

UDK 619

ISSN 1820-9955

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”
Novi Sad

Arhiv veterinarske medicine

Arh. vet. med.	vol. 5	br. 1	str. 1-96	Novi Sad, 2012.
----------------	--------	-------	-----------	-----------------

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

O REĐIM UZROČNICIMA MASTITISA KRAVA - *Serratia marcescens* -

Milanov Dubravka¹, Prunić Bojana¹, Košarčić
Slavica¹, Potkonjak Aleksandar²

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

²Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad

Kratak sadržaj

Serratia marcescens je smatrana saprofitskom bakterijom iz životnog okruženja i tek više decenija nakon otkrića je prepoznata kao uzročnik bolesti biljaka i širokog spektra beskičmenjaka i kičmenjaka. Svrstana je u važne humane patogene, odgovorna je za niz slučajeva bolničkih infekcija, a zbog sve učestalije rezistencije na više klasa antibiotika, postaje rastući problem u očuvanju javnog zdravlja. Kod mlečnih krava *S. marcescens* izaziva uglavnom subkliničke mastitise hroničnog toka, po čemu se bitno razlikuje od koliformnih uzročnika, pa i drugih bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*. Inficirane krave retko pokazuju lokalne, a još ređe sistemske znake infekcije, ali mesecima, pa čak i godinama izlučuju mlekom ovu bakteriju i predstavljaju izvor infekcije za druge jedinke u zapatu. Iako pripada uzročnicima mastitisa poreklom iz životnog okruženja, *S. marcescens* može da se prenese sa krave na krave i tokom muže. Tretman antibioticima je uspešan u malom broju slučajeva. Većinu izolata *S. marcescens* iz životnog okruženja karakteriše produkcija crvenog pigmenta - prodigiozina, čija je uloga u fiziologiji bakterija nepoznata. Ovaj sekundarni metabolički produkt *S. marcescens* predmet je brojnih istraživanja u oblasti farmacije i bioinženjeringa, zbog njegovog antibakterijskog, antifungalnog, antiprotozoalnog (antimalaričnog) dejstva i njegove imunomodulatorne i antikancerogene aktivnosti.

Ključne reči: *Serratia marcescens*, mastitis, prodigiozin

¹ E mail: dubravka@niv.ns.ac.rs

LESS COMMON AETIOLOGICAL AGENT OF BOVINE MASTITIS

- *Serratia marcescens* -

Milanov Dubravka¹, Prunić Bojana¹, Košarčić
Slavica¹, Potkonjak Aleksandar²

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad

²Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine, Novi Sad

Abstracts

Serratia marcescens was considered originally a saprophytic bacteria in the environment, and many decades after the discovery it was actually recognized as a pathogen of plants and a wide range of invertebrates and vertebrates. It has been identified as an important human pathogen that causes a number of hospital-acquired infections. Due to the increase of resistance to a variety of antibiotics, the bacteria is recognized as *an important public health* issue. *S. marcescens* causes subclinical, chronic mastitis in dairy cows, which makes it significantly different from other members of *Enterobacteriaceae* family, such as coliform bacteria. In infected cows clinical signs are mostly mild, but for months, or even years, the bacteria is secreted in milk and infection of other cows in the herd may occur via the milking system. The antibiotic treatment of mastitis caused by *S. marcescens* is considered less efficient. Most isolates of *S. marcescens* from the environment are characterized by a production of red pigment - prodigiosin, with the unknown function in bacterial physiology. This secondary metabolic product of *S. marcescens* is the subject of research in the field of pharmacy and bioengineering, because of its antibacterial, antifungal, antiprotozoal (antimalaric) and immunomodulatory effects, as well as anticancer activities.

Key words: *Serratia marcescens*, mastitis, prodigiosin

Godinama unazad *Serratia marcescens* je samo sporadično izolovana iz mleka krava sa mastitisom na farmama našeg epizootiološkog područja. Prethodne godine, ova bakterija je izolovana iz 21 od ukupno 350 uzoraka mleka sa jedne farme mlečnih krava holštajn-frizijske rase u Vojvodini. Neposredno podstaknuti ovim zapažanjem, u priči koja sledi, podsećamo stručnu javnost na ovu bakteriju i neke manje ili više poznate činjenice o njoj.

Istorijat

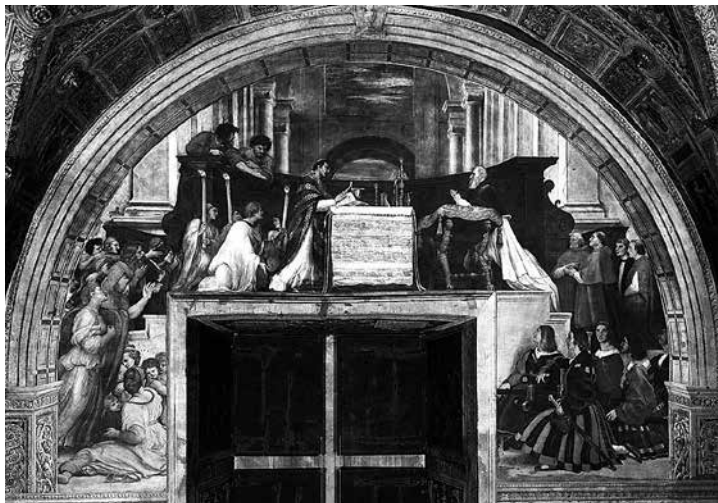
S. marcescens je otkrio 1819. godine italijanski farmaceut Bartolomeo Bizio (Slika. 1), a četiri godine kasnije dao joj naziv „*Serratia*“ u čast Serafino Serrati, italijanskog fizičara koji je izumeo parobrod, i „*marcescens*“ od latinskog glagola koji označava „propadanje“, zbog nestajanja tamno ružičastog do crvenog pigmenta ove bakterije u subkulturama. Ehrenberg joj je 1848. godine promenio naziv u *Monas prodigiosus* („čudesna bakterija“), a on je kasnije modifikovan u *Bacillus prodigiosus*. Od 1920. godine vraćen joj je prvobitni naziv (Wikipedia: *Serratia_marcescens*).



Slika 1. Bartolomeo Bizio
(30.10.1791-27.09.1862)

S. marcescens je ubikvitarna u prirodi i uobičajeno se može naći u zemljištu, vodi, vazduhu, biljkama, životinjama i hrani. Namirnice sa visokim sadržajem skroba su odlična sredina za život ove bakterije, a rast se zapaža i pri čuvanju namirnica na niskim temperaturama. Još je u 6. veku pre nove ere Pitagora zapazio crvenu tečnost „koja izlazi iz hleba“, a u preko 35 istorijskih zapisa opisana je pojava „Isusove krvi“ na hlebu tokom pričešća. Impresivno crvene kolonije *S. marcescens*, nalik kapljicama krvi, danas su naučno objašnjenje za „pretvaranje hleba u Isusovo telo“, što je vekovima bio predmet religioznih zabluda i ushićenja verenika. Jedan takav događaj iz 1263. godine Rafael

je prikazao na fresci *Mass at Bolsena* Arhijerejske palate u Vatikanu (Slika 2). U čast tog čudesnog događaja, Papa Urban IV je 1624. godine ustanovio „Priznik tela Hristovog“.



Slika 2. The Mass at Bolsena, freska, 1512

Raphael Sanzio (Italian: Raffaello, 1483 – 1520) Apostolska Palata, Vatikan, Italija
http://allart.biz/photos/image/Raphael_21_The_Mass_at_Bolsena.html

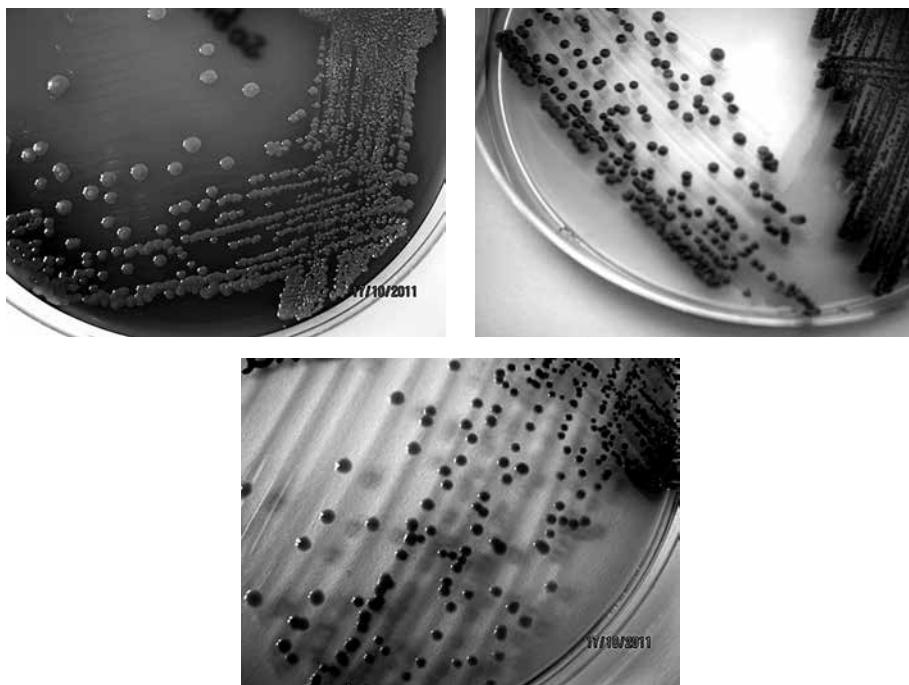
Do sredine 50-tih godina prošlog veka *S. marcescens* je smatrana saprofitskom bakterijom iz životnog okruženja, pa je zbog pigmentisanih, a time i lako prepoznatljivih kolonija često korišćena u eksperimentima kao biološki marker. U ogledima o značaju pranja ruku, ruke su potapane u suspenziju *S. marcescens*, nakon čega je dokazivano njeno prenošenje rukovanjem sa osobe na osobu. Američka mornarica je 26. i 27. septembra 1950. godine sprovedla eksperiment pod nazivom „*Operation Sea-Spray*” gde je *S. marcescens* ispuštena u vazduh iznad zaliva San Francisco u naseljenim oblastima. Iako je vojska tvrdila da je reč o bakteriji bezopasnoj za ljudsko zdravlje, narednih dana u lokalnoj bolnici ustanovljen je porast broja respiratornih infekcija (pneumonija) i jedanaest slučajeva ozbiljnih infekcija urinarnog trakta (sa jednim smrtnim ishodom) (Wikipedia: *Serratia marcescens*).

Taksonomija, izolacija i identifikacija

Serratia spp. su gram negativne štapičaste bakterije (0,5-0,8 x 0,9-2,0 µm) iz familije *Enterobacteriaceae*. Katalaza su pozitivne, oksidaza negativne, veoma pokretne, zahvaljujući peritrihno raspoređenim flagelama. Deset vrsta se

trenutno nalazi u rodu *Serratia*: *S. marcescens*, *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans* i *S. rubidaea*. Sve vrste, osim *S. fonticola* hidrolizuju DNK, lipide i proteine (želatin, kazein) (Grimont i Grimont, 2005).

S. marcescens raste lako na standardnim laboratorijskim podlogama kao što su krvni i *MacConkey* agar u aerobnim i anaerobnim uslovima, na temperaturama od 4-40°C, u opsegu pH vrednosti od 5 do 9 (Slika 3). Sojevi koji ne proizvode pigment veoma su slični drugim članovima familije *Enterobacteriaceae*. Postoji više tipova diferencijalnih i selektivnih podloga za izolaciju *Serratia* vrsta, a *Capryllate Thallous* (CT) agar smatra se najboljom.



