broj u dozi);
- protočna citometrija (Guava Milipore-IMV, SAD) na test integriteta membrane akrozoma i membrane spermatozoida (kombinacija fluorometrijskih boja PNA-FITC i propidijum jodida) i ispitivanje strukture hromatina (SCSA, sa akridin narandžastim);
- citološko-morfološki pregled supravitalno obojenog razmaza semena eozin-nigrozinom po Blomu obuhvata odnos živih i mrtvih, nalaz intaktnih akrozoma, protoplazmatskih kapljica i ukupnih patoloških formi spermatozoida.

Seme se na osnovu citološko-morfološke klasifikacije prema Jovičinu i sar. (1997), oštećenja hromozoma prema Evensonu i sar. (2002) i na osnovu interne klasifikacije prema broju progresivno pokretnih spermatozoida u dozi (CASA) svrstava u I, II, III klasu ili „van klase“.

Doze se odbacuju (ocenjene kao „van klase“) u sledećim situacijama: CASA parametri / - ukupna pokretljivost spermatozoida <60%, progresivna pokretljivost ispod 30%, aglutinirani – slepljeni spermatozoidi preko 40%); protočna citometrija-integritet membrane <30%, oštećenje akrozoma >30%); i parametri dobijeni prilikom citološko-morfološkog pregleda - ukupno živi spermatozoidi <60%, živi spermatozoidi sa intaktnim akrozomom <40%, oštećen akrozom >30%, protoplazmatska kapljica (>25%*10%?) ili ukupno abnormalnih formi spermatozoida >40%). U pojedinim slučajevima savetuje se kompenzacija lošeg kvaliteta semena povećanjem broja spermatozoida u dozi.

* Althouse G. C. (1998): **Cytoplasmic droplets on boar sperm cells** *Swine Health and Production*, 6, 3, 128. (<http://www.aasp.org/shap.html>).

Značaj pojedinačnih ocena je različit i o tome treba voditi računa pri formiranju konačne ocene i izradi konačnog razređenja. Dobijene vrednosti su upoređene u odnosu na oprasivost, broj prasadi u leglu, odnos živorođene i mrtvororođene prasadi, prema vremenskim blokovima koji su najpribližniji intervalima analize. Time je olakšan rad na ispitivanju uticaja promene kvaliteta semena i sezone na reproduktivne pokazatelje plotkinja.

Suštinski pokazatelj kvaliteta semena odnosi se na broj spermatozoida u dozi koji može da se svrsta u pul spermatozoida sposobnih da svojom kinetikom doputuju do jajnih ćelija, da ih oplode i obezbede normalan razvoj embriona. Zbog toga je korekcija u stepenu razređenja koristan pokazatelj kako za racionalnu proizvodnju semena, tako i za kontrolu postupka razređivanja semena na farmi. Ukoliko je progresivna pokretljivost spermatozoida zadovoljena, onda morfološki pokazatelji određuju dalju kvalifikaciju semena. Prisustvo malformacija u većem procentu („knobbed“ tzv. „dugmasti“ akrozom, nuklearne vakuole, blago-jednostavno savijen spojni deo, protoplazmatične kapljice, pogotovo proksimalne), dokazani su indikatori koji nepovoljno utiču na kvalitet semena i oplodnu sposobnost (Thundathil i sar., 2000; Kopp i sar., 2008; Thundathil i sar., 2001).

Prvi znaci pogoršanja kvaliteta sperme uočavaju se na citološko-morfološkom pregledu i na osnovu njih se može predvideti razvoj kasnijih promena u pokretljivosti i oplodnoj sposobnosti. Procenat oprasivosti ne mora biti u korelaciji sa brojem spermatozoida i jasnim odrazom kvaliteta semena, ukoliko se koristi veći broj spermatozoida (preko 5 milijardi/dozi, odnosno, progresivno pokretljivih od 2,5 milijardi, Milovanović i sar., 2011), Ovim čime se može prevazići veći deo problema u kvaliteta semena. Za dobijanje validnih podataka o plodnosti koji su u korelaciji sa laboratorijskim rezultatima kod veštačkog osemenjavanja, neophodno je da se koristi „kritičan broj spermatozoida“. Ovaj izraz podrazumeva ukupan broj spermatozoida koji dozi daje prepoznatljiv kvalitet ili kombinaciju kvaliteta koji će biti podložni menjanju usled delovanja drugih faktora koji nisu vezani za koncentraciju (Amann, 1986). Npr., uticaj kvaliteta spermatozoida u manjim dozama, od 1-1,5 milijardi spermatozoida pri plitkom, cervikalnom uvođenju katetera kod osemenjavanja je znatno izraženiji, jer je kompenzacija viškom spermatozoida u dozi manje izražena.

Detekcija oštećenja membrane i akrozoma spermatozoida protočnom citometrijom daje preciznije vrednosti za ocenu njihove strukture u odnosu na citološko-morfološku analizu. Akrozomi su osetljivije strukture u odnosu na membranu spermatozoida kod nerastova (obrnut slučaj je kod bikova). Nerastovi sa „osetljivim“ akrozomom prepoznaju se po većem stepenu oštećenja akrozoma na protočnoj citometriji, te se takvi nerastovi nalaze na posebnoj listi (tzv. „lista nerastova osetljivog akrozoma“), koja služi personalu na farmi da vrši razređenja u više koraka, što postepenije.

Sledeći nivo ispitivanja odnosi se na određivanje strukture hromatina (SCSA), koji ukazuje na nepotpuno sazrevanje spermatozoida. Ono može biti posledica postojanja niza fizioloških ili faktora spoljašnje sredine (Martinez, 2005). U poslednjoj dekadi, prikupljeni su podaci o rezultatima plodnosti semena ljudi i životinja koji ukazuju da fragmentacija-degeneracija DNK sper-

matozoida ima negativni uticaj na plodnost i broj potomaka kod pluriparih životinja (Evenson i sar., 2002). Ovaj pokazatelj nije povezan sa pokretljivošću spermatozoida. U humanoj andrologiji, SCSA se navodi kao jedini metod koji je demonstrirao jasne i klinički korisne granične vrednosti za oplodnu sposobnost spermatozoida čoveka. SCSA je standardizovan test i vrši se u skladu sa strogim protokolom, određenim posebnim softverom za analizu i obradu podataka sa protočnog citometra (SCSA-Soft). Srednje SCSA vrednosti u analizi 40 mladih nerastova ukazale su na relativno visok stepen oštećenja hromatina, pri čemu je 20% priplodnjaka imalo više od 15% spermatozoida sa oštećenim hromatinom (Milovanović i sar., 2012). Waberski i sar., (2011) su analizirali 692 uzorka semena od 79 nerastova i to na dan uzimanja. Prosečna vrednost oštećenja hromatina je iznosila 2,6%, sa oscilacijama od 0,2 do 48,8%. Boe-Hansen i sar., (2008) tvrde da oštećenja hromozoma preko 2,1% već ispoljavaju negativne efekte na broj živorođene prasadi, dok oštećenja od preko 20% daju legla sa najviše 6,4 prasadi. Prema tome, oštećenje hromozoma u blažem stepenu, ukazuje na mogućnost smanjenja broja oprašene prasadi ali ne na uspeh koncepcije, što je za napredne farme od izuzetnog značaja.

Kvalitet semena se na kraju, određuje na osnovu broja pokretljivih i progresivno pokretljivih spermatozoida u dozi. U zavisnosti od tehnologije rada na farmi, načina osemenjavanja, broja osemenjavanja po proizvodnoj seriji, vrste i kvaliteta razređivača, dužine čuvanja doze i higijene proizvodnje semena, za pojedinačne farme se podešavaju granične, „sigurnosne“ vrednosti za broj spermatozoida u dozi (Prikaz parametara u Tabeli 1.). Po potrebi se rade i kontrola kvaliteta semena u dugotrajnim razređivačima.

Tabela 1. Prikaz mogućih vrednosti za klasiranje razređenog semena nerastova

Ispitivana () karakteristika	Moguće vrednosti:		
	I klasa	II klasa	III klasa
Ukupan broj spermatozoida u dozi (109)	³ 5,0	4,9-3,0	2,9-2,0
Ukupan broj pokretljivih spermatozoida u dozi (109)	³ 3,5	3,4-2,5	2,4-1,5
Ukupan % pokretljivih spermatozoida	³ 90%	80-89%	60-79%
% progresivno pokretljivih (pp) spermatozoida	³ 50%	49-40%	30-39%
Ukupan broj p.p. spermatozoida u dozi (109)	³ 2,5	2,4-1,5	1,4-1,0

Na dvomesečnom nivou napravljena je rang lista nerastova na osnovu kvaliteta semena. Sperma nerastova prve klase „trpe” veća razređenja, u komercijalnoj proizvodnji, dok se za visokovredne nerastove slabog kvaliteta native sperme posebno podešava režim razređivanja i korišćenja.

Svaki nerast treba da ima otvoren karton sa svim analiziranim parametrima kvaliteta semena (Slika 1.). U karton se unose i podaci o osemenjavanju nazimica i krmača (oprasivost, veličina legla, broj živih i mrtvih prasadi po leglu). Svaku analizu prati kratak komentar operatera na farmi, ocena iz laboratorije Instituta, nalaz, sugestija, androloški nalaz i prognoza. Komentar se pojavljuje nanošenjem kursora na polje za komentar. Karton prati i grafički prikaz pokretljivosti spermatozoida i grafikon o koncentraciji spermatozoida u dozi (ukupan broj, broj pokretljivih i broj progresivno pokretljivih spermatozoida, Slika 2.).

Kartoni se, nakon svake završene analize, elektronskom poštom razmenjuju sa farmom, tako da su stalno ažurirani (od strane Instituta sa podacima o kvalitetu semena, od strane farme sa podacima o oprasivosti).

U slučaju pada vrednosti parametara kvaliteta semena (pre svega CASA i citološko-morfoloških), pristupa se bakteriološkoj kontroli native sperme i razređenog semena. Utvrđuje se broj izraslih kolonija u 1 ml (cfu/ml), vrši se tipizacija bakterija i određuje osetljivost na antibiotike. Podaci o nativnoj spermi ukazuju da li je nerast primarni uzrok bakterijske kontaminacije, dok broj bakterija u razređenom semenu ukazuje na tehnologiju proizvodnje, na mogućnost naknadne kontaminacije kao i na eventualnu rezistenciju bakterija iz razređenog semena na antibiotike razređivača. Po potrebi, može se ispitati destilovana voda, uzeti bris sa laboratorijskog posuđa, pa i sa ruku radnika, radi utvrđivanja izvora kontaminacije. (nov red, čitav pasus ide napred, posle tri pasusa bakteriologije)

Morfološke promene na spermatozoidima mogu da ukažu da li su patološke forme nastale kao posledice problema stvaranja spermatozoida (u toku spermatogeneze, testisi) ili u toku maturacije (spermiogeneza, epididimis). Kristalografija seminalne plazme (fern test), njen hemijski sastav i pH mogu ukazati da li se radi o upali akcesornih polnih žlezda.

Uzorci za bakteriologiju se kultivišu na Columbia agaru obogaćenom sa 5% eritrocita ovna (Oxoid, Basingstoke, UK), MacConkey agaru (Oxoid, Basingstoke, UK) i Sabouraud dekstroza agaru (Torlak, Srbija). Ploče se inkubiraju tokom 72h na 37°C pod aerobnim uslovima.

Određivanje broja bakterija u mililitru (cfu/mL) određuje se brojanjem izraslih kolonija nakon serija desetostrukih razređenja. Osetljivost bakterijskih izolata određuje se disk difuzionom metodom na Mueller-Hinton agaru (Oxoid, Basingstoke, UK).

Obimna kontaminacija saprofitskim bakterijama ukazuje na neophodnost promene pojedinih postupaka u tehnologiji uzimanja i pripreme semena. Ukoliko je izvor kontaminacije iz polnih organa nerastova i ukoliko je morfologija semena očuvana ili su promene blažeg oblika, preporučuje se kratkotrajna antibiotska i potporna terapija, kao i promena razređivača, koji svojim sastavom i kvalitetom omogućuje bolju i dugoročniju kontrolu bakterijske kontaminacije i produženje vitalnosti semena (Suwimonteerabutr i sar., 2011; Dahmani i sar., 2012) ili se sugeriše kratkotrajno čuvanje semena (1-2 dana).

U krajnjem ishodu, ukoliko je nutritivna, vitaminsko-mineralna potpora i antibiotska terapija dovela do nedovoljnog pomaka u kvalitetu native sperme, sugeriše se blagovremena zamena nerasta. U slučaju nalaza visokog stepena degenerativnih promena, potreba za dugom i neizvesnom terapijom, zamena nerastova predstavlja razumno rešenje.