Slika 3: Kolonije *Serratia marcescens* na krvnom, *MacConkey* i neutralnom agaru (inkubacija na sobnoj temperaturi) (dr Dubravka Milanov, NIV-NS)

S. marcescens proizvode ekstraselularne hitinaze, više proteaza, nukleaza i lipaze (Hines i sar., 1988). Fermentuje saharozu i glukozu uz produkciju gasa (<10% Durhamove cevčice). Redukuje nitrate, koristi citrate kao izvor ugljenika, a proizvode i želatinaze koje rastapaju želatin na temperaturama ispod 25°C. Svi izolati *S. marcescens* su laktoza negativni, metil-red negativni i Voges-Proskauer pozitivni. Interesantno je da API 20E sistem korektno iden-

tifikuje samo 85% izolata *S. marcescens* (Hejazi i Falkiner, 1997). Zbog sposobnosti ove bakterije da oksidiše arabinozu u API sistemu, arabinoza pozitivni sojevi *S. marcescens* se identifikuju kao *S. liquefaciens* (Hejazi i Falkiner, 1997). Skoro svi sojevi *S. marcescens* produkuju jedan citotoksin (ShlA) koji izaziva lizu eritrocita ljudi i životinja.

Kod *S. marcescens* je opisano 28 somatskih antigena (O1 do O28) i 25 flagelarnih antigena (H1 do H25). Predložena je dalja podela antigena O5 (u O5a, O5b, O5c), O10 (u O10a, O10b) i O16 (u O16a, O16b, O16c, O16d) (Grimont i Grimont, 2005).

Pigment *S. marcescens* - prodigiozin

Crvene pigmente sintetišu različite bakterije iz rodova *Actinomyces*, *Streptomyces* i *Serratia*. Pigment *S. marcescens*, prodigiozin, prvi je izolovao i opisao Kraft 1902. godine, a ovaj pigment je izolovan i iz drugih vrsta bakterija kao što su: *Serratia plymuthica*, *Serratia rubidaea*, *Pseudomonas magnisorubra*, *Hahella chejuensis*, *Vibrio gazogenes* i *Vibrio psycroerythreus* (Mekhael i Yousif, 2009). Neki sojevi *S. marcescens* koji pripadaju biotipu A4a mogu sintetisati *pyrimine*, rastvorljivi rozi pigment, a opisan je i žuti rastvorljivi pigment kod sojeva *S. marcescens* koji pripadaju biotipu A8a i koji su izolovani samo iz urina ljudi (Trias i sar., 1988). Žuti pigment je primarni metabolit uključen u katabolizam aromatičnih jedinjenja *S. marcescens* (Trias i sar., 1988).

Prodigiozin sintetišu sojevi *S. marcescens* koji pripadaju biogrupama A1 i A2/6 i većina sojeva *S. plymuthica* i *S. rubidaea* (Grimont i Grimont, 2005). Prodigiozin je linearni tripirol ($C_{20}H_{25}N_3O$) male molekulske težine čija se biosinteza odvija u ćelijama stacionarne faze rasta. Biosinteza prodigiozina je račvast proces tokom kojeg se odvojeno sintetišu komponentne tripirola: mono i bipirol. Prodigiozin nije neophodan za primarni metabolizam rasta i umnožavanja bakterija, pa se smatra sekundarnim metabolitom čija funkcija u ćelijskoj fiziologiji nije poznata. Pretpostavka je da ima ulogu u disanju bakterija, a postoji i stav da u prirodnim uslovima on povećava hidrofobnost ćelijske površine bakterija, što doprinosi njihovoj rasprostranjenosti u prirodi. Pigment je vezan za unutrašnju membranu ćelije i nerastvorljiv je u vodi (Vinas i sar., 1983).

Većina izolata *S. marcescens* poreklom iz životnog okruženja je pigmentirana, dok najveći broj kliničkih izolata ne produkuje pigment (Hejazi i Falkiner, 1997; Carbonell i sar., 2000). Postoji interesantna hipoteza po kojoj *S. marcescens* limitira sintezu prodigiozina u organizmu domaćina, jer on deluje kao antigen koji pokreće ćelijski i humoralni imunski odgovor. Od ukupno 938 sojeva *S. marcescens* izolovanih tokom deset godina iz uzoraka sputuma,

briseva rana, konjunktiva i urina pacijenata, kao i sa površina pomoćnih medicinskih uređaja (katetera) u bolnicama, 32 (3,4%) su proizvela pigment (Carbonell i sar., 2000). Smatra se da hromogeni biotipovi retko izazivaju infekcije (Venil i Lakshmanaperumalsamy, 2009) i da su osetljiviji na antibiotike u odnosu na nepigmentirane sojeve (Carbonell i sar., 2000).

Na biosintezu prodigiozina utiče temperatura inkubacije, sastav podloge, koncentracija raspoloživog kiseonika i pH vrednost. Maksimalna produkcija prodigiozina zapaža se umnožavanjem bakterija u hranljivom bujonu na pH8 i na temperaturi od 28°C - 30°C (Venil i Lakshmanaperumalsamy, 2009; Mekhael i Yousif, 2009). Sintaza pigmenta je inhibirana inkubacijom u anaerobnim uslovima i na temperaturi od 37°C (Carbonell i sar., 2000; Grimont i Grimont, 2005). Prodigiozin je osetljiv na svetlost. Antibiotici, kao što su cefoksitin, eritromicin, tobramicin, co-trimoksazol, imipenem i nitrofurantoin inhibiraju sintezu prodigiozina kod izolata *S. marcescens* iz urina (Ang-Kucuker i sar., 2000). Kumarinska komponenta ekstrakta korena biljke *Ferula persica* pokazuje inhibitorni efekat na produkciju prodigiozina (Iranshahi i sar., 2004). Članovi roda *Ferula* su široko rasprostranjeni u centralnoj Aziji, a koren ove biljke se u tradicionalnoj medicini Irana koristi u terapiji šećerne bolesti.



Slika. 4: Uticaj temperature inkubacije na sintezu prodigiozina *S. marcescens* (inkubacija 5 dana u hranljivom bujonu na 28°C (levo) i 37°C (desno) (dr Dubravka Milanov, NIV-NS))

Brojna istraživanja su pokazala raznovrsne efekte prodigiozina: antifungalno, antibakterijsko, algicidno, antiprotazoalno (antimalarično) dejstvo, imunomodulatornu (imunosupresivnu) i antikancerogenu aktivnost (D'Alessio i

sar., 2000; Mekhael i Yousif, 2009; Han i sar., 2001; Kavitha i sar., 2010). Antibakterijsko delovanje prodigiozina izraženije je *in vitro* prema gram-pozitivnim bakterijama (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus avium* i *Streptococcus pyogenes*) u odnosu na gram-negativne (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis* i *Klebsiella pneumoniae*) (Mekhael i Yousif, 2009). Smatra se da je ova aktivnost prodigiozina rezultat njegove sposobnosti da prođe kroz membranu i inhibira ciljne enzime kao što su DNK giraza i topoizomeraza IV, što inhibira rast bakterija (Mekhael i Yousif, 2009). Soj *S. marcescens* NCTC 10211 pokazuje inhibitorni efekat na *Helicobacter pylori*, uzročnog agensa ulkusa želuca. Buduća istraživanja komponente koja pokazuje ovaj inhibitorni efekat omogućava razvoj novih lekova u terapiji gastričnog ulkusa.

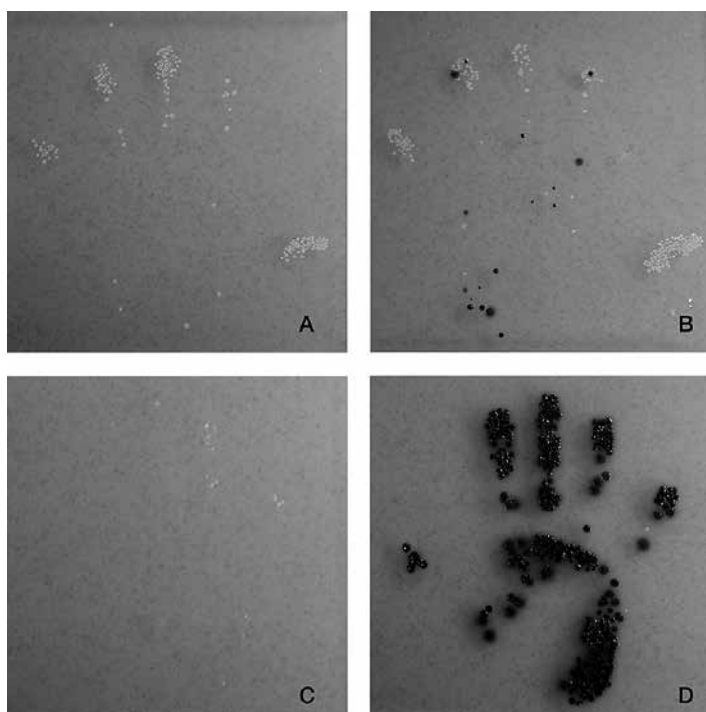
Prodigiozin je i kandidat u terapiji malignih oboljenja. *In vitro* je ispitana njegova citotoksična moć na kulturama humanih tumorskih ćelija (pluća, kolona, bubrega, jajnika, mozga, melanoma i leukemije) indukcijom ćelijske smrti (apoptoze) i inhibicijom ćelijske proliferacije (Venil i Lakshmanaperumalsamy, 2009). U zavisnosti od doze, prodigiozin pokazuje snažno antikanцерogeno i apoptotično delovanje na ćelije humanog karcinoma grlića materice (Hela-229 linija ćelija) (Kavitha i sar., 2010). Dokazan je i imunosupresivni efekat prodigiozina na proliferaciju T-limfocita i istražuju se mogućnosti njegove primene u terapiji autoimunih bolesti (Han i sar., 2001). Prodigiozin se smatra i biološkim kontrolnim agensom protiv štetnih algi u moru (Venil i Lakshmanaperumalsamy, 2009).

S. marcescens kao uzročnik bolesti

S. marcescens je uzročnik bolesti ljudi, životinja, biljaka i insekata. Vodom za piće i različitim namirnicama ova bakterija dospeva u digestivni trakt ljudi, ali nije uobičajeni deo crevne mikroflore i unošenje hranom ili vodom rezultira prolaznom kolonizacijom sluzokože orofaringealne regije i debelih creva, bez znakova infekcije. Smatra se da prvi klinički izveštaj o infekciji izazvanoj *S. marcescens*-om datira iz 1913. godine, kada je opisan slučaj jednog pacijenta sa bronhiektazijom i krvavim sputumom. Mikroskopskim pregledom sputuma nije otkriveno prisustvo eritrocita, ali su zapažene brojne gram-negativne bakterije. Za ovaj sindrom ustanovljen je naziv pseudohemoptoza. Kod ljudi *S. marcescens* izaziva septikemije, meningitis, pneumonije, infekcije rana i urinarnog trakta, a infekcije su često i letalne (Hejazi i Falkiner, 1997). Opisane su i infekcije očiju, osteomijelitis, septični artritis, infekcije mekih tkiva i kože, cerebralni apsces, endokarditis i infekcije dojki kod žena posle porođaja. *Serratia marcescens* je veoma značajan patogen u neonatalnoj intenzivnoj nezi i kod

novorođenčadi može izazvati teške infekcije (meningitis, pneumonije, bakterijemije) praćene visokim morbiditetom i mortalitetom. Od šezdesetih godina prošlog veka, *S. marcescens* je svrstana u značajne uzročnike bolničkih infekcija, a njihov broj je u poslednje tri decenije u stalnom porastu. Intervencije sa visokim rizikom uključuju kateterizacije, lumbalnu punkciju, peritonealnu dijalizu, hirurške zahvate i tretman opekotina, a dugotrajna terapija antibioticima takođe povećava rizik od infekcije.

Rastvori za parenteralnu primenu mogu biti kontaminirani sa *S. marcescens*. Smatra se da su bakterijemije (sa devet smrtnih ishoda) kod 19 bolničkih pacijenata u *Alabama hospital* 2011. godine, direktna posledica primene infuzionih rastvora kontaminiranih *S. marcescens* (<http://www.myfoodpoisoninglawyer.com>). Zabeleženi su i slučajevi infekcija ljudi transfuzijom kontaminirane krvi ili komponenata krvi (Hejazi i Falkiner, 1997). *S. marcescens* je u stanju da preživi i raste u sapunu, dezinficijensima, antisepticima i destilovanoj vodi (Hejazi i Falkiner, 1997). Takođe može kontaminirati meka očna sočiva.

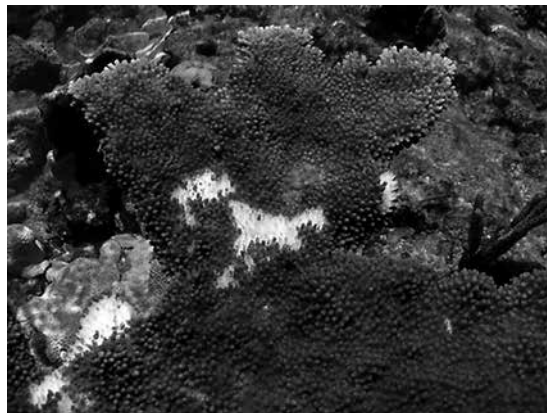


Slika. 5. Kontrolisana studija o broju bakterija na rukama (pritisak na površinu aga-
ra) pre (A i C) i posle (B i D) pranja ruku sapunom koji sadrži 4,51 log₁₀ CFU/mL
(A i B) i 7,51 log₁₀ CFU/mL (C i D) *S. marcescens*
<http://aem.asm.org/cgi/content-nw/full/77/9/2898/F1>

Tretman infekcija kod ljudi može biti težak zbog otpornosti ove bakterije na antibiotike, kao što su ampicilin, tetraciklini, prva i druga generacija cefalosporina. Pojedini izolati *S. marcescens* su rezistentni na aminoglikozide (Coria-Jimenez i Ortiz-Torres, 1994) i ciprofloksacin (Körner i sar., 1994). *S. marcescens* poseduje R faktore, specifičan tip plazmida za koje su vezani jedan ili više gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike. Otpornost *S. marcescens* na lekove odnosi se i na aktivnost efluks pumpi. Jedna od prvih opisanih je SdeXY, koja redukuje osetljivost ove bakterije na eritromicin, tetraciklin, norfloksacin, benzalkonijum-hlorid, etidium-bromid, akriflavin i rodamin 6G (James i Sherman, 2005).

U veterinarskoj medicini *Serratia marcescens* je od značaja kao uzročnik mastitisa i infekcija reproduktivnog trakta krava, mastitisa ovaca (Tzora i Fthenakis, 1988), septikemije pilića, a postoji nekoliko izveštaja o infekcijama konja, septikemiji koza, infekcijama egzotičnih ptica i sistemskim infekcijama pasa i mačaka (Das i sar., 1988). Seme bikova može biti izvor infekcije za krave (Das i sar., 1988). *S. marcescens* izaziva infekcije i kod guštera i kornjača (gastroenteritis).

Tokom poslednjih 10 godina u vodama oko obale Floride i u Karipskom moru, nestalo je 90% jedne vrste korala (*Acropora palmata*) zbog bolesti nazvane „bele boginje“ (Slika 6). Bolest je opisana prvi put 1996. godine, a od 2002. je poznato da je uzročnik ove bolesti *S. marcescens* poreklom iz neobrađenog fekalnog otpada humanog porekla (Patterson i sar., 2002). Genetske analize su potvrdile da je soj koji izaziva bolest poreklom iz kanalizacije, a ne iz životnog okruženja ili životinja. Veštačka infekcija humanim sojem *S. marcescens* izazvala je ovu bolest korala za 4-5 dana. Tako je *Serratia marcescens* do danas jedina poznata bakterija poreklom od ljudi koja je uzročnik bolesti okeanskih beskičmenjaka.



Slika 6: „Bele boginje” korala (James W. Porter, University of Georgia)

<http://green.blogs.nytimes.com/2011/08/18/in-the-first-known-case-human-bacteria-kills-coral/>

***S. marcescens* kao etiološki agens mastitisa mlečnih krava**

Do 50-tih godina prošlog veka, *S. marcescens* nije bila poznata kao uzročnik mastitisa mlečnih krava (Barnum i sar., 1958). Danas se zna da mastitis krava mogu izazvati različite vrste iz roda *Serratia*: *S. marcescens*, *S. rubidea* i *S. liquefaciens*, a *S. marcescens* se načešće izoluje (Todhunter i sar., 1991; Bannerman i sar., 2004). Udeo *Serratia* vrsta u etiologiji infekcija mlečne žlezde izazvanih Gram negativnim bakterijama, iznosi oko 9-12% (Bannerman i sar., 2004). Najčešće je broj krava sa *Serratia* mastitisom u zaptima mali, ali prevalenca u pojedinim slučajevima može biti veća od 20% (Di Guardo i sar., 1997). Širenju infekcije doprinosi neblagovremeno otkrivanje inficiranih jedinki koje izlučuju bakterije mlekom i kontaminiraju životnu sredinu, opremu i pribor za mužu.

Izvori infekcije sa *S. marcescens* su raznovrsni, zbog rasprostranjenosti ove bakterije u životnom okruženju, ali se uzročnik može preneti sa krave na kravu i opremom i priborom za mužu (Isaksson i Holmberg, 1984). Ukoliko je infekcija raširena u zapatu, važno je utvrditi njen izvor i uraditi tipizaciju izolovanih sojeva. Identifikacija jednog soja ukazuje na kontagiozni karakter infekcije ili dominaciju jednog soja u okruženju, dok potvrda različitih sojeva *S. marcescens* ukazuje na više različitih izvora. Često izvor infekcije ostane neutvrđen, uprkos ispitivanjima okruženja i opreme za mužu (Wilson i sar., 1990; Ruegg i sar., 1992).

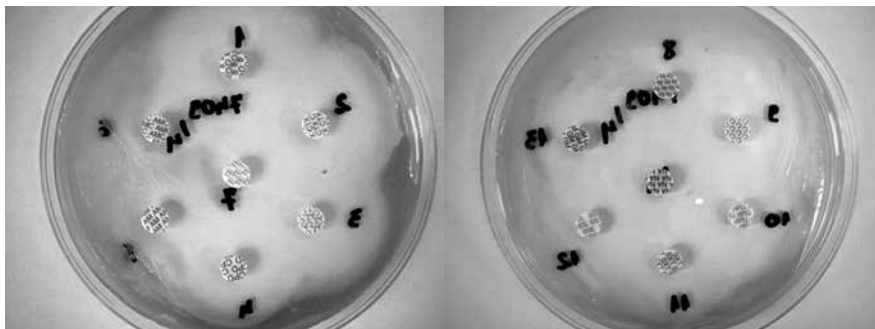
Serratia vrste dospevaju u vime tokom laktacije i u periodu zasušenja (Todhunter i sar., 1991; Ruegg i sar., 1992). U periodu zasušenja, umnožavanju bakterija u mlečnoj žlezdi doprinosi njihov efikasan sistem za deponovanje gvožđa. Krave na početku laktacije imaju nešto veći rizik od nastanka *Serratia* mastitisa zbog stresa i imune supresije karakteristične za postpartalni period. Krave sa visokom mlečnošću nisu pod većim rizikom od nastanka infekcije.

Trajanje i težina kliničkih manifestacija mastitisa izazvanih Gram-negativnim bakterijama, zavisi od sposobnosti imunskog sistema (pre svega neutrofilnih granulocita) da blagovremeno prepozna i ukloni patogene. Neki sojevi *Serratia* produkuju potentan citotoksin specifičan za leukocyte, koji im omogućava zaštitu od fagocitoze. Najčešće infekcije rezultiraju blagim, subkliničkim mastitisom sa promenama u boji i konzistenciji mleka (pahuljice i ugrušci) (Di Guardo i sar, 1997; Ohnishi i sar., 2011; Pinzon-Sanchez i Ruegg, 2011). Klinički slučajevi mastitisa uglavnom nisu praćeni sistemskim znacima infekcije, što ih bitno razlikuje od infekcija izazvanih koliformnim bakterijama. Kod veštačke intramamarne infekcije jedne četvrti vimena, zabeležen je prolazni porast telesne temperature, porast broja somatskih ćelija (prvenstveno neutrofila) i smanjenje mlečnosti prvog dana posle infekcije (Bannerman i sar., 2004). Infekcija je izazvala samo kratkotrajno, prolazno povećanje nivoa

IL8 i C5a u mleku. Porast koncentracije IL8 u mleku kod infekcije sa *S. marcescens*, sličan je onim ustanovljenim kod infekcije sa *E. coli* (Shuster i sar., 1997). Infekcije mlečne žlezde sa *S. marcescens* uglavnom traju više meseci, prosečno duže od 160 dana (Bannerman i sar., 2004). Histološki se zapaža nepurulentni mastitis, proliferacija fibroznog tkiva u hroničnom toku i hiperplastični limfadenitis supramamarnih limfnih čvorova (Di Guardo i sar., 1997).

Među izolatima *S. marcescens* iz mleka krava sa mastitisom dominantni serotipovi su O6 i O5 (Ohnishi i sar., 2011). Većina sojeva ovih serotipova proizvodi pigment, a serotip O6 je najčešći u životnom okruženju. Istraživanja potvrđuju da većina izolata *S. marcescens* iz mleka krava sa mastitisom potiče iz životine sredine, kao i da se oni razlikuju od humanih kliničkih izolata po osetljivosti na antibiotike i fenotipskim karakteristikama. Početkom devedesetih godina, među humanim izolatima *S. marcescens* i *Pseudomonas aeruginosa*, ustanovljeni su sojevi koji proizvode plazmidski posredovane imipenimaze (plazmid-mediated imipenemase (IMP)-1) tip *metallo- β -lactamase* (MBL), ali ovakvi sojevi nisu izolovani iz mleka krava sa mastitisom (Ohnishi i sar., 2011).

Naši izolati *S. marcescens* pokazali su dobru osetljivost na gentamicin (10 μ g), trimetoprim-sulfametoksazol (1,25/23,75 μ g), cefalosporine (cefprozime 10 μ g; ceftazidime 30 μ g; cefotaxime 30 μ g), ciprofloksacin (5 μ g), hloramfenikol (30 μ g), nalidiksičnu kiselinu (30 μ g), streptomycin (10 μ g) i sulfonamide (300 μ g) i rezistenciju na penicilin (10 μ), ampicilin (10 μ g), amoksisiclin-klavulonsku kiselinu (20/10 μ g) i tetraciklin (30 μ g) (Slika 7).



Slika 7. Osetljivost *S. marcescens* na antibiotike
(izolat iz mleka krave sa mastitisom, dr Dubravka Milanov, NIV-NS)

I pored toga što su izolati *S. marcescens* iz mleka krava uobičajeno osetljivi *in vitro* na antibiotike, njihova primena u terapiji mastitisa ne daje zadovoljavajuće rezultate i nije preporučljiva. Znaci poboljšanja se mogu zapaziti, ali je to stanje uglavnom privremeno, a uspeh terapije manji od 14% (<http://ahdc.vet.cornell.edu>). Postoje izveštaji o ograničenom uspehu kod intramamarne

aplikacije sterilnog fiziološkog rastvora. Ovaj tretman menja osmolaritet i pomaže u eliminaciji bakterija iz žlezde (Petersson-Wolfe i sar., 2011). Zbog ograničenog uspeha u tretmanu infekcija, naglasak treba da bude stavljen na prevenciju.