Na posletku, saradnja nerastovskih reproduksijskih centara i laboratorije za reprodukciju podrazumeva i usluge koje se odnose na testiranje mladih, uvoznih nerastova neposredno nakon izlaska iz karantina, s obzirom na njihovu cenu i povećanu osetljivost u periodu aklimatizacije (Jovičin i sar., 2003.; Jovičin i sar., 2008; Milovanović i sar., 2012). Životinje se uvoze u pubertetu kada oplodnu sposobnost njihove sperme nije moguće utvrditi. Nakon procedura ispitivanja u karantinu, nerastovi ulaze u eksploataciju, pa se tek tada može proceniti njihova oplodna sposobnost. Potrebno je izvršiti najmanje 3 uzastopne kontrole sa razmakom od po 1,5 mesec (50 dana traje ciklus spermatogeneze), kako bi se mladi nerast mogao validno oceniti, odnosno uložiti reklamacija. Na osnovu izvršenih analiza i priložene dokumentacije moguće je izvršiti reklamaciju nerastova čija nativna sperma/razređeno seme ne zadovoljava tehnološke normative. Uvozniku se dostavljaju uniformisani CASA izveštaji na srpskom i engleskom jeziku kao i druge potrebne laboratorijske izveštaje (foto dokumentacija, film o pokretljivosti spermatozoida).

ZAKLJUČAK

Napredak kompjuterske tehnike i njeno uvođenje u andrologiju omogućava automatizam u radu sa semenom, analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu, isključenje subjektivnosti metode, veliku brzinu ispitivanja, visoku ponovljivost i analitičnost. Kompjuterska analiza pokretljivosti spermatozoida ocenjuje kinetiku spermatozoida na veoma sofisticiran način.

Protočnom citometrijom je moguće analizirati integritet membrane akrozoma i membrane spermatozoida, strukturu hromatina i status fosfolipidne ovojnice, kao i morfološko i funkcionalno stanje membrana organela i prisustvo odvojenih odeljaka (*»kompartmana«*).

Sistematska analiza semena sa primenom većeg broja metoda, dopunjena povremenim bakteriološkim pregledom, daje mogućnost pouzdane procene kvaliteta semena nerastova.

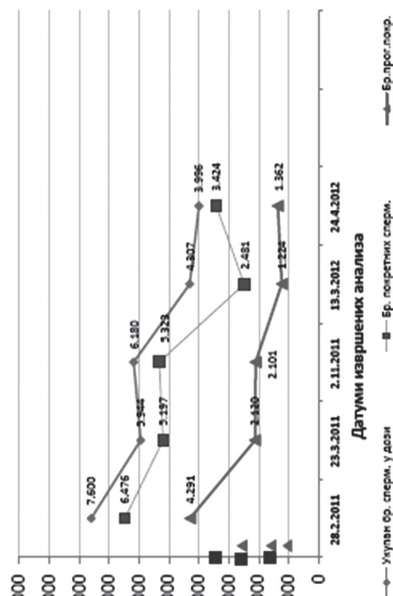
Jasno je da usvajanje, usavršavanje i standardizacija laboratorijskih metoda za kontrolu oplodne sposobnosti sperme treba da predstavljaju prioritet savremenih laboratorija za andrologiju. Proizvođači semena, bilo da proizvode seme za internu upotrebu ili za prodaju trećem licu, dužni su da obezbede seme sa tehnološki prihvatljivim i unapred definisanim parametrima kvaliteta i predvidljive (očekivane) oplodne sposobnosti.

			
НАУЧНИ ИНСТИТУТ ЗА ВЕТЕРИНАРСТВО "НОВИ САД" 21000 NOVI SAD, Руменачки пут 20 ☎ 021/4895-318, 4895-319; Факс: 021/518-544; Е-mail: niv@niv.rs.rs		Страна: 1 од 1	

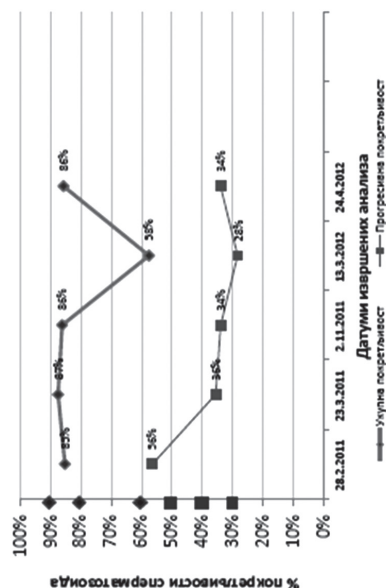
РЕЗУЛТАТИ ПРЕГЛЕДА СЕМЕНА НЕРАСТА И РЕЗУЛТАТИ ОСЕМЕЊАВАЊА

Фарма: "Напредак" А.Д. Место: Стара Пазова Адрес: Голубнички пут 66 Тетовир број нераста: 2591 DD Раса: DD Датум рођења: 27.05.2010. године

Грaфикон 1. Приказ квалитета семена на основу броја сперматозоида



Грaфикон 2. Приказ квалитета семена на основу покретљивости



Slika 2. Karton nerasta sa grafičkim prikazom pokretljivosti spermatozoida i koncentracijama spermatozoida u dozi (ukupan broj, broj pokretnih i broj progresivno pokretnih spermatozoida)

LITERATURA

1. Amann P.R.: Potential of a Seminal Sample Be Predicted Accurately? *J Androl*, 10, 2, 89-98, 1989.
2. Amann R.P., Hammerstedt R.H.: In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, 14, 397-406, 1993.
3. Amann R.P.: Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ Health Perspect*, 70, 149-58, 1986.
4. Boe-Hansen G.B., Christensen P., Vibjerg D.: Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology* 69 728-36, 2008.
5. Didion B.A.: Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. *Theriogenology*, 70, 1374-6, 2008.
6. Dahmani Y., Ausejo R., Malo C., Ubeda J.L.: New medium for bacterial contamination control of porcine ejaculated, *Reprod Dom Anim* 47, Suppl. 3, 90-123, 2012.
7. Evenson D.P., Larson K.L., Jost L.K.: Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques, *J Androl*, 23, 25-43, 2002.
8. Graham E.F., Schmehl K.L., Nelson D.S.: Problems with laboratory assays. In: *Proc 8th Tech Conf AI and Reprod. Milwaukee, Wis: NAAB*, 1980
9. Jovičin M., Nemeš Ž., Boroš I., Jakovljević G., Kašić M., Salma J., Glavonić L.: Steonost krava u zavisnosti od citološkog i mikrobiološkog kvaliteta zamrznutog semena bikova, *Zbornik naučnih radova PKB Agroekonomik*, 329-39, 1997.
10. Saacke R.G., Nadir S., Nebel R.L.: Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology*, 41, 45-50, 1994.
11. Evenson D.P., Jost L.K., Marshall D., Zinaman M.J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P., Claussen O.P., Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic, *Hum Reprod*, 14, 4, 1039-49, 1999.
12. Jovičin M., Milovanović A., Stančić B., Došen R., Barna T.: Uticaj aklimatizacije i životnog doba na kvalitet sperme uvoznih nerastova. *Arhiv veterinarske medicine*, 69-83, 2008,
13. Jovičin M., Stančić B., Đisalov D., Milanov D., Milovanović A., Došen R.: Značaj bakteriološke i citološko-morfološke analize sperme uvoznih i domaćih nerastova. U: *Zbornik radova i kratkih sadržaja 15. Savetovanje veterinarara Srbije, Zlatibor 09-13.09.2003*, 358, 2003.

14. Juonala T., Lintukangas S., Nurttila T., Andersson M.: Relationship Between Semen Quality and Fertility in 106 AI-Boars, *Reprod Dom Anim*, 33, 155-8, 1998,
15. Kopp C., Sironen A., Ija R., Taponen J., Vilkki J., Sukura A., Andersson M., Infertile Boars with Knobbed and Immotile Short-tail Sperm Defects in the Finnish Yorkshire Breed, *Reprod Dom Anim* 43, 690-95, 2008.
16. Martínez F.A.: Studies on the interaction of chromatin-unstable boar sperm with the female reproductive tract, doktorska teza, Univerzitet veterinarske medicine, Hanover, Nemačka, 2005.
17. Milovanović A., Barna T., Vasiljević T., Milanov D., Bošković N.: Uvoz nerastova- kontrola semena i mogućnost reklamacije U: 10 savetovanje zdravstvene zaštite, selekcije i reprodukcije svinja, Srebrno jezero, 79-87, 2012.
18. Quintero-Moreno A., Rigau T. & Rodriguez-Gil J.E.: Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology*, 61, 673-90, 2004.
19. Suwimonteerabutr J., Thuwanut P., Singlor J., Chatdarong K., Tummaruk P.: Effect of Collection Extender (Dicol®) on Cold-stored Boar Sperm Viability and Bacterial Contamination, *Thai J Vet Med, Suppl.* 41, 173-174, 2011.
20. Thundathil J., Meyer R., Palasz A.T., Barth A.D., Mapletoft R.J.: Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production, *Theriogenology*, 54, 921-34, 2000.
21. Thundathil J., Palasz A.T., Barth A.D., Mapletoft R.J.: The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets, *Anim Reprod Sci*, 65 181-92, 2001
22. Waberski D., Schapmann E., Henning H., Riesenbeck A., Brandt H.: Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI, *Theriogenology*, 75, 337-45, 2011.

Primljeno: 06.11.2012.

Odobreno: 08.05.2013.

Originalni naučni rad

UDK 664.41:637.51

SADRŽAJ NATRIJUMHLORIDA U PROIZVODIMA OD MESA^{1*}

**Nadežda Prica², Milica Živkov-Baloš, Željko Mihaljev,
Sandra Jakšić, Igor Stojanov**

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad, Republika Srbija

Kratak sadržaj

Kuhinjska so je prvi dodatak hrani čiji je konzervišući efekat poznat već jako dugo. Zastupljenost u svakodnevnoj ishrani doprinela je da kuhinjska so bude jedan od prvih proizvoda dizajniranih kao "funkcionalna hrana". Međutim, dokazano je da prekomerno unošenje soli, odnosno natrijuma, predstavlja jedan od čestih uzroka hipertenzije i utiče na pojavu različitih drugih oboljenja. Poznato je da natrijum-hlorid utiče na senzorska i mikrobiološka svojstva proizvoda od mesa, s jedne strane, ali i na zdravlje ljudi sa druge strane. Pošto važećim Pravilnikom (Sl.glasnik RS 31/2012) nije propisan sadržaj natrijum-hlorida u proizvodima od mesa kao parametar kvaliteta, cilj našeg rada bio je da se utvrdi količina natrijum-hlorida u različitim proizvodima od mesa na novosadskom tržištu. Ukupno je ispitano 260 uzoraka proizvoda od mesa, i to: oblikovano mleveno meso, vegeterijanski namazi, dimljeni proizvodi, fermentisane suve kobasice, fino usitnjene barene kobasice, konzerve od mesa u komadima i kuvane kobasice. Sadržaj natrijum-hlorida određen je volumetrijski. Najmanji prosečni sadržaj natrijum-hlorida utvrđen je u uzorcima oblikovanog mlevenog mesa i iznosio je 2,53%. U uzorcima vegeterijanskih namaza prosečan sadržaj natrijum-hlorida bio je 3,55%, u kuvanim kobasicama 2,95% a u konzervama od mesa u komadima i u dimljenim proizvodima prosečan sadržaj natrijum-hlorida bio je 3,44%. U fino usitnjenim barenim kobasicama sadržaj natrijum-hlorida bio je 3,06% a najveći sadržaj natrijum-hlorida izmeren je u fermentisanim suvim kobasicama i iznosio je 3,71%. Svetska zdravstvena organizacija preporučuje da dnevni unos soli za odrasle, zdrave ljude ne treba da bude veći od 5 - 6 g. Kako dobijeni rezultati ukazuju da je u pojedinim ispitivanim uzorcima izmerena količina natrijum-hlorida veoma

^{1*} Istraživanja su sprovedena po projektu TR 31084 finansiranom od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije

² E-mail: nadja@niv.ns.ac.rs

blizu gornje granice preporučene vrednosti, neophodna je dalja neprekidna i sistematska kontrola kako bi se dobili što realniji podaci o sadržaju natrijum-hlorida u proizvodima od mesa.

Ključne reči: natrijum-hlorid, proizvodi od mesa

SODIUM CHLORIDE CONTENT IN MEAT PRODUCTS

**Nadežda Prica, Milica Živkov-Baloš, Željko Mihaljev,
Sandra Jakšić, Igor Stojanov**

Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad, Republika Srbija

Abstract

Table salt is the first food additive and its preserving effects are well known since long time ago. Because of its role in everyday diet, table salt is one of the first products designated as "functional food". However, it was established that excessive salt intake, i.e. sodium intake, is frequently associated with hypertension and development of a range of other diseases. Sodium chloride affects sensory and microbiological properties of meat products; however, it affects the human health as well. Since the current Regulation (Official Gazette of the Republic of Serbia No. 31/2012) did not define the sodium chloride content of in meat products as a quality parameter, the aim of our study was to determine levels of sodium chloride in diverse meat products available at the market in Novi Sad. A total of 260 samples of meat products were examined, including: shaped ground (minced) meat, vegetarian spreads, smoked products, fermented dry sausages, finely minced boiled sausages, canned meat chop and cooked sausages. The content of sodium chloride was determined by using volumetric method. The lowest average sodium chloride content was established in samples of shaped ground meat, being 2.53%. Average level of sodium chloride in vegetarian spreads was 3.55%, in cooked sausages 2.95% and in canned meat chop and smoked products 3.44%. Sodium chloride content in boiled sausages was 3.06%, whereas highest value was established in fermented dry sausages, being 3.71%. According to the guidelines of the World Health Organization, daily salt intake for healthy adults should not exceed 5-6 g. Since the obtained results indicated that sodium chloride contents in some samples were close to the upper recommended limits, continuous and systematic monitoring is of paramount importance in a view of obtaining accurate and

reliable information on the content of sodium chloride in relevant meat products.