Glavna preventivna mera kod pojave mastitisa izazvanih sa *Serratia* vrstama odnosi se na higijenu držanja krava, čistu i suhu prostirku, bilo da su krave u laktaciji ili u periodu zasušenja. Upotreba neorganske prostirke (pesak) smanjuje broj ovih bakterija u okruženju. Neophodno je otkriti sve inficirane jedinice u zapatu jer one mlekom kontaminiraju prostirku i opremu za mužu. Inficirane krave treba odvojiti i voditi poslednje na mužu. Rastvor za potapanje sisa treba prekontrolisati na kontaminaciju *Serratia* vrstama, jer on može biti izvor infekcije za zdrave krave. Ostatak dezinficijensa koji je korišćen za potapanje sisa, nikada ne treba vraćati u originalno pakovanje i ponovo koristiti kod sledeće muže. Dezinfekciju pribora za mužu ne bi trebalo izvoditi 0,5% chlorhexidin-glukonatom i kvarternim amonijumovim jedinjenjima, jer postoje izveštaji o otpornosti *Serratia* spp. na ove dezinficijense.

Istraživanja u okviru projekta TR 31071: "Istraživanje farmakoloških karakteristika antimikrobnih agenasa, uvođenje novih tehnoloških rešenja i alternativnih metoda profilakse s ciljem da se poboljša kontrola infektivnih oboljenja životinja", finansiranog od Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

1. Ang-Kucuker M., Buyukbaba-Boral O., Tolun V., Torumkuney D., Susever S., Ang O.: Effect of some antibiotics on pigmentation in *Serratia marcescens*. *Zentralbl. Bakteriol.* 289, 781-785, 2000
2. Bannerman D.D., Paape M.J., Goff J.P., Kimura K., Lippolis J.D., Hope J.C.: Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. *Vet. Res.* 35: 681-700, 2004
3. Barnum D.A., Thackeray E.L., Fish N.A.: An Outbreak of Mastitis Caused by *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. Vol. XXII (11), 392-395, 1958
4. Carbonell G.V., Della Colleta H.H.M., Yano T., Darini A.L.C., Levy C.E., Fonseca B.A.L.: Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 28: 143-149, 2000
5. Coria-Jimenez R. and Ortiz-Torres C.: Aminoglycoside resistance patterns of *Serratia marcescens* strains of clinical origin. *J. Epidemiol. Infect.* 112, 125-131, 1994

6. D'Alessio R., Bargiotti A., Carlini O., Colotta F., Ferrari M., Gnocchi P., Isetta A., Mongelli N., Motta P., Rossi A., Rossi M., Tibolla M., Vanotti E.: Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives. *J. Med. Chem.* 43, 2557 – 2565, 2000
7. Das A.M., Paranjape V.L., Pitt T.L.: *Serratia marcescens* infection associated with early abortion in cows and buffaloes. *Epidemiology and Infection.* 101, 143-149, 1988
8. Di Guardo G., Battisti A., Agrimi U., Forletta R., Reitano M.E., Calderini P.: Pathology of *Serratia marcescens* mastitis in cattle. *Journal of veterinary medicine. Series B.* 44, 9, 537-546, 1997
9. Grimont P.A.D., Grimont F.: Genus XXXIV. *Serratia*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Springer, 799-811, 2005
10. Han S.B., Park S.H., Jeon Y.J., Kim Y.K., Kim H.M., Yang K.H.: Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting interleukin-2/R α expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen-induced arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 2, 415-425, 2001
11. Hejazi A., Falkner F.R.: *Serratia marcescens*. Review article. *J. Med. Microbiol.* 46, 903-912, 1997
12. Hines D.A., Saurugger P.N., Ihler G.M., Benedik M.J.: Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* 170, 4141-4146, 1988
13. http://ahdc.vet.cornell.edu/sects/QMPS/Articles/Serratia_mastitis_%20fact_%20Sheet.pdf *Serratia* species and Mastitis - QMPS fact sheet. Cornell University, College of Veterinary Medicine, 2005.
14. <http://www.myfoodpoisoninglawyer.com/2011/03/srratia-marcesens-outbreak-attacks-19-in-alabama-hospitals-tpn-identified-as-source/>
15. Iranshahi M., Shahverdi A.R., Mirjani R., Amin G., Shafiee A.: Umbelliprenin from *Ferula persica* Roots Inhibits the Red Pigment Production in *Serratia marcescens*. *Z. Naturforsch.* 59c, 506-508, 2004
16. Isaksson A., Holmberg O.: *Serratia*-mastitis in cows as a herd problem. *Nord. Vet. Med.* 36, 354-360, 1984
17. James C., Natalie Sherman N.: *Microbiology: a Laboratory Manuel*. 7th edition. Pearson Education. Inc. 2005.
18. Kavitha R., Aiswariya S, Ratnavali C.M.G.: Anticancer activity of red pigment from *Serratia marcescens* in Human cervix carcinoma. *International Journal of PharmTech Research.* 2, 1, 784-787, 2010
19. Körner R.J., Nicol A., Reeves D.S., MacGowan A.P., Hows J.: Ciprofloxacin resistant *Serratia marcescens* endocarditis as a complication of non-Hodgkin's lymphoma. *J Infect.* 29, 1, 73-76, 1994
20. Mekhael R., Yousif Y.S.: The role of red pigment produced by *Serratia marcescens* as antibacterial and plasmid curing agent. In: The 2nd Kurdistan

- Conference on Biological Sciences J. Duhok. Univ. 12, 1, 268-274, 2009
21. Ohnishi M., Sawada T., Hirose K., Sato R., Hayashimoto M., Hata E., Yonezawa C., Kato H.: Antimicrobial susceptibilities and bacteriological characteristics of bovine *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates from mastitis. *Veterinary Microbiology*. Article in press, 2011, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113511003518>.
 22. Petersson-Wolfe C.S., Costello S., Currin J., Virginia Tech: *Serratia* spp.—A Practical Summary for Controlling Mastitis. (<http://www.extension.org/pages/61743/serratia-sppa-practical-summary-for-controlling-mastitis>), 2011
 23. Patterson K.L., Porter J.W., Ritchie K.B., Polson S.W., Mueller E., Peters E.C., Santavy D.L., Smith G.W.: The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral *Acropora palmata*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99, 8725-8730, 2002
 24. Pinzón-Sánchez C., Ruegg P.L.: Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 94, 3397–3410, 2011
 25. Ruegg P.L., Guterbock W.M., Holmberg C.A., Gay J.M., Weaver L.D., Walton R.W.: Microbiologic investigation of an epizootic of mastitis caused by *Serratia marcescens* in a dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, 200, 2, 184-9, 1992
 26. Shuster D.E., Kehrli M.E. Jr, Rainard P., Paape M.: Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. 65, 3286–3292, 1997
 27. Tzora A., Fthenakis G.C.: Mastitis in dairy ewes associated with *Serratia marcescens*. *Small Ruminant Research*, 29 125-126, 1998
 28. Todhunter D.A., Smith K.L., Hogan J.S.: *Serratia* species isolated from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, 74, 1860–1865, 1991
 29. Trias J., Vinas M., Duinea J., Loren J.: Induction of yellow pigmentation in *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54, 12, 3138-3141, 1988
 30. Venil C.K., Lakshmanaperumalsamy P.: An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. *Electronic Journal of Biology*. 5, 3, 49-61, 2009
 31. Vinas M., Loren J.G., Guinea J.: Particulate bound pigment of *Serratia marcescens* and its association with cellular envelopes. *Microbios Lett*. 24: 19-26, 1983
 32. Wilson D.J., Kirk J.H., Walker R.D., Bosworth Q.W.: *Serratia marcescens* mastitis in a dairy herd. *J Am Vet Med Assoc.*, 196, 7, 1102-5, 1990

Primljeno: 15.04.2012.

Odobreno: 20.05.2012.

PLASMID MEDIATED RESISTANCE TO QUINOLONES IN *SALMONELLA*

**Velhner Maja¹, Kozoderović Gordana², Jelesić Zora², Stojanov Igor¹,
Dubravka Potkonjak¹ and Jelena Petrović¹**

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Rumenački put 20, Novi Sad, Serbia

²Institute of Public Health of Vojvodina, Novi Sad

Abstracts

Plasmid mediated resistance to quinolones in *Salmonella enterica* is briefly presented. World wide spread of *qnr* determinants is evident, indicating the necessity for prudent use of antimicrobials in human and veterinary medicine. In discovering plasmid mediated resistance to quinolones antimicrobial resistance monitoring for β -lactam antibiotics is helpful, since their target genes frequently coexist in plasmid. Nevertheless, 100% reliable method for screening of *qnr* determinants has not been discovered. The finding of *qnr* genes and other determinants from the large collection of *Salmonella* isolates in respective national laboratories, in several countries is described. Individual cases of *qnr* positive *Salmonella* from patients, reported in recent years, are also presented.

Key words: plasmid mediated resistance, resistance to quinolones, *Salmonella*

QNR DETERMINANTE KOD SALMONELA

Velhner Maja¹, Kozoderović Gordana², Jelesić Zora², Stojanov Igor¹,
Dubravka Potkonjak¹, Jelena Petrović¹

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

²Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad

Kratak sadržaj

U radu je ukratko opisana plazmidski prenosiva rezistencija na hinolone kod *Salmonella enterica*. Zahvaljujući rasprostranjenosti *qnr* determinanti u svetu, neophodna je pažljiva upotreba antibiotika u humanoj i veterinarskoj medicini. Kako bi utvrdili plazmidski prenosivu rezistenciju, potrebno je da se na *qnr* i ostale determinante testiraju izolati koji su rezistenti na beta laktame, zato što su njihovi ciljni geni često nađeni zajedno na plazmidu. Ipak, 100% siguran metod za detekciju *qnr* gena za sada nije pronađen. U radu je opisan nalaz *qnr* i drugih plazmidski prenosivih gena koji dovode do rezistencije na hinolone, u velikim kolekcijama izolata salmonela iz Nacionalnih laboratorija u nekoliko zemalja. Takođe su opisani individualni slučajevi infekcije *qnr*+ salmonelama kod pacijenata, u zadnjih par godina.

Cljučne reči: plazmidski prenosiva rezistencija, rezistencija na hinolone, *Salmonella*

INTRODUCTION

A brief description of genetic models in resistance transfer was published recently in our Institute (Velhner et al., 2010). Since quinolones are the most commonly used drugs for animals in our country, resistance among enterobacteria is expected. When exposed to quinolones, bacteria respond to the new environment utilizing different defense mechanisms. The target enzyme for quinolones is termed gyrase and it is indispensable for bacterial replication. This enzyme changes the topography of the DNA by unwrapping and breaking DNA strand to prepare the chromosomal material for replication. Gyrase also participates in DNA “packaging” once replication takes place. Quinolones bind to the enzyme precluding the replication and ending the bacterial life cycle. If mutations occur at the quinolone resistance determining region (QRDR) of the genes coding for gyrase subunits, quinolones cannot bind to the DNA/gyrase complex (Robicsek et al., 2006c) resulting in uninterrupted replication and survival of resistant bacteria. Until the mid 1990s it was thou-

ght that such genetic events are the only mechanism of resistance to quinolones, beside intrinsically related inducible mechanisms, mediated by porin loss and overexpression of efflux pump. However, Martinez Martinez and colleagues discovered a novel *qnr* determinant conferring resistance to quinolones from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* in 1994 in the USA. The gene marked *qnrA* was located on a transferable plasmid pMG252 (Martinez Martinez et al., 1998). There is an opinion that *qnr* increases possibility of mutant survival. It is often present in multiple resistant bacteria and subsequently it could facilitate their spread in the environment (Hopkins et al., 2005; Tran and Jacoby, 2002; Robicsek et al., 2006b).