Key words: sodium-chloride, meat products

UVOD

Prerada hrane za široku upotrebu počela je u drugoj polovini devetnaestog veka. U isto vreme počinje i veća upotreba dodataka u izradi namirnica. Dodaci hrani su bili važni i interesantni u mnogim kulturama, bilo da su se koristili za konzervisanje, za poboljšanje izgleda, mirisa i ukusa, bilo kao pomoć u spravljanju novijih i različitih vrsta namirnica. Korišćenje dodataka u izradi hrane datira još iz praistorijskog vremena, kada su ljudi činili napore da dođu do soli kako bi učinili obroke ukusnijim i održivijim (Davidson, 2002). Kuhinjska so je prvi dodatak hrani i koristile su je sve civilizacije. Bez većih ograničenja koristi se u mnogim prehrambenim proizvodima i, sa izuzetkom mlevenog mesa, koristi se u izradi svih proizvoda od mesa ili samo kao kuhinjska so za soljenje, a najčešće uz dodatak natrijum nitrita kao nitritna so za salamurenje. Konzervišući efekat kuhinjske soli poznat je nekoliko milenijuma. Način delovanja natrijum-hlorida na mikroorganizme bio je predmet više različitih gledišta, ali danas se smatra, da antimikrobni efekat soli počiva na snižavanju aktivnosti vode. So, u proizvodima od mesa, poželjno utiče na senzorne i teksturalne karakteristike, povećanje sposobnosti vezivanja vode, odnosno hidraciju mesa, a smanjivanje aktivnosti vode u proizvodu ima i bakteriostatski efekat. Kuhinjska so se svrstava u GRAS supstance (znači potpuno bezbedne za ljudsku ishranu) i, kada se u izradi proizvoda od mesa koristi kuhinjska so koja je higijenski i zdravstveno ispravna i odgovara propisima uslovima kvaliteta, njeno korišćenje bi se moglo označiti kao bezbedno. Međutim kuhinjska so može negativno da utiče na pigmente mesa, pa meso dobija smeđu do tamno smeđu boju. U većim količinama, pri nižim pH vrednostima, deluje prooksidativno (Čavoški i sar., 1990).

Zastupljenost u svakodnevnoj ishrani doprinela je da kuhinjska so bude jedan od prvih proizvoda dizajniranih kao "funkcionalna hrana". Naime, još od 1920. godine, u Švajcarskoj se otpočelo sa jodiranjem kuhinjske soli u cilju prevencije i iskorenjivanja bolesti štitne žlezde kod ljudi. Takav vid prevencije prihvatile su skoro sve zemlje u svetu, propisujući različite količine dodatog joda, u zavisnosti od izraženosti njegovog deficita u zemljištu i hrani. (Trajković-Pavlović i sar., 2000). Obaveza jodiranja kuhinjske soli postoji i kod nas, količina joda u kuhinjskoj soli iznosi 12-18mg/kg (Pravilnik, 2005).

Sa druge strane, dokazano je da upravo prekomerno unošenje soli, odnosno natrijuma, jedan je od čestih uzroka hipertenzije, naročito kod natrijum-

senzitivnih osoba i povezan je sa mortalitetom i rizikom od kardiovaskularnih oboljenja, nezavisno od ostalih faktora rizika, uključujući i hipertenziju (Tuomilehto i sar., 2001).

Prekomerno unošenje natrijum-hlorida dovodi do: direktnog rizika od srčanih udara (Perry i Beevers, 1992), hipertrofije leve komore (Schmieder i Messerli, 2000), retencije natrijuma u ekstracelularnoj tečnosti, odnosno do retencije vode i kliničkih idiopatskih edema, naročito kod žena (MacGregor i de Wardener, 1997); povećanje tvrdoće odnosno, smanjenje elastičnosti zida krvnih sudova, naročito arterija, nezavisno od krvnog pritiska (Avolio i sar., 1986); proteinurije, u prvom redu do urinarne ekskrecije albumina, a time i do povećanog rizika za oboljenje srca i bubrega (Du Cailar i sar., 2002); veće mogućnosti infekcije izazvane *Helicobacter pylori* i rizika od nastanka raka želuca (Tsugane i sar., 2004); povećanja urinarne ekskrecije kalcijuma i rizika od stvaranja kamena u bubregu (Capuccio i sar., 2000), zatim rizika od smanjenja gustine kostiju, a shodno tome i do osteoporoze i kompresivnih fraktura kostiju, naročito kod žena u menopauzi (Devine i sar., 1995); pojačavanje astmatičnih napada (Mickleborough i sar., 2005) itd.

Unošenje kuhinjske soli uslovljeno je, ne samo fiziološkim potrebama (sportisti), nego i navikama, koje se stiču u ranom detinjstvu, kao i tradicijom u ishrani (podneblje, odnosno klimatski uslovi, priprema hrane, resursi stoke i sl.). Od ukupne dnevne količine kuhinjske soli, koja se u organizam unese putem hrane, oko 20% potiče iz proizvoda od mesa (Wirth, 1991).

Prema preporuci Svetske zdravstvene organizacije, dnevni unos soli odraslih, zdravih ljudi ne treba da je veći od 5 – 6 grama (WHO, 1990). Bez obzira na činjenicu što o kuhinjskoj soli govorimo kao o GRAS supstanci, njen dnevni unos je vrlo limitiran, tako da unošenje 50g dnevno nekog suhomesnatog proizvoda za veliku većinu ljudi predstavlja zdravstveni rizik.

Cilj našeg rada bio je da se utvrdi količina natrijum-hlorida u različitim proizvodima od mesa na novosadskom tržištu.

MATERIJAL I METODE

U okviru ovog ispitivanja, ukupno je ispitano 260 uzoraka proizvoda od mesa, od čega 85 uzoraka fino usitnjenih barenih kobasica, 22 uzorka oblikovanog mesa, 45 uzoraka konzervi od mesa u komadu, 16 uzoraka fermentisanih suvih kobasica, 17 uzoraka dimljenih proizvoda i 75 uzorka kuvanih kobasica. Sadržaj natrijum-hlorida odrađen je volumetrijski metodom SRPS ISO 1841-1/1999.

Rezultati ispitivanja su obrađeni statistički i prikazani tabelarno, kao sred-

nje vrednosti (X) sa standardnom devijacijom (s_d) i koeficijentom varijacije (C_v).

REZULTATI I DISKUSIJA

Primena soli ima kod proizvoda od mesa višestruki značaj (inhibicija mikroorganizama, sposobnost vezivanja vode, ukus proizvoda). Količina kuhinjske soli u proizvodima od mesa Pravilnikom o kvalitetu proizvoda od mesa nije definisana. Može se reći da je količina soli u proizvodima od mesa definisana preko organoleptičkih osobina – ukusa. Za proizvode od mesa Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS 31/2012) je propisao da im ukus mora biti svojstven. Proizvod od mesa koji sadrži malo soli može da bude bljutav, nedovoljno slan ili ako sadrži suviše soli može da bude preslan, izuzetno slan ili čak i gorak. U tom slučaju proizvod nema svojstven ukus i to je mana kvaliteta tog proizvoda.

Na osnovu eksperimentalnih podataka i pregleda podataka iz literature, vidi se da su količina i način dodavanja kuhinjske soli specifični za svaku grupu proizvoda od mesa.

U tabeli 1, prikazan je sadržaj natrijum – hlorida u proizvodima od mesa, izražen u procentima. Najmanji prosečan sadržaj natrijum-hlorida, 2,53 % utvrđen je u uzorcima oblikovanog mlevenog mesa, nešto veći, 2,95 % u kuvanim kobasicama. U fino usitnjenim barenim kobasicama prosečan sadržaj natrijum – hlorida bio je 3,06 %, dok je u konzervama od mesa u komadu i dimljenim proizvodima izmereno 3,44 % natrijum – hlorida. Najveći prosečan sadržaj natrijum – hlorida sadržale su fermentisane suve kobasice, 3,77 %.

U proizvodnji barenih kobasica (fino usitnjene barene kobasice, grubo usitnjene barene kobasice, barene kobasice sa komadima mesa), koriste se kuhinjska so, nitriti, nitrati, polifosfati i citrati. Kuhinjska so se dodaje u količini od 1,8 % do 2,2 % ("normalno soljenje") (Vuković, 1998).

Ispitivanje viršli (fino usitnjene barene kobasice) sa novosadskog tržišta pokazuje da se sadržaj natrijum – hlorida kod pet različitih proizvođača kretao od 1,30 % do 2,55 % (Prica, 2008), a u fino usitnjenim barenim kobasicama sa tržišta Srbije prosečan sadržaj natrijum – hlorida iznosio je 1,66% (Vranić i sar., 2009). Naši rezultati pokazuju znatno veću količinu natrijum – hlorida u fino usitnjenim barenim kobasicama, 3,06%.

U proizvode od usitnjenog oblikovanog mesa dodaje se 1,35 do 2,04% kuhinjske soli neposredno pri njihovom spravljanju (Stamenković, 2004), što je nešto manje u odnosu na vrednosti utvrđene našim ispitivanjima (2,53 %).

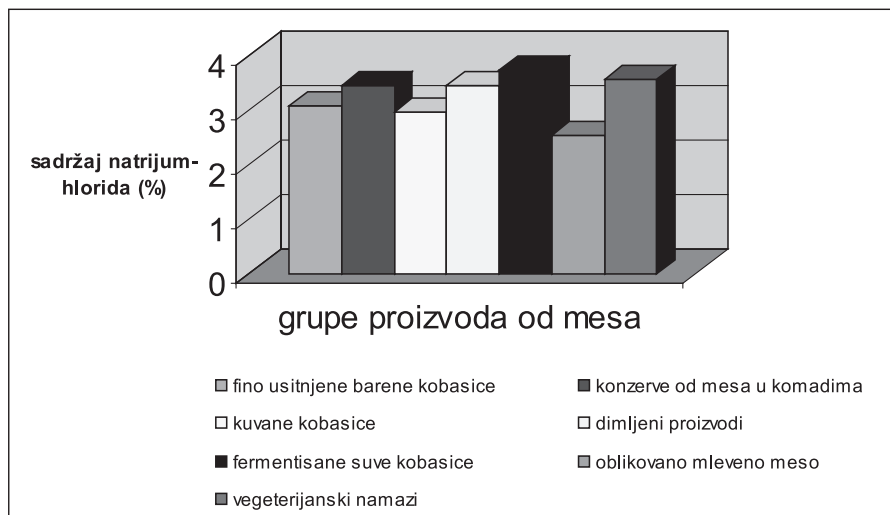
Pri salamurenju mesa, za dimljene suvomesnate proizvode kuhinjska so se

dodaje u količini do 3,76% (Stamenković, 2004), što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima (Tabela 1).

Kuhinjska so se dodaje u kuvane kobasice - od 2,15% do 2,34 % (Stamenković, 2004), što je manje u odnosu na vrednosti utvrđene u ovim ispitivanjima (2,95 %). Prosečan sadržaj natrijum – hlorida u fermentisanim suvim kobasicama bio je 3,71 %, što predstavlja znatno veću količinu natrijum – hlorida od količine koje se, prema navodima Stamenkovića (2004), dodaje pri spravljanju nadeva u sušene (trajne) kobasice, a iznosi od 6 % do 2,8 % . U konzervama od mesa u komadima, izmerena prosečna vrednost natrijum – hlorida bila je 3,44 %, što je znatno veća količina natrijum – hlorida od izmerenih prosečnih vrednosti (1,67 %), dobijenih u ispitivanjima Vranić i sar. (2009).

Tabela 1. Sadržaj natrijum – hlorida u različitim grupama proizvoda od mesa

Vrsta Proizvoda	Sadržaj natrijum - hlorida (%)	Mere varijacije			
		SD	SE	Cv %	Iv
Fino usitnjene barene kobasice	3,06	0,86	0,09	28,10	1,61 – 4,14
Konzerve od mesa u komadima	3,44	0,59	0,09	17,15	2,35 – 4,10
Kuvane kobasice	2,95	1,13	0,13	38,31	0,92 – 4,98
Dimljeni proizvodi	3,44	0,56	0,14	16,28	2,44 – 3,94
Fermentisane suve kobasice	3,71	0,67	0,17	18,06	2,61 – 5,42
Oblikovano mleveno meso	2,53	1,40	0,30	55,34	0,12 – 3,92
Vegeterijanski namazi	3,55	0,91	0,34	25,63	1,49 – 3,92



Grafik 1. Prikaz sadržaja natrijum – hlorida u različitim grupama proizvoda od mesa

ZAKLJUČAK

Sadržaj natrijum-hlorida je gotovo u svim grupama proizvoda, izuzev dimljenih proizvoda, bio veći u odnosu na podatke o sadržaju natrijum-hlorida iz literature.

Najmanji prosečan sadržaj natrijum-hlorida, 2,53 % utvrđen je u uzorcima oblikovanog mlevenog mesa, nešto veći, 2,95 % u kuvanim kobasicama. U fino usitnjenim barenim kobasicama prosečan sadržaj natrijum – hlorida bio je 3,06 %, dok je u konzervama od mesa u komadu i dimljenim proizvodima izmereno 3,44 % natrijum – hlorida. Najveći prosečan sadržaj natrijum – hlorida izmeren je u fermentisanim suvim kobasicama, 3,77 %.