The *qnr*

After the discovery of plasmid mediated resistance to quinolones, the research on biochemical composition and the mode of action of the Qnr protein has started. A transformed referent *E. coli* J53 laboratory strain with the plasmid pMG252 was analyzed by Tran and Jacoby (2002). Utilizing cloning and nucleotide sequence analysis of the transformants, it was discovered that Qnr protein had a nature of pentapeptide repeat family and that it was composed of 218 amino acids. These proteins represent tandem five residue repeats A(D/N)LXX where X could be any amino acid. They have diverse activities and could be found in many bacteria species. The Qnr protein is binding to gyrase holoenzyme and gyrase subunits GyrA and GyrB at the very beginning of the enzyme/DNA interaction. Subsequently, its activity does not require conformational changes of the molecule that occurs if the enzyme binds to ATP, DNA or ciprofloxacin (Tran and Jacoby, 2002; Tran et al., 2005). Several *qnr* determinants have been recognized. The best studied is *qnrA*, but beside it *qnrB* was found in *Citrobacter koseri*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*. The *qnrS* was found for the first time in *Shigella flexneri* isolated in Japan (rev by Nordmann and Poirel, 2005; Jacoby et al., 2006). Amino acid compositions of *qnr* proteins (QnrA, QnrB and QnrS) are different. Their origin is not known, but the sequence derives from the chromosome (Nordmann and Poirel, 2005, Robicsek et al., 2006c). Since they are quite rare among *Salmonella*, intensive survey is needed to find *qnr* determinants. Subsequently, a screening with the participation of a number of public health laboratories in the USA, lead to the discovery of *qnrB* and *qnrS* genes. They were found in isolates of non-typhi *Salmonella* from humans. The strains were collected during the years 1996 to 2003. The MIC to ciprofloxacin was determined for 12.253 isolates of *Salmonella enterica*, and it was estimated that only 0.1% were ciprofloxacin resistant. Among 233 isolates (MIC to CIP

≥ 0.06 $\mu\text{g/mL}$), 10 isolates were *qnr* positive and carried *qnrB2*, *qnrB5*, *qnrS1* and *qnrS2* genes. The isolates had low level resistance to CIP (MIC 0.25 to 0.5 $\mu\text{g/mL}$). This was also the first report on *qnr* from the USA (Gay et al., 2006). The *qnrD* gene was first discovered by Cavaco and coworkers in 2009 (Cavaco et al., 2009). It was identified in *S. Bovismorbificans* and *S. Kentucky* in human isolates from Henan province in China.

Another plasmid mediated resistance determinant termed *aac-6'-lb-cr*, interactive to aminoglycoside antibiotics, also reducing activity of fluoroquinolones, was discovered in clinical isolates of *E. coli* from a hospital in Shanghai-China (Robicsek et al., 2006a). A *qepA* efflux pump gene from a plasmid, mediating resistance to fluoroquinolones was described in *E. coli* by Yamane et al. (2007). It is postulated that *qepA* gene was transferred to *E. coli* from microbes that produce compound or metabolites that are similar to fluoroquinolone. Such microbes may have built the active transporters, to extrude antimicrobials from the cell. It is also possible that the *qepA* gene, rich in GC content, was dissected and integrated to plasmids as a chromosomal fragment from actinomycetes. This observation is also made for the *rmtB* gene, responsible in mediating resistance to aminoglycoside. In *qep* positive *E. coli* the MIC to ciprofloxacin was 0.125 $\mu\text{g/mL}$ for norfloxacin it was 1 $\mu\text{g/mL}$ and for enrofloxacin it was 0.25 $\mu\text{g/mL}$.

The prevalence of *qnr* genes in humans, food and animals

The possibility of worldwide dissemination of *qnr* determinants is of great concern, because plasmid mediated resistance can be easily spread among enterobacteria. Since the overuse of antibiotics facilitates survival and transfer of mobile genetic elements among bacteria, prudent use of antibiotics in humans and animals is necessary.

Research on prevalence and distribution of the *qnr* gene is important. The *qnr* determinants were found in *Enterobacteriaceae* from humans, food and food producing animals, most often if MIC to CIP and NAL is increased, but below current CLSI breakpoint. It was also evident that *qnr* protein facilitates resistance development to quinolones. The *qnr* genes have been found in multiple resistant bacteria and in some cases its appearance was connected with resistance to extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) (Poirel et al., 2005; Robicsek et al., 2006b; Cavaco et al., 2009). Susceptibility to NAL and intermediate resistance to CIP in *Salmonella enterica* is also proposed for the screening of *qnr* determinants by Hopkins et al. (2007). Conferring nontypical quinolone resistance phenotype, *qnr* was discovered also in the absence of mutations on topoisomerase genes (Gunell et al., 2009). To this end there is no reliable way

for searching of all *qnr* determinants and it is possible that some *qnr* positive strains are not likely to be discovered (Cavaco and Aarestrup, 2009). The *qnr* determinants in *Salmonella* are present around the globe and as such pose a risk of therapy failure in patients requiring antibiotic treatment. In developed countries the *qnr* is often connected with foreign travel to countries where resistance to fluoroquinolones is more common or to imported foods (Gay et al., 2006; Hopkins et al., 2008; Taguchi et al., 2009, Sjölund-Karlsson et al., 2010).

For the monitoring on *qnr* in the communities in France, the extended-spectrum β -lactamases positive *Salmonella enterica* were included in the study. Only one out of 17 ESBL isolates were positive for the *qnrA* gene (Cattoir et al., 2007). In the UK, among cefotaxime resistant ($MIC > 1 \mu g/mL$) *Salmonella enterica*, *qnrS* variants were found in serotypes: Stanley, Typhimurium DT193, Virchow PT8 and Virginia (Hopkins et al., 2007). Plasmid dissemination contributed to spread of *qnr* genes and also its transferability could be due to integron like genetic structure (Hopkins et al., 2005). *Qnr* variants (*qnrA1*, *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB5* and *qnrS1*) were found in *Salmonella*, with reduced susceptibility to CIP, in Scotland. A total of 34 isolates out of 70 were *qnr* positive. Most of them were of human origin, 2 isolates was from ovine, 1 isolate from bovine and 1 from the environment. The most common serotype was Corvallis, Typhimurium, Stanley and Enteritidis. Those isolates were *qnrS1* positive. In *S. Virchow* and *S. Stanley* *qnrA1* was found. *S. Colindale* was the *qnrB1* positive, *S. Agona* and *S. Haifa* was *qnrB2* positive while *S. Gaminara* was *qnrB5* positive (Murray et al., 2008). The first occurrence on *qnr* positive *Salmonella* from Taiwan was provided by Wu et al., (2008). They discovered *qnrB2* and *qnrS1* in 4 isolates from the communities in Taiwan. For all isolates MIC to NAL was 32 $\mu g/mL$ while to CIP it ranged from 0.19 to 0.38 $\mu g/mL$. In South Africa invasive *S. Typhimurium* carrying the *qnrB2* gene was found, for the first time, from an immunocompromised patient. MIC to NAL was 32 $\mu g/mL$ and to CIP it was 0.38 $\mu g/mL$ (Govender et al., 2009). The *qnr* genes were found in 6 out of 284 clinical isolates of *Salmonella spp.* in Korea. The *qnr* variants identified were *qnrS1* in four isolates, *qnrB19* in two isolates while one isolate has *aac(6')-lb-cr*. MIC to NAL ranged from 16 to $>512 \mu g/mL$, while to CIP it was 0.06 to 8 $\mu g/mL$. Among *qnr* positive isolates, the mutation in QRDR was found in *S. Kentucky* positive for *qnrS1*. The MIC to CIP was 8 $\mu g/mL$ and amino acid substitution Thr57 $\rightarrow$ Ser was found on *parC* gene (Jeong et al., 2011). The Thr57 $\rightarrow$ Ser substitution is believed to be less involved in resistance to quinolones but as natural compensatory mutation it decreases resistance to fluoroquinolones (rev by Velhner and Stojanović, 2012). In another research from Korea 507 NAL resistant isolates were tested for plasmid mediated resistance determinants and it was shown that *aac(6')-lb* is present in six isolates

from food animals. Four isolates (2 *S. Typhimurium* from pig and from cattle, one *S. Derby* from pork and one *S. Essen* from healthy cattle), was identified as *aac(6')-lb-cr* positive. The obtained MIC to NAL was 512 µg/mL, MIC to CIP was 1 µg/mL and for enrofloxacin it was 1 µg/mL (Tamang et al., 2011). *Salmonella* Typhimurium positive for *aac(6')-lb-cr* was found in stool specimens from pediatric inpatients in Jiangxi Provincial Children's hospital in China. From 62 isolates, 23 were having *aac(6')-lb-cr* gene and MIC to ciprofloxacin ranged from 0.5 to 4 µg/mL. In seven isolates *bla*_{CTX-M} gene was also found and all strains with MIC to CIP ≥ 2 µg/mL had *bla*_{TEM} gene. High level of resistance to CIP was also attributed to point mutations on *gyrA* (codon 87). The authors found clonal relationship among 6 isolates of *S. Typhimurium* carrying *aac(6')-lb-cr* and *bla*_{CTX-M} genes (Yu et al., 2011). In Japan the *qnrS1* and *qnrS2* determinants were found in *Salmonella* isolated from patients who traveled overseas. MIC to NAL was 16 to 64 µg/mL, while to CIP it was from 0.25 to 2 µg/mL. There were no mutations detected on QRDR (Taguchi et al., 2009).

The research on *qnr* resistance determinants was conducted in the USA from the isolates collected in 2007 from humans and also from food producing animals. The *qnr* was found only in human isolates. According to the CLSI breakpoint, these isolates were susceptible to NAL and displayed reduced susceptibility to CIP. Animal isolates were NAL resistant suggesting mutation on QRDR. Two *S. Typhimurium* and 1 *S. Corvalis* were *qnrS1* positive. The *qnrB2* and *qnrB19* was found in *S. Enteritidis* and *S. Beaudesert* respectively. One isolate (*S. Thompson*) was *aac(6')-lb-cr* positive. The prevalence of *qnr* genes in the USA was the same as in previous years (Sjölund-Karlsson et al., 2010). International collaborative study was conducted in 13 European countries to determine *qnr* prevalence in *Salmonella enterica* and *E. coli* in respect to the following breakpoints (MIC to CIP in *Salmonella* ≥ 0.125 and ≥ 0.25 µg/mL), MIC to CIP ≥ 0.06 µg/mL in *E.coli*, and if MIC to NAL was 4-32 µg/mL. The screening method was done in total 66.1629 *Salmonella* sp. and 31.132 *E. coli* isolates. Qnr was identified in 485 *Salmonella* and 133 *E. coli* isolates. The *qnr* genes were found predominantly in *Salmonella* from humans, turkeys, fowls, pigs, sheep, reptiles, food and the environment. The *qnrS1* was the most frequent finding. It was found in *S. Corvallis* and *S. Typhimurium* from human specimens from The Netherlands and UK and *S. Saintpaul* from turkeys from Denmark, Poland and Germany. The *qnrB* was found from turkeys, humans, reptiles and fowls as a following variants: *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB6*, *qnrB7*, *qnrB12* and *qnrB19*. The *Salmonella* isolated from a turtle had *qnrB6* and *acc(6')-lb-cr* determinants. The *qnrD* was prevalently found in poultry isolates from Spain but also from fowls, turkeys and food from Italy and from two human specimens from The Netherlands. The *qnrA1* was evident in chic-

ken isolate of *S. Paratyphi* B variant Java from Belgium and The Netherlands and in *S. Typhimurium* found in turkeys from Germany. *E. coli* was *qnrS1* and *qnrB19* positive and was found in food, turkeys, cattle and pigs mostly from Poland (Veldman et al., 2011). During a survey on nontyphoidal *Salmonella* from chickens, conducted with the contribution of four European countries, Kehreneberg et al. (2006) found *qnrS* gene. The determinant was incorporated in the proximity of Tn3 element. The insertion sequences IS2-like and IS26 were found. It is known that such sequences are responsible for the recombination of some gene clusters or genomic regions in *Enterobacteriaceae*. The evidence was made that Tn3 was incorporated in a plasmid pINF5 in *S. Infantis* independently from *qnrS*. The first report on *qnr* positive *Salmonellae* in the Netherlands was provided by Veldman et al., 2008. A collection of isolates from humans, cattle, poultry, pigs and other, for the period from 1999 to 2006 was analysed. Only one poultry isolate was *qnrB2* positive, while human isolates had *qnrB2*, *qnrB5* and *qnrS1*. The first report on *qnr* determinants in *Salmonella* from Brazil was released by Ferrari et al., 2011. They found *qnrA1* in *S. Enteritidis* epidemic strain and *qnrB19* in *S. Corvallis* from poultry. The MIC to CIP was 0.062 and 0.5 µg/mL respectively.