Kako dobijeni rezultati ukazuju da je u pojedinim ispitivanim uzorcima izmerena količina natrijum-hlorida veoma blizu gornje granice preporučene vrednosti, neophodna je dalja neprekidna i sistematska kontrola kako bi se dobili što realniji podaci o sadržaju natrijum-hlorida u proizvodima od mesa, i na osnovu toga donele preporuke o maksimalno dozvoljenom sadržaju ovog aditiva u proizvodima od mesa.

LITERATURA

1. Avolio, A.P., Clyde, K.M., Beard, T.C., Cooke, H.M., Ho, K.K., O'Rourke, M.F.: Improved arterial distensibility in normotensive subjects on a low salt diet. *Arteriosclerosis*, 6, 2, 166-9, 1986.
2. Cappuccio, F.P., Kalaitzidis, R., Duneclift, S., Eastwood, J.B.: Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism. *J Nephrol*, 13, 3, 169-77, 2000.
3. Čavoški, D., Radovanović, R., Perunović, M.: Kvalitet polutrajnih suvome-snatih proizvoda i barenih kobasica poreklom sa beogradskog tržišta - sa aspekta sadržaja NaCl i nitrita. *Tehnologija mesa*, 3, 105-109, 1990.
4. Davidson I sar.: Human nutrition and dietetics seventh ed, Churchill Livingstone, 1979.
5. Desmond, E.: Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science*, 74, 1, 188, 2006.
6. Devine, A., Criddle, R.A., Dick, I.M., Kerr, D.A., Prince, R.L.: A longitudinal study of the effect of sodium and calcium intakes on regional bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 62, 4, 740-5, 1995.
7. Du Cailar, G., Ribstein, J., Mimran, A.: Dietary sodium and target organ damage in essential hypertension. *Am J Hypertens*, 15, 3, 222-9, 2002.
8. Izveštaj Svetske Zdravstvene Organizacije (WHO) iz 1990.
9. Macgregor, G.A., de Wardener, H.E.: Idiopathic edema. u: Schrier, R.W., Gottschalk C.W. (ur.) *Diseases of the Kidney*, Boston, MA: Little Brown and Company, 2343-2352, 1997.
10. Mickleborough, T.D., Lindley, M.R., Ray, S.: Dietary salt, airway inflammation, and diffusion capacity in exercise-induced asthma. *Med Sci Sports Exerc*, 37, 6, 904-14, 2005.
11. Prca N.: Uporedna analiza hemijskih parametara kvaliteta viršli različitih proizvođača na novosadskom tržištu, Specijalistički rad, Fakultet veterinarske medicine Beograd, 2008.
12. Perry, I.J., Beevers, D.G.: Salt intake and stroke: a possible direct effect. *J Hum Hypertens*, 6, 1, 23-5, 1992.
13. Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa: Sl. glasnik RS br. 31/2012.
14. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za so za ljudsku ishranu i proizvodnju namirnica: Sl. list SCG, br. 31/2005.
15. Stamenković T.: Upotreba kuhinjske soli u proizvodima od mesa *Tehnologija mesa*, Beograd, 2004.

16. SRPS ISO 1841-1/1999: Meso i proizvodi od mesa, Određivanje sadržaja hlorida po Volhard-u.
17. Schneider R.E., Messerli F.H.: Hypertension and the heart. *Journal of Human Hypertension*, 14, 597-604, 2000
18. Tsugane, S., Sasazuki, S., Kobayashi, M., Sasaki, S.: Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women. *Br J Cancer*, 90, 1, 128-34, 2004.
19. Tuomilehto, J., Jousilahti, P., Rastenyte, D., Moltchanov, V., Tanskanen, A., Pietinen, P., Nissinen, A.: Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: A prospective study. *Lancet*, 357, 9259, 848-51, 2001.
20. Trajković-Pavlović, Lj.: The importance of the legislation for the iodine prophylaxis in Yugoslavia. u: A National Conference on IDD at the end of II and at the beginning of the III millenium., Belgrade, Book of Proceedings 16-22, 2000.
21. Vuković I.: Osnove tehnologije mesa, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 1998.
22. Vranić D., Saičić S., Lilić S., Trbovčić D., Janković S.: Studija o sadržaj u natrijum-hlorida i natrijuma u nekim proizvodima od mesa sa tržišta Srbije, *Tehnologija mesa* 50, 3-4, 249-255, 2009.
23. Wirth, F.: Restricting and dispensing with curing agents in meat products. *Fleischwirtsch*, 71, 9, 1051-1054, 1991.

Napomena: Rad je saopšten na MEĐUNARODNOM 56. SAVETOVANJU INDUSTRIJE MESA - MESO I PROIZVODI OD MESA - BEZBEDNOST, KULTURA, RAZVOJ, KVALITET ŽIVOTA , 12-15. jun 2011. Godine, Tara, hotel "Omorika"

Primljeno: 15.11.2012.

Odobreno: 08.05.2013.

Stručni rad

UDK 311.213.3::616.993(497.113Temerin)

INFORMISANOST GRAĐANA OPŠTINE TEMERIN O EHINOKOKOZI KAO AKTUELNOM PROBLEMU

Jelena Babić¹, Nikolina Novakov²

¹ Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

² Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Departman za
veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija

Kratak sadržaj

Ehinokokoza je zoonozna parazitska bolest rasprostranjena po celom svetu. Uzročnik bolesti je pantljičara *Echinococcus spp.*. Definitivni domaćini su životinje iz familije *Canidae* i retko *Felidae*, a prelazni domaćini su ljudi kao i domaći i divlji papkari. U Srbiji je ehinokokoza naročito raširena zahvaljujući nedovoljnoj kulturi uzgajivača svinja i nepostojanju odgovarajućih stočnih groblja i zoohigijenske službe. Svinje su jedna od najbrojnih prelaznih domaćina ehinokokoze u Temerinu, te se ljudi sa ehinokokozom najčešće sreću prilikom svinjokolja (pluća i jetra zahvaćena metacestodnim stadijumom ehinokokoze). Definitivni domaćin se zarazi konzumacijom promenjenih organa, a prelazni domaćin peroralnim unosom jaja koja definitivni domaćin izbacuje izmetom. Prilikom pregleda svinjskog mesa na trihinelozu u veterinarskoj ambulanti “BMV”, stranke su navodile nalaženje cističnih promena na jetri i plućima, koja su najčešće davani psima. Takođe na jednom gazdinstvu je dijagnostikovana masovna ehinokokoza svinja prilikom klanja. Pretpostavka je bila da su građani slabo upoznati sa ehinokokozom i mogućim posledicama. Cilj ovog istraživanja je da se dobije uvid u informisanost građana opštine Temerin o ehinokokozi i da se odgajivačima svinja ukaže da držanje pasa i svinja u kohabitaciji omogućava direktan način prenošenja sa pravog domaćina na prelaznog. Podaci su prikupljeni pomoću unapred formulisanog upitnika. Metodom slučajnog izbora, upitnike je popunilo 100 građana, a dobijeni rezultati su statistički obrađeni. Samo 21% ispitanika smatra da zna šta je ehinokokoza, a od njih tek svaki treći pravilno postupa sa cističnim, ehinokoknim organima. 44 ispitanika Opštine Temerin su se susrela sa takvim organima prilikom svinjokolja, od kojih je 14 pravilno postupilo, a samo 22,73% zna da se čovek

¹ E-mail: vet.bmv@hotmail.com

može zaraziti preko psa. Od ukupnog broja ispitanih, njih 50 ima psa, a samo njih 13 redovno vrši dehelmintizaciju. Dobijeni rezultati na osnovu odgovara ispitanika ukazuju na slabu informisanost građana opštine Temerin i na potrebu edukacije istih.

Ključne reči: ehinokokoza, svinje, pas, Temerin, edukacija

ACQUAINTANCE OF TEMERIN CITIZENS WITH ECHINOCOCOSIS AS THE CURRENT ISSUE

Jelena Babić¹, Nikolina Novakov²

¹ Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad

Faculty of agriculture, Department for veterinary medicine, Novi Sad

Abstract

Echinococcosis is a zoonotic parasitic disease spread worldwide. The causative agent of the disease is a tapeworm *Echinococcus* spp.. Primary hosts are animals from the family Canidae and rarely Felidae and intermediate hosts are humans as well as domestic and wild ungulates. In Serbia, incidence of echinococcosis is a particularly high, which is due to poor education of pig breeders, inadequate production practice and lack of appropriate zoohygienic conditions and animal waste management. Pigs are among the major intermediate hosts of *Echinococcus* in Temerin, and people are most frequently affected during the periods of pig slaughter (lungs and liver are affected by the metacestode stage of *Echinococcus*). The primary host becomes infected by consuming infested organs, whilst an intermediate host becomes infected by oral intake of eggs excreted by the primary host in the feces.

During pork examination for trichinosis at the veterinary clinic "BMV", the customers reported cystic changes in the liver and lungs. Moreover, massive echinococcosis was diagnosed on the farm in pigs at slaughter. Very often, when noticing such changes in the organs, consumers tend to throw them away to dogs. Most likely, the citizens are poorly informed about the echinococcosis and its potential consequences. The aim of this research is to establish how much the citizens of Temerin municipality are informed about echinococcosis and to properly inform pig breeders that keeping dogs and pigs in cohabitation may enable direct transmission of parasites from definitive to intermediate hosts. Data were collected by using pre-formulated questionnaire. The questionnaire was completed by 100 ran-

¹ E-mail: vet.bmv@hotmail.com

domly selected people, and the results were statistically analyzed. Only 21% of respondents consider that they are acquainted with echinococcosis, and among them, every third person properly manages cystic organs suspect for echinococcosis. Forty-four respondents in Temerin municipality had an opportunity to see affected organs during pig slaughter, but only 14 of them acted correctly, while only 22.73% knew that a man could get infected from dogs. Of the entire sample population, 50 respondents had a dog, and only 13 of them regularly apply helminth eradication measures.

The results obtained according to respondents' answers indicated very sparse knowledge on this issue among Temerin citizens, strongly suggesting the need for an appropriate education strategy.

Keywords: echinococcosis, pigs, dogs, Temerin, education

UVOD

Ehinokokoza, zoonozna parazitska bolest, predstavlja jedan od najozbiljnijih zdravstvenih problema globalnih razmera sa kojom se već decenijama WHO, FAO, OIE i EEC manje ili više uspešno bore (Pavlović i sar., 2011). Svake godine, broj obolelih životinja i ljudi, raste geometrijskom progresijom, kako u zemljama trećeg sveta sa najnižim socio-ekonomskim standardom i ekstenzivnim načinom stočarenja, tako i u razvijenim zemljama zapada. Među najugroženijim područjima su Mediteran, subsaharske oblasti i jug Afrike, Azija uključujući Kinu i Rusiju, Južna i Severna Amerika, ali i Zapadna i Južnoistočna Evropa (Roming i sar., 2006; Pavlović i sar., 2012). Ehinokokoza je u Srbiji naročito raširena zahvaljujući nedovoljnoj kulturi uzgajivača svinja i nepostojanju odgovarajućih stočnih groblja i zoohigijenske službe. Broj registrovanih, obolelih ljudi od ehinokoze u Vojvodini je u porastu. Naime, 1991. godine taj broj je bio 9, dok taj broj 2011. godine iznosi 15 (Bačić, 2011).

Uzročnik ove "re-emerging" bolesti je pantljičara *Echinococcus spp.*. Klinički se prepoznaju tri morfološke forme ehinokokokoze: cistična ehinokokokoza (CE) prouzrokovana sa *E. granulosus*, alveolarna ehinokokokoza prouzrokovana sa *E. multilocularis* i policistična ehinokokokoza prouzrokovana sa *E. vogeli* ili *E. oligarthrus*.

Epidemiološki, CE kod ljudi se uglavnom javlja u siromašnim zajednicama koje unutar gazdinstva drže domaće životinje zajedno sa psima. Pravi domaćin se zarazi konzumacijom zaraženih jetri i pluća, a prelazni domaćin peroralnim unosom jaja koja pravi domaćin izbacuje izmetom. U seoskim gazdinstvima najčešće su rezultat "namernog" hranjenja pasa zaraženim organima prilikom svinjokolja. CE ima niz značajnih ekonomskih efekata koji se najčešće ogledaju u odbacivanju jestivih iznutrica životinja (Torgerson, 2003).

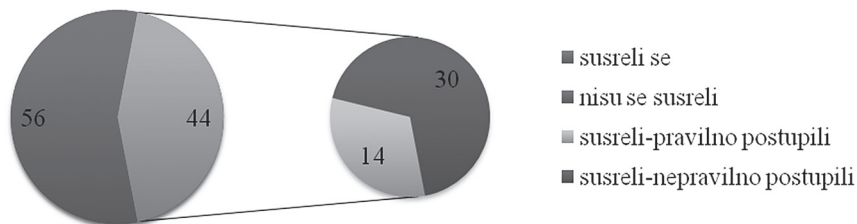
Cilj ovog istraživanja je da se dobije uvid u informisanost građana opštine Temerin o ehinokokozi i da se odgajivačima svinja ukaže da držanje pasa i svinja u kohabitaciji omogućava direktan način prenošenja sa pravog domaćina na prelaznog.

MATERIJAL I METODE RADA

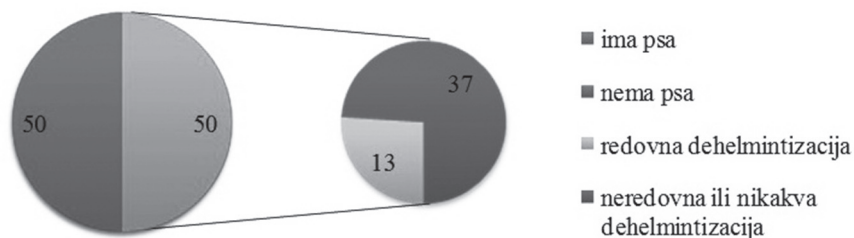
Podaci su prikupljeni pomoću unapred formulisanog upitnika. Upitnik se sastojao iz 8 pitanja: 1. Da li ste se prilikom klanja susretali sa belim mehurovima na crnoj i beloj džigerici (jetri i plućima)? 2. Da li znate šta je to? 3. Šta radite sa takvom belom i crnom džigericom? 4. Zna li šta je ehinokokoza? 5. Šta mislite da li se čovek može zaraziti ehinokokozom? 6. Kako se čovek može zaraziti ehinokokozom? 7. Da li imate psa? 8. Ukoliko imate psa, da li vršite dehelmintizaciju (čišćenje od glista) i koliko često?. Sva pitanja upitnika su imala ponuđene odgovore: pet dihotomnih pitanja i tri pitanja višestrukog izbora. Anketirano je ukupno 100 građana izabranih metodom slučajnog uzorka. Urađena je kvalitativna obrada dobijenih rezultata korišćenjem tehnike redukovanja podataka, koja ima za cilj da smanji veliku količinu dobijenih podataka tako da ostaju samo relevantni podaci. Vršena je i dijagnostika ehinokokoze po pozivu građana vizuelnim pregledom iznutrica prilikom klanja, a potom i potvrda svetlosnom mikroskopijom.

REZULTATI

Samo 21% ispitanika smatra da zna šta je ehinokokoza, a od njih tek svaki treći pravilno postupa sa cističnim organima. Od ispitanika koji su se susreli sa ehinokoknim organima samo 22,73% zna da se čovek može zaraziti preko psa. Radi preglednijeg i jasnijeg prikaza statistički obrađeni rezultati su prikazani u grafikonu 1. i 2.



Grafikon 1.- Prikaz broja ispitanika koji su se susreli sa ehinokokozom, kao i koliko njih je pravilno postupilo

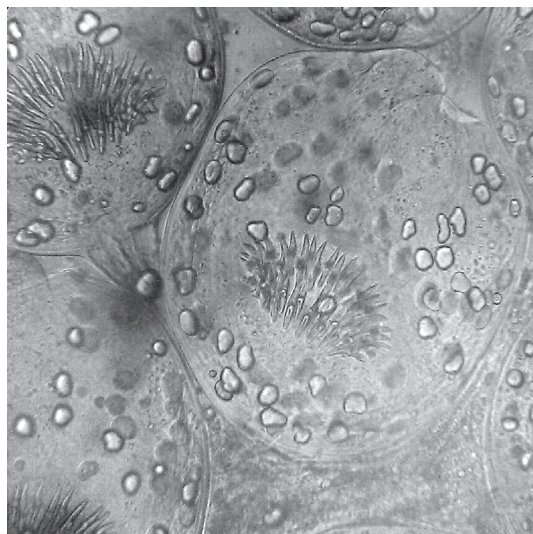


Grafikon 2. – Broj ispitanika koji imaju psa, kao koliko njih vrši redovno dehelmintizaciju

Vizuelnim pregledom iznutrica prilikom klanja konstatovana je ehinokoza gde se na jetri mogao uočiti veliki cisti (Slika 1), a potom je i dijagnoza potvrđena svetlosnom mikroskopijom pregledom hidatidnog peska gde su se mogli uočiti protoskoleksi *E. granulosus* (Slika 2).



Slika 1. Svinjska jetra sa velikim brojem hidatidnih cisti



Slika 2. Protoskoleksi izolovani iz hidatidne ciste svinje (uveličanje, x100)

DISKUSIJA

Opšti principi za kontrolu CE su uspostavljeni 1986.godine i sastoje iz 4 faze, a kao prva faza navodi se priprema programa za uspostavljanje kontrole, sistem za nadzor i obuku osoblja (Larrieu i Zanini, 2012). S tim u vezi, prilikom terenskog dela istraživanja, ispitanici su nakon popunjenog upitnika pristupili procesu edukacije. Osim te terenske obuke, radjena je i edukacija učenika Osnovne škole “Petar Kočić”, a na sastanku sa čelnicima Opštine Temerin dobijeno obećanje o podršci za nastavak edukacije građana Opštine Temerin.

Austrijska istraživanja ukazuju da je kod 92% ispitanih autohtonih Austrijanaca i kod 33% ispitanika sa prostora bivše Jugoslavije sa ehinokoknim cistama dijagnostikovana *Echinococcus canadensis* G7, svinja soj. Neočekivano veliki broj inficiranih pacijenata sa *E. canadensis* G7 kao i prosečna starost pacijenata imigranata od 23 godine ukazuje na važnost *E. canadensis* G7 kao uzročnika cistične ehinokokoze kod ljudi na području Centralne Evrope i upućuje na to da bi ova nova vrsta trebala biti uključena u buduće programe kontrole ehinokokoze (Schneider i sar., 2010).

Istraživanja sprovedena u Austriji na 104 osobe obbolele od ehinokoze identifikuju *E. canadensis* G7 kao glavni uzročnik cistične ehinokokoze u austrijskoj populaciji. Dvadeset četiri procenta pacijenata su bila austrijskog porekla, 35% turskog, 26% potiče sa prostora bivše Jugoslavije, a 15% iz raznih drugih regiona. Smatra se da su u bivšoj Jugoslaviji, rat i raspad drža-

ve (1991-1999) možda pogoršali veterinarske kontrole i higijenske uslove, te uticali na ovakvu epidemiološku situaciju. Ove promene mogu objasniti i relativno mlad prosek starosti ispitanika sa područja bivše Jugoslavije inficiranih svinjskim sojem *E. canadensis* G7 (prosečna starost 23 godina), dok je za *E. granulosus* srednja starost 42 godine na istom geografskom regionu.

Prilikom klanja 684 svinje, u Litvaniji je vršen pregled jetri, gde je otkriven značajno veći broj infekcija sa *Echinococcus granulosus* kod svinja iz porodičnih gazdinstava u poređenju sa onima iz industrijskih farmi. Pored toga, u 0,5 % svinja iz porodičnih farmi dijagnostikovao je *E. multilocularis* pomoću PCR. Uporedo sa tim, ispitano su bila i 34 seoska psa. U fecesu 26 pasa su dajagnostikovana jaja *Taenia* spp. (Bruzinskaite i sar., 2009).

ZAKLJUČAK

Na osnovu analize podataka dobijenih anketom o poznavanju ehinokokoze, njenom širenju, patološkim promenama na jetri i plućima zaklanih svinja utvrđeno je da je čak 79% ispitanika neupućeno, a samo 22.73% ispitanika koji su se susreli sa ehinokoknim cistama zna kako se čovek može zaraziti ehinokokozom. Ovi podaci ukazuju na važnost sprovođenja kontinuirane edukacije farmera i ljudi sa ciljem kontrole ovog oboljenja.

Na teritoriji Opštine Temerin bi trebalo početi ozbiljno evidentiranje raširenosti ehinokokoze na liniji klanja, kao i ehinokokoze pasa. Neophodno je sprovesti redovnu dehelmintizaciju pasa, naročito onih koji su u kontaktu sa domaćim životinjama i ljudima kao i adekvatno uklanjanja animalnog otpada sa ciljem da se spreči cirkulacija infektivnog materijala.

LITERATURA

1. Bačić M.: Epidemiološke karakteristike zoonoza u Srednjobanatskom okrugu u periodu od 1991-2010. godine, Zrenjanin, Zavod za javno zdravlje 2011.
2. Benner C., Carabin H., Sánchez-Serrano L. P., Budke C. M., Carmena D.: Analysis of the economic impact of cystic echinococcosis in Spain. *Bulletin of the World Health Organization*, 88, 49-57, 2010.
3. Bruzinskaite R., Sarkūnas M., Torgerson P.R., Mathis A., Deplazes P.: Echinococcosis in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. *Vet Parasitol.*, 160, 3-4, 237-241, 2009.
4. Craig .P ., McManus D. P., Lightowers M. W., Chabalgoity J. A., Garcia H. H., Gavidia C. M., Gilman R. H., Gonzalez A. E., Lorca M., Naquira C.,

- Nieto A., Schantz P. M.: Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infectious diseases*, 7, 6, 385-394, 2007.
5. Eckert J., Gemmell M. A., Meslin F. X., Pawłowski Z. S.: WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties) and World Health Organization, 2001.
 6. Ivanović S., Pavlović I.: Raširenost ehinokokoze kod svinja u ekstenzivnom držanju na području srednje-banatskog okruga [Srbija, Jugoslavija], *Tehnologija mesa*, 40(6), 302-303, 1999.
 7. Larrieu E., Zanini F.: Critical analysis of cystic echinococcosis control programs and praziquantel use in South America, 1974–2010. *Rev Panam Salud Publica.*, 31(1), 81–7, 2012.
 8. McManus D. P., Gray D. J., Zhang W., Yang Y.: Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis, *BMJ*, 344:e3866, 2012.
 9. Pavlović I., Hadžić I., Žugić G., Anđelić-Buzadžić G., Vaić D., Jovčevski S.: Hidatidoza aktuelan problem stočarske proizvodnje. *Zbornik naučnih radova Instituta PKB Agroekonomik*. 17, 3-4, 133-139, 2011.
 10. Pavlović I., Kulišić Z., Đurđević S., Mišić Z., Momčilović J., Krstić D.: Uloga pasa u kontaminaciji urbane sredine uzročnicima parazitskih zoonoza. *Veterinarski glasnik*, 60, 5-6, 377-383, 2006.
 11. Schneider R., Gollackner B., Schindl M., Tucek G., Auer H.: Echinococcus canadensis G7 (Pig Strain): An Underestimated Cause of Cystic Echinococcosis in Austria. *Am J Trop Med Hyg.*, 82(5), 871–874, 2010.
 12. Torgerson P. R.: Economic effects of echinococcosis. *Acta Tropica* 85, 113-118, 2003.
 13. <http://popispoljoprivrede.stat.rs/>

Primljeno: 15.04.2013.
Odobreno: 08.05.2013.

Stručni rad

UDK 616.995.1:636.4(497.15Republika Srpska)

EPIZOOTIOLOŠKE KARAKTERISTIKE TRIHINELOZE DOMAĆIH SVINJA NA PODRUČJU REPUBLIKE SRPSKE

Darko Despotović^{1*}, Tamara Ilić², Dragiša Trailović³, Sanda Dimitrijević²

¹ Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike
Srpske, Resor za veterinarstvo, Banja Luka, Republika Srpska, BiH

² Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu,
Katedra za parazitske bolesti, Beograd, Srbija

³ Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Katedra
za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači, Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

Trihinelozu je parazitsko oboljenje različitih vrsta divljih, domaćih životinja i ljudi, prouzrokovano nematodama iz roda *Trichinella*. Put prenosa bolesti je konzumacija inficiranog mesa, zbog čega trihinelozu predstavlja značajan zdravstveni i ekonomski problem. U Republici Srpskoj najčešći izvor infekcije ljudi je meso domaće svinje, a u poslednje vreme sve veći broj epidemija je, kao i u svetu, uzrokovan mesom divljih životinja. Tokom poslednje decenije 20. veka zabeležene su brojne epidemije ljudi sa velikim brojem obolelih. U periodu od 2001. do 2010. godine prijavljeno je 1256 slučajeva trihineloze životinja, od čega 1166 slučajeva trihineloze domaćih svinja. Na teritoriji opštine Bijeljina prijavljeno je 656 slučajeva, odnosno 56,26% od ukupnog broja infekcija domaćih svinja u Republici Srpskoj. Najnovija saznanja o rasprostranjenosti različitih vrsta iz roda *Trichinella* kod divljih i domaćih životinja Evrope ukazuju da će i pored preduzimanja preventivnih mera, kao što su odgovarajuće držanje životinja i veterinarska kontrola mesa nakon klanja, ovo oboljenje još dugo predstavljati značajan zdravstveni problem na ovom području.

Ključne reči: trihinelozu, svinja, epizootiologija, Republika Srpska, BiH

^{1*} E – mail: darkod@blic.net

EPIZOOTIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TRICHINELLOSIS OF DOMESTIC PIGS IN THE REPUBLIC OF SRPSKA

Darko Despotović¹, Tamara Ilić², Dragiša Trailović³, Sanda Dimitrijević²

¹ Republic of Srpska Government, Ministry of Agriculture, Forestry
and Water Management, Department of Veterinary Service,
Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Hercegovina

² Faculty of veterinary medicine University of Belgrade,
Department of parasitic diseases, Belgrade, Serbia

³ Faculty of veterinary medicine University of Belgrade, Department of diseases
of ungulates, carnivores, poultry and wild animals, Belgrade, Serbia

Abstract

Trichinellosis is parasitic disease affecting wildlife, domestic animals and humans, caused by the nematode of the genus *Trichinella*. Primary infection route is consumption of infected meat, thus trichinellosis represents a considerable health and economic problem. In the Republic of Srpska, the most common source of human infection is the meat of domestic pigs. Since recently, an increasing number of trichinellosis outbreaks have been attributed to consumption of meat of wild animals, which corresponds with the situation in other countries. During the last decade of the 20th century, numerous outbreaks involving large number of infected people have been reported. In the period 2001-2010, 1256 cases of animal trichinellosis were reported, 1166 of which were identified in domestic swine. In the municipality of Bijeljina, 656 cases were reported, which makes 56.26% of the total number of domestic pig infections recorded in the Republic of Srpska. The latest findings about the incidence of various *Trichinella* species in wild and domestic animals in Europe indicate that, regardless of application of preventive measures such as proper animal management and veterinary control of meat after slaughter, this disease remains the major health problem in this area.