The *qnr* determinants in *Salmonella* isolates from animals were studied in several countries. A strain collection consisting of *Salmonella* resistant to β -lactam antibiotics, collected from diarrheic calves in Egypt was investigated for resistance mechanisms. The *bla*_{TEM-1} genes conferring resistance to β -lactams were found most frequently, but also other genes: *aadA1* or *aadA2* and *aadA5*, *dfrA1*, *dfrA15* conferring resistance to aminoglycosides and trimethoprim were detected. The *aadA* genes were found mostly in integrons class 1 and in one isolate in integron of class 2. Two *S. Enteritidis* isolates were *qnrS1* positive while one isolate of *S. Typhimurium* was *qnrB* positive. For the first time in Africa an *aac-(6')-Ib-cr* gene was discovered in *S. Enteritidis*. This isolate was additionally positive to *qnrS* (Ahmed et al., 2009). *Salmonella* resistant to β -lactam antibiotics isolated from animals in Japan was found to carry: *bla*_{PSE-1} or *bla*_{TEM}, *aadA2* or *aadA1*. These genes were differently distributed in integrons class 1 but also integrons class 2 was identified. In one isolate of *S. Typhimurium* from diseased beef and in one isolate of *S. Thompson* from healthy chicken the *qnrS1* was found, but resistance to β -lactam antibiotics was not detected. An isolate from diseased dairy cow was found to have *aadA2*, *bla*_{PSE-1} genes and *qnrS1* gene (Ahmed et al., 2009).

Monitoring of plasmid mediated resistance to quinolones is important although it is not as common as chromosomally directed resistance. The *qnr* determinants are more frequently reported from developing countries and in such cases it is usually connected with multiple drug resistance phenotypes.

However, it could be also found in *Salmonella* conferring intermediate resistance to fluoroquinolones. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *qnr* genes is necessary and has to be implemented in Serbia as well.

Acknowledgment:

This work is supported by a grant from the Ministry of Education and Science, Republic of Serbia, Project number TR 31071 and by a grant from the Provincial Secretariat for Science and Technological Development, Project number APV3802/2011-12

REFERENCES

1. Ahmed AM, Ishida Y, Shimamoto T: Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals in Japan. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 402-409, 2009.
2. Ahmed MA, Younis EEA, Ishida Y, Shimamoto T: Genetic basis of multi-drug resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from diarrheic calves in Egypt. *Acta Tropica*, 111, 144-149, 2009.
3. Cattoir V, Weill FX, Poirel L, Fabre L, Soussy CJ, Nordmann P: Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 751-754, 2007.
4. Cavaco LM, Hansen DS, Friis-Møller A, Aarestrup FM, Hasman H, Frimodt-Møller N: First detection of plasmid-mediated resistance (*qnrA* and *qnrS*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans in Scandinavia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 804-805, 2007.
5. Cavaco LM and Aarestrup FM: Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')Ib-cr*, in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and determinations of wild-type distributions. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 2751-2758, 2009.
6. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM: *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 603-608, 2009.
7. Ferrari R, Galiana A, Cremades R, Rodriguez JC, Magnani M, Tognim CB, Oliveira TCRM, Royo G: Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 5, 469-498, 2011.

8. Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett T, Medalla F, Chiller TM, Hooper DC: Plasmid-mediated quinolone resistance in non-typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 297-304, 2006.
9. Govender N, Smith AM, Karstaedt AS, Keddy KH: Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella* from South Africa. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 1393-1394, 2009.
10. Gunell M, Webber MA, Kotilainen P, Lilly AJ, Caddick JM, Jalava J, Huovinen P, Siitonen A, Hakanen AJ, Piddock LJV: Mechanism of resistance in nonthypoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 3832-3836, 2009.
11. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ: Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 358-373, 2005.
12. Hopkins KL, Wootton L, Day MR, Threlfall EJ: Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 1071-1075, 2007.
13. Hopkins KL, Day M, Threlfall EJ: Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica*, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 340-342, 2008.
14. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC: *qnrB*, another plasmid mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1178-1182, 2006.
15. Jeong HS, Kim JA, Shin JH, Chang CL, Jeong J, Cho JH, Kim MN, Kim S, Kim YR, Lee CH, Lee K, Lee MA, Lee WG, Shin JH, Lee JN: Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and mutations in the Gyrase and Topoisomerase IV genes in *Salmonella* isolated from 12 tertiary-care hospitals in Korea. *Microbial Drug Resistance*, 17, 551-557, 2011.
16. Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Michael GB, Schwarz S: Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 18-22, 2006.
17. Martinez Martinez L, Pascuala A, Jacoby GA: Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351, 797-799, 1998.
18. Murray A, Mather H, Coia JE, Brown DJ: Plasmid-mediated quinolone resistance in nalidixic-acid-susceptible strains of *Salmonella enterica* isolated in Scotland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 1153-1155, 2008.

19. Nordmann P and Poirel L: Emergency of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 463-469, 2005.
20. Poirel L, Van De Loo M, Mammeri H, Nordmann P: Association of plasmid-mediated quinolone resistance with extended-spectrum β -lactamase VEB-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 3091-3094, 2005.
21. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC: Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12, 83-88, 2006a.
22. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC: *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2872-2874, 2006b.
23. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC: The world emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 6, 629-640, 2006c.
24. Sjölund-Karlsson M, Howie R, Rickert R, Kruger A, Tran TT, Zhao S, Ball T, Haro J, Pecic G, Joyce K, Fedorka-Cray PJ, Whichard JM, McDermott PF: Plasmid mediated resistance among non-typhi *Salmonella* enterica isolates, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 1789-1791.
25. Taguchi M, Kawahara R, Seto K, Inoue K, Hayashi A, Yamagata N, Kamakura K, Kashiwagi E: Plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella* isolated from patients with overseas traveler's diarrhea in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62, 312-314, 2009.
26. Tamang MD, Nam HM, Kim A, Lee HS, Kim TS, Kim MJ, Jang GC, Jung SC, Lim SK: Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from food animals and humans in Korea. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8, 1199-1206, 2011.
27. Tran JH and Jacoby GA: Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *PNAS*, 99, 5638-5642, 2002.
28. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC: Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 118-125, 2005.
29. Veldman K, van Pelt W, Mevius D: First report of *qnr* genes in *Salmonella* in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 452-463, 2008.
30. Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Cerny T, Escobar CF, Guerra B, Schroeter A, Gutierrez AP, Hopkins K, Myllyniemi AL, Sunde M, Wasyl D, Aarestrup M: International collaborative study on occurrence of plasmid-

- mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1278-1286, 2011.
31. Velhner M, Petrović J, Stojanov I, Ratajac R, Stojanović D: Mehanizmi prenošenja rezistencije kod bakterija. *Arhiv Veterinarske Medicine*, 3, 85-92, 2010.
 32. Velhner M and Stojanović D: Mutational polymorphism in bacterial topoisomerase genes driven by treatment with quinolones. *Point Mutation*, chapter 8, 2012, publisher InTech.
 33. Wu JJ, Ko WC, Chiou CS, Chen HM, Wang LR, Yan JJ: Emergence of Qnr determinants in human *Salmonella* isolates in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 1269-1272, 2008.
 34. Yamane K, Washino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y: New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *QepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 3354-3360, 2007.
 35. Yu F, Chen Q, Yu X, Pan J, Li Q, Yang L, Chen C, Zhuo C, Li X, Zhang X, Huang J, Wang L: High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *aac-(6')-Ib-cr* amongs *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from hospitalized pediatric patients with diarrhoea in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37, 152-155, 2011.

Primljeno: 15.04.2012.
Odobreno: 20.05.2012.

KARDIOVASKULARNI EFEKTI VAZOAKTIVNIH SUPSTANCI U PRODUŽENOJ ANESTEZIJI KOD PASA

Ljubica Spasojević Kosić¹, Dragiša R. Trailović²

¹Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad

²Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Kratak sadržaj

In vivo eksperimenti na anestetisanim životinjama zahtevaju poznavanje uticaja anestezije kako bi se rezultati eksperimenta tačno interpretirali. U ovom radu su ispitani kardiovaskularni efekti vazoaktivnih supstanci (adrenalin, noradrenalin, dimetilfenilpiperazin, acetilholin i histamin) u uslovima produžene šestočasovne anestezije kod pasa. Kardiovaskularni efekti vazoaktivnih supstanci su procenjeni direktnim merenjem arterijskog pritiska, elektrokardiografijom i merenjem diureze. Izrađene su doza-efekat krive za sistolni (SAP) i dijastolni (DAP) arterijski pritisak za sve ispitivane vazoaktivne supstance. Procenjivana je razlika u kardiovaskularnim efektima vazoaktivnih supstanci na početku i na kraju anestezije. Postojala je statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u promeni arterijskog pritiska na početku i kraju produžene anestezije samo za pojedine doze adrenalina i histamina (1 mg/kg i 3 mg/kg). Nije postojala značajna razlika u promeni srčanog ritma na početku i na kraju anestezije. Promene diureze tokom anestezije su zavisile od aplikovane vazoaktivne supstance.

Ključne reči: produžena anestezija, pas, vazoaktivne supstance, kardiovaskularni efekti

¹ E-mail: ljubicask@polj.uns.ac.rs

CARDIOVASCULAR EFFECTS OF VASOACTIVE SUBSTANCES IN PROLONGED ANESTHESIA IN DOGS

Ljubica Spasojević Kosić¹, Dragiša R. Trailović²

¹Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine Novi Sad

²Faculty of veterinary medicine, Belgrade

Abstracts

Knowledge of the influence of anesthesia in anesthetized animals at *in vivo* experiments is essential in order to interpret the results of investigations properly and correctly. In this study we researched cardiovascular effects of vasoactive substances (adrenalin, neopinephrine, dimethylphenylpiperazinium, acetylholin, histamine) in prolonged anesthesia of six hours in dogs. The cardiovascular effects of vasoactive substances were evaluated by direct blood pressure measurement, ecg monitoring and urine output measurement. The dose-effect curve of systolic (SAP) and diastolic (DAP) blood pressure were obtained for each of the vasoactive substances. The differences between cardiovascular effects of vasoactive substances at the beginning and at the end of prolonged anesthesia were tested. There were statistically significant differences ($p < 0.05$) in changes of blood pressure at the beginning and at the end of prolonged anesthesia only for some doses of adrenalin and histamine (1 mg/kg and 3 mg/kg). No significant changes in heart rhythms at the beginning and at the end of prolonged anesthesia were recorded. The urine output during anesthesia depended on applied vasoactive substances.