Key words: trichinellosis, pigs, epizootiology, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

UVOD

Trihinelozu je parazitsko oboljenje koje prouzrokuju nematode iz roda *Trichinella*. Do sada je otkriveno osam imenovanih diferenciranih genotipskih vrsta (*T. spiralis* - T1, *T. nativa* - T2, *T. britovi* - T3, *T. pseudospiralis* - T4, *T. murrelli* - T5, *T. nelsoni* - T7, *T. papuae* - T10, *T. zimbabwensis* - T11) i četiri još neimenovana genotipa T6, T8, T9 i T12 (Dupouy-Camet i Murrell, 2007). Prema sposobnosti formiranja kapsule postoje dva klastera genotipova i evolutivnih pravaca trihinele: kapsulirajuće i nekapsulirajuće (Pozio i sar., 2009). Dve najčešće utvrđene vrste kod domaćih i divljih životinja u Evropi su *T. spiralis* i *T. britovi*, čije larve stvaraju kapsulu (Pozio i sar., 2007b). U posljednje vreme česte su prijave i vrste *T. pseudospiralis* (Beck i sar., 2007b; Merialdi i sar., 2011), čija larva u mišićima domaćina ne stvara kapsulu. Sve vrste i genotipovi vrsta iz roda *Trichinella* mogu inficirati sisare, dok neke vrste imaju veću specifičnu patogenost za reptile - *T. zimbabwensis* i *T. papuae* (Pozio i sar., 2007a) ili za ptice - *T. pseudospiralis* (Pozio i sar., 1999; Pozio, 2005).

Najčešći izvor infekcije ljudi u svetu je meso domaće svinje, ali u posljednje vreme sve veći broj epidemija je uzrokovan mesom konja i divljih životinja. Pošto se prenosi hranom, osim zdravstvenog trihinelozu predstavlja i ekonomski problem (Dimitrijević i Ilić, 2011). Prijavljena je u mnogim državama Južne i Severne Amerike, Azije, Afrike i Evrope. U zemljama istočne Evrope, naročito u Bugarskoj, Rumuniji, Srbiji, Hrvatskoj i Republici Srpskoj, odnosno u Bosni i Hercegovini, trihinelozu je enzootija i značajna zoonoza (Pozio, 2007; Despotović, 2012).

Poslednju deceniju dvadesetog veka u Republici Srpskoj i BiH, kao i u Hrvatskoj i Srbiji, ratna dešavanja i promene ekonomskog uređenja države su porušila uspostavljene sisteme kontrole trihineloze u inspekcijskom veterinarskom nadzoru svinjskog mesa, pa je došlo do pojave veće incidencije trihineloze kod domaćih svinja i ljudi. Ova pojava je zabeležena i u drugim bivšim socijalističkim državama istočne Evrope, gde su prelaskom na kapitalistički sistem privrede, propale brojne velike državne i zadrugarske farme, nakon čega se pojavila potreba za držanjem svinja na manjim farmama i u seoskim domaćinstvima (Čuperlović i Đorđević, 2003). Zbog mogućnosti kontakta sa sinantropnim glodarima (pacovi i miševi), ovako uzgajane svinje predstavljaju najveći faktor rizika za infekciju ljudi trihinelom (Stefanović i sar., 1968; Dimitrijević i sar., 1996).

Na prostoru Republike Srpske, iz godine u godinu, registruje se trihinelozu kod domaćih svinja, divljih životinja i ljudi (Despotović i sar., 2012). Tokom perioda od 1992. do 2000. godine prijavljeno je 1375 slučajeva trihineloze

ljudi, dok je u periodu od 2001. do 2010. godine obolela 281 osoba. Veliki broj epidemija ljudi u poslednje dve decenije, od kojih su najveće u Banjaluci (1996. godine sa 182 obolela, 1997. godine sa 89 obolelih), Zvorniku (1998. godine sa 122 obolela), Foči (2002. godine sa 52 obolela) i 5 smrtnih slučajeva u ovom periodu, dovoljan su razlog da se ovoj helmintozozi pokloni puna pažnja. Mere preveniranja infekcije domaćih svinja i sigurna dijagnostika infektivnih larvi trihinelu u mesu nakon klanja, od izuzetnog su značaja za sprečavanje nastanka infekcije ljudi.

MATERIJAL I METODE RADA

Kao materijal u radu su korišćene dve grupe statističkih podataka:

1. podaci zvaničnih institucija o broju domaćih svinja i broju divljih životinja (Republički zavod za statistiku Republike Srpske, Lovački savez Republike Srpske) i
2. podaci o broju prijavljenih pregledanih i na trihinelozu pozitivnih svinja (Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srpske i Kancelarije za veterinarstvo Bosne i Hercegovine).

Svi prikupljeni podaci su grupisani po opštinama i regijama Republike Srpske, statistički su obrađeni i prikazani tabelarno i u vidu grafikona.

Napravljena je i karta teritorijalne rasprostranjenosti trihineloze kod domaćih svinja za period od 2001. do 2010. godine.

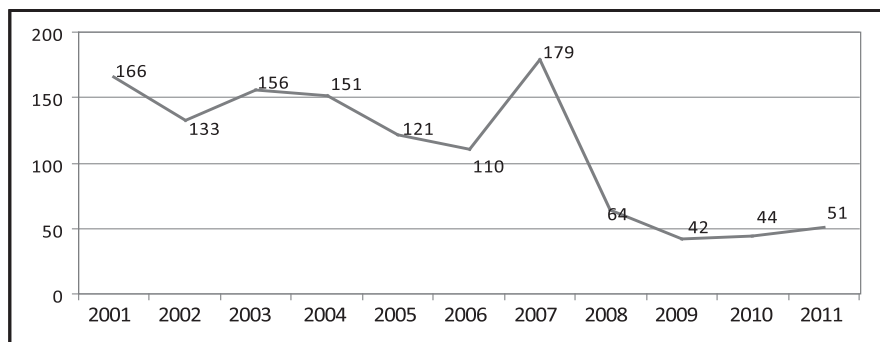
REZULTATI I DISKUSIJA

Radi tačnijeg uvida u kretanje trihineloze kod životinja na prostoru Republike Srpske potrebno je sagledati i stanje u okruženju, pre svega u Federaciji BiH, jer Republika Srpska sa njom čini jedinstveno tržište Bosne i Hercegovine. Tokom perioda od 2001. do 2010. godine u celoj BiH ukupno je prijavljeno 1353 slučaja trihineloze životinja, na 1242 lokaliteta. Od tog broja, 1256 slučajeva je prijavljeno na 1158 lokaliteta u Republici Srpskoj, a 97 slučajeva je prijavljeno na 84 lokaliteta u Federaciji BiH. U celoj BiH je prijavljeno 1233 inficiranih domaćih svinja i 120 divljih svinja (Tabela 1). Procentualni odnos prijavljenih slučajeva u Republici Srpskoj i Federaciji BiH za domaće svinje iznosi 94,57% : 5,43%. Ova disproporcija se objašnjava činjenicom, da većinsko stanovništvo u Federaciji BiH ne koristi svinjsko meso u ishrani jer je muslimanske veroispovesti, zbog čega Federacija BiH ima i značajno manju proizvodnju svinja na seoskim imanjima i malim farmama.

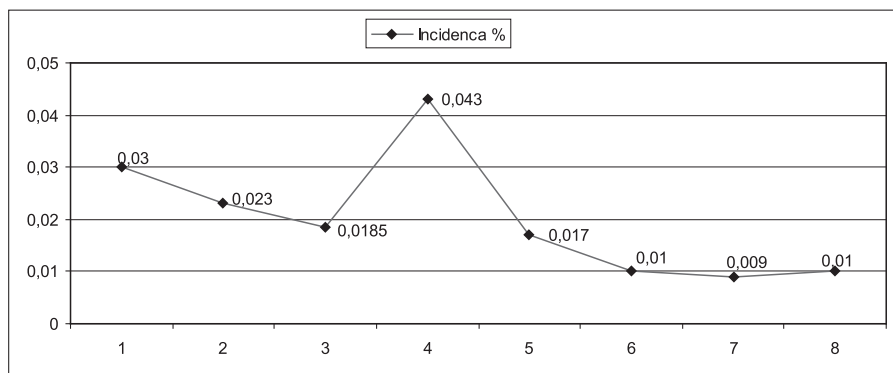
Tabela 1. Trihineloza životinja u BiH u periodu 2001.-2010. Godine

Područje	žarišta	slučajevi	divlje svinje	domaće svinje
R. Srpska*	1158	1256	90	1166
Federacija BiH	84	97	30	67
BiH	1242	1353	120	1233
*u vrednostima za R.Srpsku nalaze se i dole iskazane vrednosti za Brčko distrikt				
Brčko distrikt	39	39	1	38

U Republici Srpskoj trihineloza domaćih svinja se prijavljuje svake godine. U periodu od 2001. do 2011. godine broj slučajeva se kretao blagom silaznom putanjom od 166 slučajeva (u 2001.) do 110 slučajeva (u 2006.). Godine 2007. ustanovljen je pik od 179 prijavljenih slučajeva, nakon čega 2008. godine sledi značajan pad na 64 prijavljena slučaja. Putanja izohipse nastavlja silazno do 2009. godine kada su prijavljena 42 slučaja i 2010. godine kada je taj broj iznosio 44 slučaja. Godine 2011. zabeleženo je blago povećanje na 51 prijavljeni slučaj (Grafikon 1).

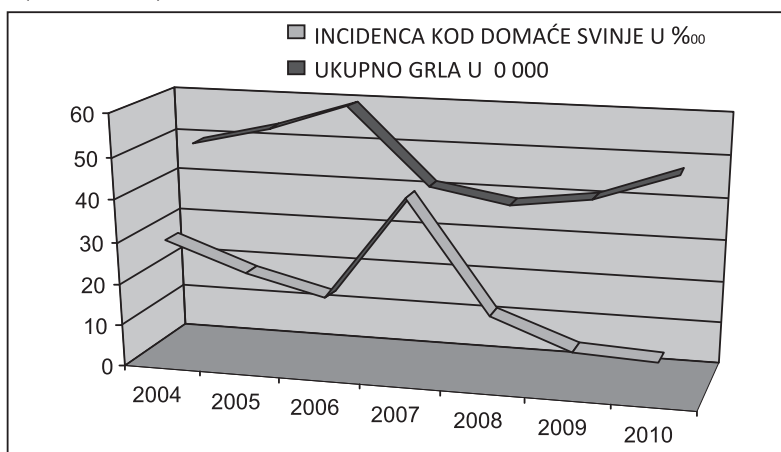


Grafikon 1. Trihineloza domaćih svinja u Republici Srpskoj u periodu od 2001.-2011. godine



Grafikon 2. Kretanje incidencije trihineloze domaćih svinja u Republici Srpskoj u u periodu od 2004. do 2010. godine

Incidencija trihineloze domaćih svinja u Republici Srpskoj ima silaznu putanju od 2004. do 2007. godine, nakon čega se dešava naglo povećanje od 0,043%, a zatim sledi isto tako naglo smanjenje incidencije na 0,017% u 2008. i 0,01 u 2009., da bi u 2010. godini bila najniža 0,009%, što je prvi put ispod 0,01% koliko je ponovo iznosila 2011. (Grafikon 2). Silaznu putanju incidencije do 2006. godine prati povećanje brojnog stanja ukupnog stada, dok se povećanje incidencije 2007. godine dešava u godini u kojoj se drastično smanjuje brojno stanje svinja, a pre svega osnovnog stada (krmača i nazimica). Smanjenje incidencije u godinama posle, sve do 2010. godine, prati održavanje smanjenog broja matičnog stada na 80-90 000 grla i lagan rast ukupnog stada svinja (Grafikon 3).



Grafikon 3. Korelacija incidencije trihineloze domaćih svinja u Republici Srpskoj i kretanja ukupnog broja stada svinja u periodu od 2004. do 2010. godine

Iz očigledne korelacije smanjenja broja stada i povećanja broja trihineloznih domaćih svinja može se zaključiti da je najviša incidencija trihineloze kod domaćih svinja uzrokovana klanjem velikog dela matičnog stada, pre svega iz malih seoskih farmi. Zbog starosti i načina držanja, u ovoj kategoriji su jedinke koje su imale najveće mogućnosti da se inficiraju trihinelom. Pad incidencije, koji je usledio, logična je posledica većeg udela svinja koje dolaze iz uređenih farmi, u broju zaklanih svinja, u odnosu na one koje su uzgajane na malim farmama i seoskim imanjima.