Key words: prolonged anesthesia, dog, vasoactive substances, cardiovascular effects

UVOD

Ukoliko se eksperimenti na životinjama izvode pod anestezijom, neophodno je uzeti u razmatranje delovanje anestetika prilikom procene rezultata takvih eksperimenata. Osim centralnog efekta depresije nervnog sistema većina anestetika ispoljava i periferne efekte. Idealan anestetik treba da obezbedi, pored postizanja besvesnog stanja, analgezije i mišićne relaksacije, i supresiju nepoželjnih vegetativnih i endokrinih odgovora na hirurški stres, održavanje hemodinamske stabilnosti i podršku vitalnim funkcijama organizma (Hug, 1986). Normalna funkcija autonomnog nervnog sistema zavisi od ravnote-

že simpatikusne i vagusne kontrole, što je neophodno za održavanje hemodinamske homeostaze (Zhang i sar., 2009). Interakcija između simpatikusa i parasimpatikusa (engl. *accentuated antagonism*) se ostvaruje preko kombinacije presinaptičkih i postsinaptičkih mehanizama (Johnson et al., 2009). Zbog svega navedenog eksperimente sprovedene *in vivo* je teže proceniti u odnosu na *in vitro* ispitivanja.

U kontroli i regulaciji funkcija kardiovaskularnog sistema učestvuju brojni mehanizmi koji imaju cilj da obezbede adekvatni krvni pritisak, krvni volumen i protok krvi za sve organe, pri normalnom venskom pritisku. Ovi mehanizmi formiraju tri nivoa kontrole: nervnu, hormonalnu i lokalnu kontrolu (Kittleson, Kienle, 1998). U prethodnom radu je pokazano da produžena anestezija nezavisno od operacije dovodi do statistički i klinički značajnih promena hemodinamskih varijabli kao što su sistolni i srednji arterijski pritisak, srčana frekvencija i diureza (Spasojević Kosić, Trailović, 2011). Cilj ovog rada je da utvrdi da li produžena anestezija menja kardiovaskularne odgovore organizma na aplikaciju vazoaktivnih supstanci, koje deluju kao agonisti receptora simpatikusnog i parasimpatikusnog sistema.

MATERIJAL I METOD RADA

Ispitivanje je sprovedeno na 30 zdravih pasa meleza. Produžena anestezija u trajanju od 6 h postignuta je korišćenjem midazolama, halotana i azotoksidula, na način opisan u prethodnom radu (Spasojević Kosić, Trailović, 2011). Praćenje kardiovaskularnih efekata (arterijski krvni pritisak, srčana frekvencija i elektrokardiogram) tokom anestezije sprovedeno je korišćenjem aparata Dynograph R 411-Beckman i Datoskop 5000. Psi su bili podeljeni u pet grupa (A, B, C, D, E) sa jednakim brojem pasa. Psima grupe A je aplikovan adrenalin hidroklorid (Merck, Darwstadt) u dozama: 0,1 µg/kg; 0,3 µg/kg; 1 µg/kg; 3 µg/kg i 10 µg/kg telesne mase (t.m.). Psima grupe B je aplikovan L-Norepinephrin bitartarate (Serva, Feinbiochemica Heidelberg/ New York) u sledećim dozama: 0,1 µg/kg; 0,3 µg/kg; 1 µg/kg; 3 µg/kg t.m.. Psima grupe C bio je aplikovan DMPP (dimethyl-phenylpiperazinium iodid, Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA) u dozama: 1 µg/kg; 3 µg/kg; 10 µg/kg i 30 µg/kg t.m.. Grupu D su sačinjavali psi kojima je aplikovan acetilholin hlorid (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg/New York) u dozama: 3 µg/kg; 10 µg/kg; 30 µg/kg i 100 µg/kg t.m.. Psima iz grupe E je aplikovan histamin hidroklorid (Merck, Darmstadt) u dozama: 0,1 µg/kg; 0,3 µg/kg; 1 µg/kg; 3 µg/kg i 10 µg/kg t.m.. Vazoaktivne supstance su aplikovane u prvom i šestom satu anestezije. Za sve aplikovane vazoaktivne supstance izrađena je dozno-zavisna kriva arterijskog pritiska za početak i kraj anestezije. Vreme između aplikacije dve

doze je iznosilo 5-10 minuta kod svih vazoaktivnih supstanci, osim u slučaju DMPP-a u dozi od 30 $\mu\text{g/kg}$ t.m., kada je vremenski period iznosio 20 minuta. Aplikacija veće doze vazoaktivne supstance je usledila nakon vraćanja vrednosti arterijskog krvnog pritiska, srčane frekvencije i elektrokardiograma u fiziološko stanje. Kod 12 pasa, kojima su aplikovane različite vazoaktivne supstance, izvršeno je merenje diureze (kateterizacijom mokraćne bešike) na kraju prvog, drugog, četvrtog i šestog časa anestezije.

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ SD. U statističkoj analizi rezultata korišćeni su t-test za zavisne uzorke i analiza varijanse. Za statističku obradu svih rezultata korišćen je programski paket Statistica version 7.0. Vrednosti $p < 0,05$ i $p < 0,01$ su uzete kao statistički značajne.

REZULTATI I DISKUSIJA

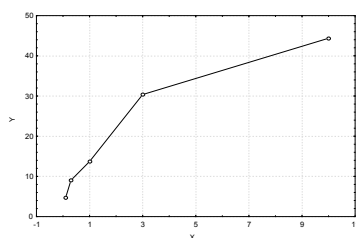
Pri aplikaciji adrenalina, noradrenalina i DMPP-a registrovano je povećanje arterijskih pritisaka (SAP i DAP) na početku i na kraju anestezije. Aplikacijom DMPP-a kod svih pasa javljalo se povećanje, a zatim i dvofazno smanjenje SAP i DAP. Sa povećanjem doza adrenalina, noradrenalina i DMPP-a registrovano je sve veće povećanje arterijskih pritisaka. Ovakva zavisnost nije jedino postojala u slučaju pojedinih doza adrenalina za vrednosti DAP na kraju anestezije. Nakon aplikacije 0,3 $\mu\text{g/kg}$ t.m. adrenalina zabeležena je veća vrednost DAP nego pri sledećoj dozi adrenalina (1 $\mu\text{g/kg}$ t.m.).

Nakon aplikacije acetilholina i histamina registrovano je smanjenje SAP i DAP i na početku na kraju anestezije. Uporedo sa povećanjem doza aplikovanog acetilholina registrovano je sve veće smanjenje SAP i DAP i na početku i na kraju anestezije. Pravilnost doza-efekat krive arterijskog pritiska postojala je samo u slučaju DAP na početku anestezije kod pasa kojima je aplikovan histamin. Smanjenje krvnog pritiska (SAP na početku i na kraju anestezije i DAP na kraju anestezije) je bilo veće pri dozi od 0,1 $\mu\text{g/kg}$ t.m. nego pri dozi 0,3 $\mu\text{g/kg}$ t.m..

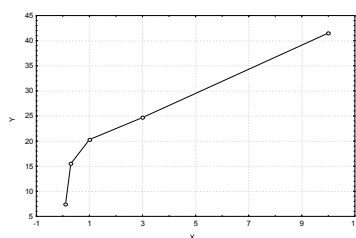
Efekti adrenalina i noradrenalina se ostvaruju preko stimulacije adrenergičnih receptora na srcu i krvnim sudovima (Huang i sar., 1997). Primarni agonista adrenergičnih receptora je noradrenalin. Noradrenalin stimuliše i α i β adrenergične receptore. Na glatkim mišićima krvnih sudova preovlađavaju α_1 -adrenergični receptori, čija stimulacija dovodi do vazokonstrikcije. Vaskularni glatki mišići takođe sadrže β_2 -adrenergične receptore, čija stimulacija dovodi do vazodilatacije, ako su α -adrenergični receptori blokirani. U miokardu preovlađuju β_1 -adrenergični receptori, čija stimulacija dovodi do pozitivno inotropnog efekta. U srcu se nalaze i β_2 -adrenergični receptori i to u znatnom stepenu u sinusnom čvoru, a u manjem stepenu u miokardu komora. Njihov

efekat je pozitivno hronotropan. U miokardu su identifikovani i $\beta 3$ -adrenergični receptori sa efektima smanjenja kontraktilnosti miokarda (Lomasney, Allen, 2001). Acetilholin predstavlja neurotransmiter koji se oslobađa iz svih preganglijskih i postganglijskih vlakana koji pripadaju parasimpatikusu. Nikotinski acetilholinski receptori (nACh) posreduju u signalu na postganglijskom neuronu, dok muskarinski acetilholinski receptori (mACh) posreduju u signalu na nivou parasimpatikusnih ganglija koje se nalaze u blizini ili u okviru efektornog organa (Lindemann, Watanabe, 1995). DMPP se koristi kao stimulator nACh receptora na postganglijskom neuronu. Budući da simpatikusne i parasimpatikusne ganglije dele nACh receptore u ganglijskim sinapsama, aplikacija DMPP će stimulisati simpatikusno posredovanu vazokonstrikciju i tahikariju, izazivajući refleksnu promenu u parasimpatikusnoj aktivnosti, a time i promenu inicijalnog odgovora (Bibevski, Dunlop, 2004). Rezultati ovog istraživanja takođe pokazuju da se kao inicijalna reakcija na aplikaciju DMPP kod svih pasa javilo povećanje SAP i DAP, nakon čega je usledilo dvofazno smanjenje. Muskarinski acetilholinski receptori se nalaze raspoređeni u glatkim mišićima, srčanom mišiću, egzokrinim žlezdama i neuronima centralnog i perifernog nervnog sistema. Pet receptorskih subtipova je determinisano (M_1 - M_5), pri čemu je M_2 receptor odgovoran za efekte parasimpatikusa na kardiovaskularnu funkciju (Bonner i sar., 1987; Choppin, Eglen, 2001; Olshansky i sar., 2008). Histaminski receptori su klasifikovani u četiri subtipa (H_1 , H_2 , H_3 , H_4) (Hill i sar., 1997; Levi, Smith, 2000; Jiang i sar., 2008). Histamin ispoljava značajan vazodepresorni odgovor, direktno preko H_1 i H_2 receptora, pri čemu odgovor i uključivanje histaminskih receptora zavisi od vremena (Harvey, Owen 1984). H_3 receptor, pored autoreceptorske uloge u histaminergičnim neuronima, deluje kao inhibitorni heteroreceptor za adrenergične nervne završetke (Levi, Smith, 2000).