Broj trihineloznih domaćih svinja prati povećanje i pad brojnosti matičnog stada svinja. Povećava se neposredno posle rekordnog prinosa kukuruza i krmnog bilja 2005. godine, a naglo opada nakon lošeg roda i poskupljenja ovog krmiva 2006. i 2007. godine. Pretpostavlja se da je prinos kukuruza i krmnog bilja, osim na povećanje brojnosti matičnog stada, uticao i na rast populacije sinantropnih glodara (miševa i pacova), osnovnih prenosioca trihineloze na domaću svinju (Despotović, 2012). Zbog toga je u godinama povoljnim za biologiju pacova neophodno češće sprovoditi deratizaciju (Stefanović i sar., 1968; Dimitrijević i sar., 1996). Program suzbijanja trihineloze koji predviđa kontrolu pri klanju, otkup inficiranih i sumnjivih svinja iz inficiranog dvorišta i intenzivirane deratizacije, sa velikim uspehom sprovodi Hrvatska na endemskim područjima (Beck i sar., 2007a; Balić i sar., 2010).

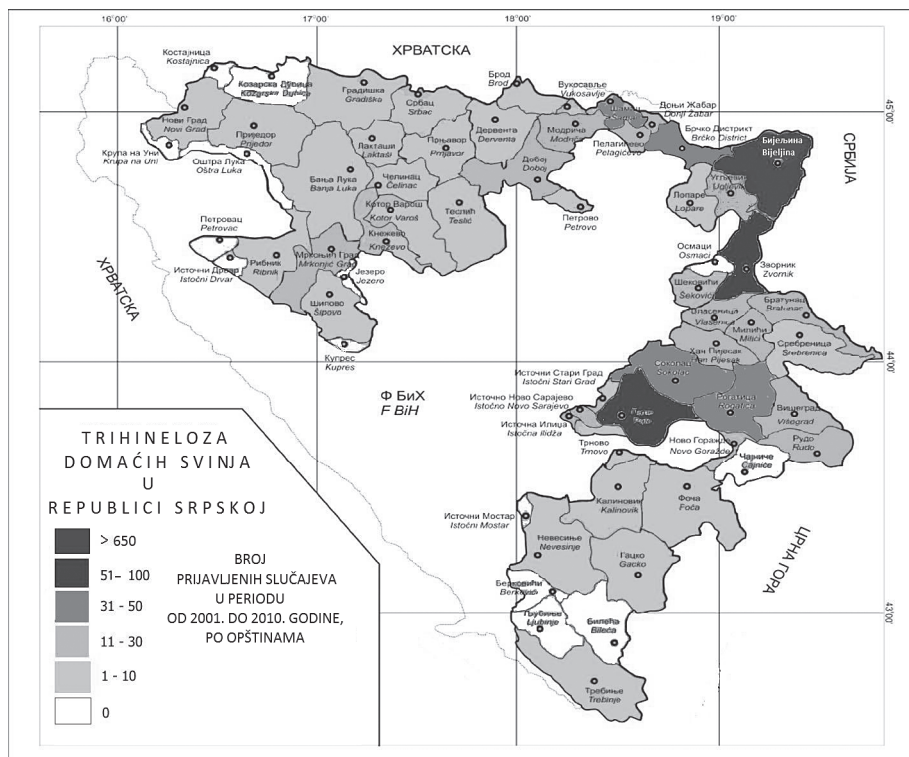
Broj slučajeva trihineloze domaćih svinja u opštini Bijeljina (656) čini 56,99% od ukupnog broja slučajeva u Republici Srpskoj. U ovoj opštini od 2001. do 2007. godine prijavljivano je između 71 i 98 slučajeva. Broj slučajeva je naglo pao na 17 u 2008. godini i 12 u 2009. godini, da bi 2010. godine bilo zabeleženo 26 slučajeva (Tabela 2).

Tabela 2. Trihineloza na području opštine Bijeljina u periodu 2001.-2010. godine

Bijeljina	žarišta	slučajevi	domaće svinje	divlja svinje
2001	79	79	78	
2002	91	95	95	
2003	91	93	93	
2004	83	87	87	
2005	62	78	78	
2006	59	71	71	
2007	90	100	98	2
2008	15	19	17	2
2009	11	12	12	
2010	22	27	26	1
UKUPNO	603	661	656	5

U opštinama Pale i Zvornik prijavljen je 10 puta manji broj slučajeva trihineloze životinja (63 i 56) u odnosu na Bijeljину, što čini 5,00% i 4,00%, u odnosu na ukupan broj slučajeva u Republici Srpskoj (Shema 1).

U području koje se proteže tokom reke Bosne i zahvata opštine Doboj, Modriču i Šamac trihinelozu domaćih svinja se često javlja. Za većinu ostalih delova Republike Srpske, može se reći da se trihinelozu domaćih svinja javlja sporadično. Regija sa najmanje prijavljenih trihineloznih domaćih svinja je regija Trebinja, odnosno Hercegovina, u kojoj se nalaze četiri opštine koje u ovom desetogodišnjem periodu nisu prijavile ni jedan slučaj trihineloze životinja. To su Istočni Mostar, Berkovići, Ljubinje i Bileća (Shema 1). Regija Prijedora takođe ima mali broj prijavljenih slučajeva trihineloze domaćih svinja, a u opštinama Kozarska Dubica i Kostajnica nije bilo prijave trihineloze životinja (Despotović, 2012).



Shema 1. Trihinelozu domaćih svinja u Republici Srpskoj u periodu od 2001.-2010. godine

Najveći broj infekcija kod ljudi u svetu uzrokovan je konzumacijom mesa domaće svinje, zatim konja, a u velikom broju zemalja i mesom inficiranih medveda (Grenland, Kanada, SAD, Poljska, Rusija i Kina), morževa (Kanada i Aljaska), lisica (Kina, Italija), jazavaca (BiH), ovaca (Kina), jaguara (SAD) i pasa (Kina, Tajland i Slovačka) (Dupouy-Camet, 2000; Pozio, 2007).

Na području Republike Srpske u periodu od 2001. do 2010. godine trihinelozu je utvrđena samo kod domaćih i divljih svinja (Despotović i sar., 2012), a u bivšoj BiH kod domaćih i divljih svinja, lisica, vukova i jazavaca (Despotović, 2012).

Meso domaće svinje je najčešći izvor infekcije ljudi, a poslednjih godina sve češći izvor je meso divlje svinje (Despotović i sar., 2012). Prijavljivane su i infekcije ljudi uzrokovane mesom svinja koje je pregledano na trihinelozu metodom kompresije. Donošenjem Pravilnika o merama kontrole trihineloze 2010. godine, usklađenog sa EU Commission Regulation (EC) No 2075/2005, određeno je da se sve prijemčive životinje podvrgavaju pregledu na trihinelozu isključivo metodom digestije.

U zvaničnim izveštajima i stručnim radovima, u Republici Srpskoj i BiH, kao uzročnik trihineloze domaćih, divljih životinja i ljudi isključivo se navodi vrsta *T. spiralis*. Međutim, u susednoj Hrvatskoj DNK tipizacijom vrsta, osim *T. spiralis*, potvrđeno je prisustvo i *T. britovi* i *T. pseudospiralis* kod domaćih i divljih svinja (Beck i sar., 2007b; Beck i sar., 2007a; Florjančić i sar., 2007), dok je u kopnenoj Italiji utvrđena samo vrsta *T. britovi*, što govori da se i na prostoru Republike Srpske i BiH, osim *T. spiralis*, možda pojavljuju i druge vrste trihinela kao uzročnici infekcija životinja i ljudi (Čuperlović i Đorđević, 2003; Pozio, 2007; Pozio i sar., 2007b).

ZAKLJUČAK

U cilju suzbijanja trihineloze životinja i sprečavanja pojave trihineloze kod ljudi, trebalo bi dosledno primenjivati Pravilnik o merama suzbijanja i iskorjenjivanja trihineloze. U pogledu metode pretrage posle klanja i izveštavanja o broju, vrsti i kategoriji pregledanih životinja, od značaja je imenovanje referentne laboratorije, u cilju unapredjenja rada i laboratorija i epidemiologa. Referentna laboratorija bi trebala da prikupi izolate i ispita koje vrste iz roda *Trichinella* su prisutne na području Republike Srpske. Poštovanje preporuke Internacionalne Komisije za trihinelozu, da se u endemskim područjima koristi povećana količina uzorka za pretragu, omogućilo bi i otkrivanje infekcija slabijeg inteziteta.

U pogledu rasprostranjenosti trihineloze domaćih svinja, posebno je teška situacija na području opštine Bijeljina, a enzootsko područje se prostire Posavinom od Bijeljine uz reku Savu do Šamca, te uz reku Bosnu do Doboja i od Bijeljine uz Drinu preko Zvornika i regije Birač do sarajevsko - romanijske regije i opštine Pale.

Potrebno je doneti poseban Program za suzbijanje i iskorenjivanje trihineloze u enzootskim područjima Republike Srpske. Osim pojačanih deratizacija i podizanja nivoa drugih opštih mera biosigurnosti u eventualnom programu suzbijanja ove zoonoze u Republici Srpskoj, treba predviditi i mogućnost borbe protiv trihineloze depulacijom inficiranih farmi kao izvora infekcije.

NAPOMENA:

Rad realizovan po Projektu „Praćenje zdravstvenog stanja divljači i uvođenje novih biotehnoloških postupaka u detekciji zaraznih i zoonoznih agenasa - analiza rizika za zdravlje ljudi, domaćih i divljih životinja i kontaminaciju životne sredine“ (broj TR31084) i Projektu „Primena EIIP/ISM bioinformatičke platforme u otkrivanju novih terapijskih targeta i potencijalnih terapijskih molekula“ (broj 173001), koje je finansiralo Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

LITERATURA

1. Balić D, Gašpar A, Periškić M, Lolić Marica, Krajina H, Škrivanko M, Vučković Mirta : Trihinelozna - još uvijek aktualan problem javnog zdravstva u Hrvatskoj. *Veterinarska stanica*, 41, 6, 493-500, 2010.
2. Beck A, Beck R, Kusak J, Lučinger S, Mihaljević Ž, Živičnjak T, Huber Đ, Gudan A, Pozio E, Marinculić A.: *Trichinellosis* in wolves in Croatia. In: Book of abstracts „XII international Conference on Trichinellosis“, 25th – 30th september, National park Plitvice Lakes, Croatia, 77, 2007.
3. Beck R., Beck A., Lučinger S., Čurković S., Marinculić A.: *Trichinella pseudospiralis* in swine. In: Book of abstracts „XII international Conference on Trichinellosis“, , 25th – 30th september, National park Plitvice Lakes, Croatia, 73, 2007.
4. Despotović D.: Prilog poznavanju epizootioloških i epidemioloških karakteristika trihineloze na području Republike Srpske. Specijalistički rad, Fakultet veterinarske medicine u Beogradu, Beograd, 2012.
5. Despotović D., Ilić T., Trailović D., Dimitrijević S.: Importance of wild boars in the epidemiology of trichinellosis. In: Proceedings of the 1st Interna-

- tional Symposium on animal science, Book II, November 8-10th, 902-911, Belgrade, Serbia, 2012.
6. Dimitrijević S., Ilić T.: Klinička parazitologija. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Izdanje autora i Interprint d.o.o. Beograd, Beograd, 2011.
 7. Dimitrijević S., Sofronić-Milosavljević M., Cokić Z.: *Trichinella spiralis* infection in dogs and rats in one endemic district of trichinellosis in Serbia. In: VII European multicolloquium of Parasitology, Parma, 288, 1996.
 8. Dupouy-Camet J.: Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet Parasitol*, 93, 191-200, 2000.
 9. Dupouy-Camet J., Murrell K.D.: FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO), World Organisation for Animal Health (OIE), Paris (France), 2007.
 10. Florjančić T., Beck R., Tončić J., Martinković F., Živičnjak T., Lučinger S., Antunović B., Gašpar A., Bošković I., Marinculić A.: Trichinellosis in wild boars in Croatia. In: Book of abstracts „XII international Conference on Trichinellosis“, Croatia, 78, 2007.
 11. Merialdi G., Bardasi M., Fontana M.C., Spaggiari B., Maioli G., Conedera G., Vio D., Londero M., Marucci G., Ludovisi A., Pozio E., Capelli G.: First reports of *Trichinella pseudospiralis* in wild boars (*Sus scrofa*) of Italy. *Vet Parasitol*, 178, 3/4, 370-373, 2011.
 12. Pozio E.: The broad spectrum of *Trichinella* hosts: From cold-to warm-blooded animals. *Vet Parasitol*, 132, 1/2, 3-11, 2005.
 13. Pozio E.: World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet Parasitol*, 149, 3-21, 2007.
 14. Pozio E., Goffredo M., Fico R., La Rosa G.: *Trichinella pseudospiralis* in sedentary night-birds of prey from Central Italy. *J. Parasitol*, 85, 759-761, 1999.
 15. Pozio E., Foggin C.M., Gelanew T., Marucci G., Hailu A., Rossi P., Gomez Morales M.A.: *Trichinella zimbabwensis* in wild reptiles of Zimbabwe and Mozambique and farmed reptiles of Ethiopia. *Vet Parasitol*, 143, 305-310, 2007a.
 16. Pozio E., Rinaldi L., Marucci G., Emusella G., La Rosa G., Cringoli G.: Distribution of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in wildlife of the European Union. In: Book of abstracts „XII international Conference on Trichinellosis“, 25th – 30th september, National park Plitvice Lakes, Croatia, 74, 2007b.

17. Pozio E., Hoberg E., La Rosa G., Zarlenga D.S.: Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 606-616, 2009.
18. Goganović R.: Trihinelozna - poučnik za svakoga. Zavod za zdravstvenu zaštitu Tuzla, 1988.
19. Stefanović N., Kubelka D., Kadić Š., Stefanović Lj.: Trihinelozna u Bosanskoj Krajini-mogućnosti dijagnostike i terapije. *Scripta medica*, Banja Luka, 3/4, 223-228, 1968.
20. Čuperlović K., Đorđević M. Trihinela i trihinelozna. Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd, 2003.

Primljeno: 15.11.2012.

Odobreno: 08.05.2013.

UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RUKOPISA

ARHIV VETERINARSKE MEDICINE je časopis Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad" u Novom Sadu. Časopis objavljuje originalne, stručne i pregledne radove, priloge iz prakse, izveštaje sa kongresa i stručnih sastanaka, prikaze knjiga, radove iz istorije veterinarske medicine

Sve primljene rukopise Uređivački odbor šalje recenzentima radi stručne procene. Ukoliko recenzenti predlože izmene i dopune, tada se kopija recenziranog rukopisa dostavlja prvom autoru s molbom da tražene izmene unesu u tekst ili pak u protivnom da argumentovano izraze svoje neslaganje sa datim primedbama recenzenta. Konačnu odluku o prihvatanju rada za štampu donosi glavni i odgovorni urednik zajedno sa uređivačkim odborom.

Časopis se štampa na srpskom jeziku, a kratak sadržaj se prevodi na engleski. Radovi stranih autora se štampaju na engleskom jeziku sa kratkim sadržajem na srpskom.

Molimo saradnike da svoje radove pišu u skladu sa sledećim uputstvima.

Opšta uputstva

Tekst rada se kuca u programu za obradu teksta Word, latinicom, fontom Times New Roman, veličina slova 12 tačaka (12 pt), dupli proredom. Levu i desnu marginu podesiti na 20 mm, a gornju i donju na 30 mm, na A4 strani. Ukoliko se u tekstu koriste specijalni znaci (simboli), koristiti font Symbol. Rukopis rada dostaviti odštampan jednostrano papiru, ali i u elektronskoj formi. Paginacija na desnoj strani lista, počevši od naslovne strane. Reference u tekstu treba da navedu ime autora, iza kojeg se stavlja zarez i godina. Ukoliko ima više od dva autora, tada se u zagradi piše samo prezime prvog autora uz dodatak «i sar.» pa godina (Vidić i sar., 2004).

Ukoliko je rad iz programa nekog projekta na kraju rada navesti finansijera projekta i evidencioni broj.

Naslovna strana

Na prvoj stranici treba napisati sledeće:

- naziv članka, odnosno rada treba pisati velikim slovima bez podvlačenja i bez skraćenica
- imena autora pisati ispod naslova punim imenom i prezimenom, razdvojena samo zarezom.

Iznad prezimena se brojem označava ustanova u kojoj radi autor (autori):

- navesti punu adresu ustanova u kojima autori rade; navoditi onim redosledom koji odgovara redosledu autora u radu;
- na dnu stranice treba navesti ime e-mail jednog od autora, radi korespondencije.

Kratak sadržaj

Na posebnoj stranici uz rad treba priložiti i kratak sadržaj rada, obima 300 reči. Pored naslova i imena autora i ustanova, kratak sadržaj treba da sadrži najvažnije činjenice iz rada. Takođe, ispod kratkog sadržaja treba navesti 3-8 ključnih reči.

Pisanje teksta

Svi podnaslovi se pišu velikim boldiranim slovima. U radu koristiti kratke i jasne rečenice. Tekst treba da bude u duhu srpskog jezika, a sve strane izraze za koje postoje odgovarajuće reči u našem jeziku ne treba koristiti. Za nazive lekova koristiti isključivo njihova internacionalna nezaštićena imena (tj. generička imena) i pisati ih onako kako se izgovaraju (ne na latinskom ili engleskom jeziku). Ukoliko se, pak, želi ipak istaći ime nekog preparata, onda se njegovo ime (zajedno sa imenom proizvođača) stavlja u zagradu iza naziva aktivne supstancije. Uređaji ili aparati se takođe označavaju njihovim trgovačkim nazivima, s tim što se i ovde u zagradi mora navesti ime i mesto proizvođača. Za svaku skraćenicu, koja se prvi put javlja u tekstu treba navesti i pun naziv. Skraćenice nikako ne koristiti u naslovu, a u kratkom sadržaju ih takođe treba izbegavati. Decimalne brojeve pisati sa zarezom i bar još jednom nulom. Obim rukopisa bez priloga, ne treba da bude veći od 8 stranica kucanog teksta. Izbegavati veliki broj priloga.

Tabele se označavaju arapskim brojevima (iznad tabela) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman, veličina slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se u tabeli koriste skraćenice treba ih objasniti u legendi ispod tabele.

Grafikoni se takođe označavaju arapskim brojevima (ispod grafikona) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 12 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se koriste skraćenice, treba ih objasniti u legendi ispod grafikona.

Sheme (crteži) se označavaju arapskim brojevima (ispod shema) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Koristiti font Times New Roman i veličinu slova 10 pt, sa jednostrukim proredom i bez uvlačenja. Ukoliko se koriste skraćenice, treba ih objasniti u legendi ispod sheme.

Fotografije se označavaju arapskim brojevima (ispod fotografije) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Primaju se isključivo originalne fotografije (crno-bele ili u boji) na sjajnom (glatkom, a ne mat) papiru. Na poledini svake fotografije treba napisati redni broj i strelicom označiti gornji deo slike. Za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu sliku.

Poglavlja rada

Poglavlja rada su: **Uvod, Materijal i metode rada, Rezultati, Diskusija (ili Rezultati i diskusija zajedno), Zaključak i Literatura.**

U **uvodu** treba ukazati na najvažnije, odnosno najnovije činjenice i poglede vezane za temu rada, sa kratkim obrazloženjem cilja sopstvenih ispitivanja.

Materijal i metode rada. U ovom poglavlju treba opisati uslove pod kojima su ogledi izvedeni, navesti pun naziv metoda koje su korišćene u ispitivanjima, materijal i životinje na kojima su izvedena ispitivanja.

Rezultati. Rezultate prikazati pregledno uz pomoć tabela ili grafikona. Svuda treba da stoji redni broj i tekst, koji opisuje šta određena slika, tabela, grafikon prikazuje. Redni broj sa tekstom se stavlja iznad tabela, a kod svih ostalih prezentacija ispod.

Diskusija. U ovom poglavlju se prikazuju uporedna analiza dobijenih rezultata sa rezultatima i mišljenjima drugih autora sa isticanjem značaja ispitivanja ali bez donošenja zaključaka.

Zaključak. U ovom poglavlju autor iznosi svoja zaključna razmatranja.

Literatura. U ovom poglavlju autor treba da iznese literaturne podatke, odnosno radove, koje je koristio u toku izrade svog rada. Poželjno je da korišćena literatura bude što novija. Reference treba pisati jednu ispod druge (numerisati ih arapskim brojevima) i abecednim redom prema prvom slovu prezimena prvog autora. Broj referenci nije u principu ograničen ali se preporučuje da ne bude veći od 15. Reference članaka koji su prihvaćeni za štampu treba označiti kao «u štampi» i priložiti dokaz o prihvatanju rada.

Primeri navođenja referenci:

1. Članak u časopisu:

Stojanović D., Maličević Ž., Ašanin R.: The use a new model for the investigation of sepsis. Acta Veterinaria, 52, 2/3, 125-131, 2002

2. Knjige i druge monografije:

Qinn P.: Clinical Veterinary Microbiology. London, Mosby, 1998

3. Poglavlje u knjizi:

Vidić B., Boboš S., Lako B., Lončarević A.: Dijagnostika bruceloze. U: Aleksandar Lončarević, Bruceloza svinja, Beograd: Poljoprivredni fakultet, 2000, str. 47-49.

4. Članak u zborniku radova sa naučno-stručnog skupa:

Valčić M., Lazić S., Rašić Z.: Mesto i uloga terenskog veterinara u epizootiološkom radu.

U: Dragiša R.Trailović, urednik, Zbornik radova, X regionalno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja, 1-5. septembar, Kragujevac, Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2008, 75-82.

Napomena

Rad koji ne ispunjava sve gore navedene uslove neće biti poslat na recenziju i biće vraćen autorima da ga dopune i isprave.

Adresa časopisa

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad
Rumenacki put 20, tel. 021/ 4895392, e-mail: arhiv@niv.ns.ac.rs

NOTE FOR CONTRIBUTORS

ARCHIVE OF VETERINARY MEDICINE is a journal of the Scientific Veterinary Institute "Novi Sad" in Novi Sad. The journal publishes original, expert and review papers, case reports, reports from symposia and other meetings, book reviews, cases from history of veterinary medicine.

All manuscripts are sent for a review and evaluation. In the case the reviewer suggests additional changes, the manuscript will be sent to the first author with a kind request to change the manuscript. In the case the author does not want to change, appropriate argumentation should be given. Final decision on accepting the manuscript is given by the editor in chief, together with editorial committee.

The journal is published in the Serbian language, followed by an abstract in English. The papers of foreign authors are published in English followed by an abstract in Serbian.

The manuscript should be written according to the following instructions:

General notes

The paper should be in Word program, Latin characters, size 12 pt, Times New Roman, double spaced. Left and right margins 20 mm, top and foot margins 30 mm, paper size A4. If special symbols are used, use font Symbol. The manuscript should be submitted on paper size A4, but also in electronic form. Pagination on the right side, starting from the title page. References and notes are cited in the text by authors' names, followed by the year of publication. If there are more than two authors, only the name of the first author is written followed by the abbreviation "i sar." (Vidić i sar., 2004).

If the paper is part of a project, name the financier and the project number at the end.

Title page

On the title page the following should be written:

- the title of the paper in capital letters, without underlining and abbreviations
- the names of the authors (first and second name, followed by a comma).

Above the second name place a number that denotes the institution where the author works:

- full name of the institutions should be given.
- at the bottom of the page write E-mail address of one author, for correspondence.

Summary

Every paper should be followed by a summary (300 words). Beside the title, name of the authors and institutions, it should contain the most important facts from the paper and three to eight key words.

Text

All the subtitles write in bold capital letters. Use short and concise sentences. Name the drugs as their International Nonproprietary Names (so called generic names). If the name of a specific drug is to be stressed, name it together with the producer (in brackets). The names of devices write as used in trade (name of the producer in brackets). When using an abbreviation for the first time, write the words that stand for. Abbreviations cannot be used in the title and summary. Text should not be longer than 8 pages. Avoid long enclosures.

Tables number with the Arabic numerals (above the table). Use Times New Roman, 12 pt, single space, without indentation. If abbreviations are used, give an explanation bellow the table.

Graphs number with the Arabic numerals (below the graph). Use Times New Roman, 12 pt, single space, without indentation. If abbreviations are used, give an explanation below the graph..

Scheme number with the Arabic numerals (below the scheme). Use Times New Roman, 10 pt, single space, without indentation. If abbreviations are used, give an explanation below the graph.

Photographs number with the Arabic numerals (below the photo). Only original photographs can be used (black and white). On the back side write ordinal number of the photo and mark the top of the photo.

Headings

Headings in the paper are: **Introduction, Material and Methods, Results, Discussion (or Results and Discussion), Conclusion and Literature.**

Introduction points on the most important, i.e. most recent data regarding the topic with a short presentation of the aims of this research.

Material and Methods. Here describe the conditions in the experiment, name the used methods, material and animals.

Results. The results are displayed through tables or graphs, numbered with ordinal numbers and with an explanation what the photo, table or graph shows.

Discussion. Here give analyses of the obtained results comparing to the results and opinions of other authors, pointing the importance of this research, without giving a conclusion.

Conclusion. Here the authors gives his final conclusions.

Literature. The author should list the references, preferably the most recent one. References should be numbered with Arabic numerals, one under the other, written in alphabetical order according to the surname of the first author. In general, the number of references is not limited, but it is advisable to write 15 references.

Examples of references:

1. Articles in journals:

Stojanović D., Maličević Ž., Ašanin R.: The use a new model for the investigation of sepsis. *Acta Veterinaria*, 52, 2/3, 125-131, 2002

2. Books:

Qinn P.: *Clinical Veterinary Microbiology*. London, Mosby, 1998

3. Chapters in books:

Vidić B., Boboš S., Lako B., Lončarević A.: Dijagnostika bruceloze. U: Aleksandar Lončarević, *Bruceloza svinja*, Beograd: Poljoprivredni fakultet, 2000, str.47-49

4. Articles in proceedings:

Valčić M., Lazić S., Rašić Z.: Mesto i uloga terenskog veterinara u epizootiološkom radu.

U: Dragiša R.Trailović, urednik, *Zbornik radova, X regionalno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja*, 1-5. septembar, Kragujevac, Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2008, 75-82

Note

A paper that is not in accordance to the aforementioned instructions will not be sent for a review and will be returned to the authors for corrections.

Address of the journal

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad
Rumenački put 20, tel. 021/ 4895392, e-mail: arhiv@niv.ns.ac.rs