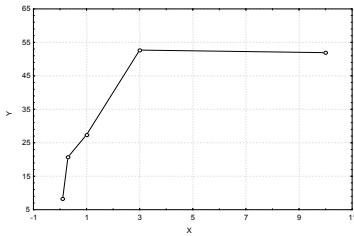
Grafik 1. Krive povećanja / smanjenja sistolnog (SAP) i dijastolnog (DAP) arterijskog pritiska (y osa) pri aplikaciji korišćenih doza vazoaktivnih supstanci (adrenalin, noradrenalin, DMPP, acetilholin, histamin) (x osa)



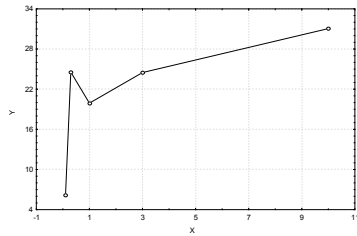
Adrenalin SAP početak anestezije



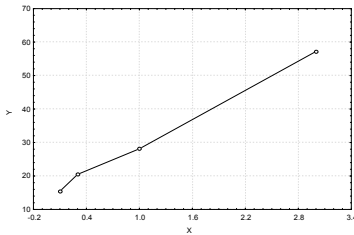
Adrenalin SAP kraj anestezije



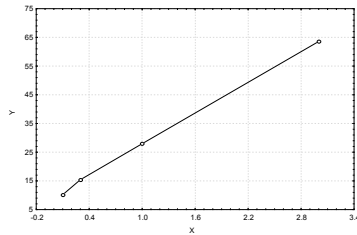
Adrenalin DAP početak



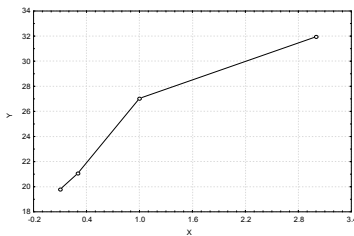
Adrenalin DAP kraj



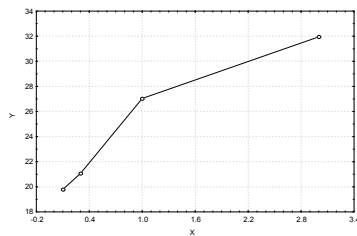
Noradrenalin SAP početak anestezije



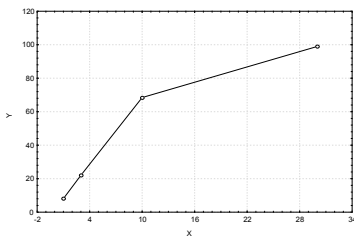
Noradrenalin SAP kraj anestezije



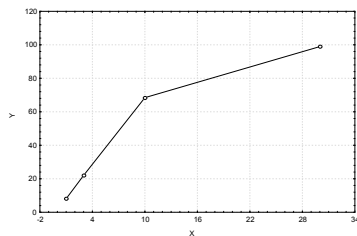
Noradrenalin DAP početak anestezije



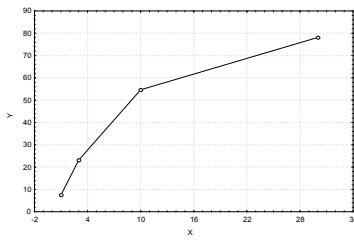
Noradrenalin DAP kraj anestezije



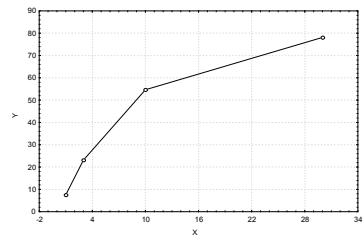
DMPP SAP početak anestezije



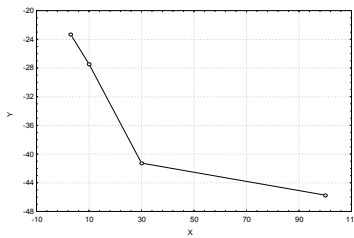
DMPP SAP kraj anestezije



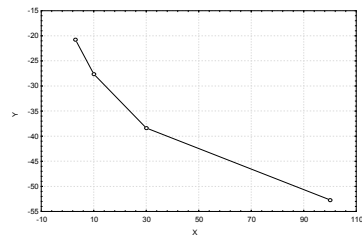
DMPP DAP početak anestezije



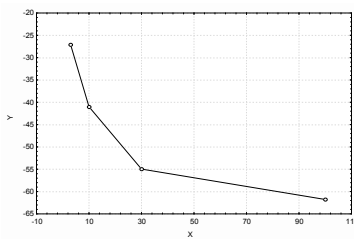
DMPP DAP kraj anestezije



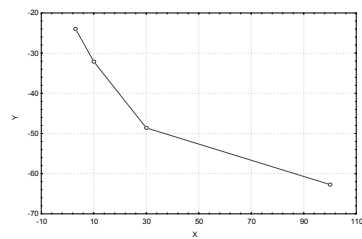
Acetilholin SAP na početku



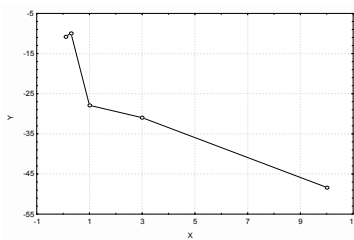
Acetilholin SAP na kraju



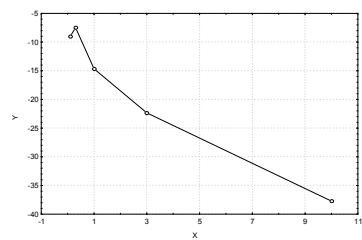
Acetilholin DAP na početku



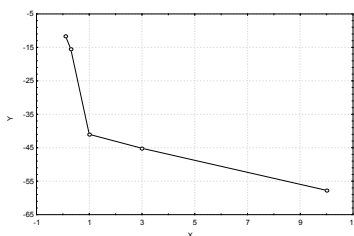
Acetilholin DAP na kraju



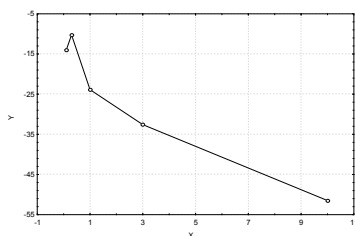
Histamin SAP na početku



Histamin SAP na kraju



Histamin DAP na početku



Histamin DAP na kraju

Promene arterijskog pritiska na početku i na kraju anestezije su se značajno razlikovale ($p < 0,05$) u slučaju aplikacije pojedinih doza adrenalina i histamina (adrenalin u dozi od 1 $\mu\text{g/kg}$ t.m. za SAP, adrenalin u dozi od 3 $\mu\text{g/kg}$ t.m. za DAP, histamin u dozi od 1 $\mu\text{g/kg}$ t.m. za SAP i DAP, histamin u dozi od 3 $\mu\text{g/kg}$ t.m. za DAP). Pri većim dozama aplikovanog adrenalina i histamina javile su se veće individualne razlike u reagovanju na aplikovane vazoaktivna supstance, na šta ukazuju veće vrednosti standardnih devijacija pri visokim dozama nego pri malim dozama. U slučaju aplikacije ostalih vazoaktivnih supstanci (noradrenalin, DMPP, acetilholina) nije postojala statistički značajna razlika u promeni arterijskog pritiska na početku i na kraju anestezije.

Tabela 1. Procentualno povećanje SAP i DAP pri aplikaciji adrenalina na početku i na kraju anestezije

Doze ($\mu\text{g/kg}$)	SAP		DAP	
	Početak ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Kraj ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Početak ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Kraj ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
0,1	4,77 $\pm$ 4,69	7,43 $\pm$ 3,09	8,26 $\pm$ 7,18	6,12 $\pm$ 6,80
0,3	9,08 $\pm$ 5,39	15,53 $\pm$ 4,88	20,73 $\pm$ 13,88	24,53 $\pm$ 14,02
1	13,75 $\pm$ 8,03	20,34 $\pm$ 10,14*	27,40 $\pm$ 8,33	19,89 $\pm$ 8,87
3	30,41 $\pm$ 13,66	24,73 $\pm$ 11,53	52,7 $\pm$ 11,54	24,46 $\pm$ 11,62*
10	44,42 $\pm$ 22,4	41,56 $\pm$ 15,52	51,93 $\pm$ 18,20	31,03 $\pm$ 17,17

* $p < 0,05$

Tabela 2. Procentualno smanjenje SAP i DAP pri aplikaciji histamina na početku i na kraju anestezije

Doze ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SAP		DAP	
	Početak ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Kraj ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Početak ($\bar{x} \pm \text{SD}$)	Kraj ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
0,1	-10,76 $\pm$ 9,98	-9,04 $\pm$ 4,77	-11,60 $\pm$ 9,60	-14,10 $\pm$ 4,43
0,3	-9,92 $\pm$ 6,18	-7,50 $\pm$ 4,62	-15,51 $\pm$ 9,46	-10,32 $\pm$ 6,59
1	-27,89 $\pm$ 7,64	-14,69 $\pm$ 5,01*	-40,99 $\pm$ 16,60	-23,96 $\pm$ 11,13*
3	-30,97 $\pm$ 8,09	-22,37 $\pm$ 8,68	-45,16 $\pm$ 13,89	-32,67 $\pm$ 13,96*
10	-48,35 $\pm$ 21,74	-37,76 $\pm$ 19,46	-57,74 $\pm$ 22,93	-51,57 $\pm$ 20,13

* $p < 0,05$

Promena srčanog ritma koje su se javile pri aplikaciji vazoaktivnih supstanci na početku i na kraju anestezije bile su istog tipa. Kod većine pasa kojima je aplikovan adrenalin, aritmogenični efekat se javljao pri dozi od 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m., osim u slučaju psa br. 4, kod koga su se promene na EKG-u mogle zapaziti pri aplikaciji doze od 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. adrenalina. Nije postojala razlika u aritmogeničnom efektu adrenalina na početku i na kraju anestezije. Praćenje EKG-a pri aplikaciji različitih doza adrenalina ukazuje na aritmogenične efekte adrenalina pri dozi od 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m., što je u suprotnosti sa tvrdnjama o aritmijijskoj dozi adrenalina od 2,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m./min (Sumikawa i sar., 1983) i 8,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ t.m. (Bednarski, Muir, 1990) tokom anestezije halotanom. Razlike se mogu objasniti izborom anestetika korišćenih za izazivanje anestezije kod pasa u našem ispitivanju i u ispitivanju pomenutih autora. Postsinaptički $\alpha 1$ adrenergični receptori u miokardu (a u manjem stepenu i $\beta 1$ adrenergični receptori) su odgovorni za osetljivost miokarda na aritmogenične efekte kateholamina (Maze, Smith, 1983). Između aplikacije vazoaktivnih supstanci, tj. tokom trajanja anestezije javile su se pojedinačne ventrikularne ekstrasistole (VPC) ili VPC u paru (kod pasa 4, 15, 16), supraventrikularni prevremeni kompleksi (kod pasa 3 i 5) i AV blok drugog stepena tip 2 (kod pasa 1, 3, 4, 5, 14, 15 i 16). Kao i u slučaju prvog oglada, aritmije tokom anestezije su se javljale povremeno i nisu imale većeg kliničkog značaja.

Promene diureze tokom anestezije zavisile su od aplikacije različitih vazoaktivnih supstanci. Diureza na kraju četvrtog sata anestezije se statistički značajno razlikovala između grupa pasa, kojima su aplikovane različite vazoaktivne supstance. Produžena anestezija dovela je do naglog pada diureze

posle drugog sata anestezije, adekvatna perfuzija bubrega nije postojala, što je rezultiralo pojavom oligurije i anurije. Činjenica da aplikacija različitih vazoaktivnih materija značajno utiče na diurezu u periodu trećeg i četvrtog časa anestezije, ukazuje na značaj ovog perioda za hemodinamsku homeostazu organizma tokom anestezije. U prethodnom ispitivanju je pokazano da diureza zavisi od SAP i SF (Spasojević Kosić, Trailović, 2011), pa se shodno tome smanjenje diureze može objasniti smanjenjem arterijskog pritiska pri aplikaciji vazoaktivnih supstanci. Smanjenje diureze je naročito izraženo pri aplikaciji histamina zbog jakog vazodepresornog dejstva.

Tabela 3. Diureza (ml/kg/h) pasa kojima su na početku i na kraju anestezije aplikovane vazoaktivne supstance.

Podgrupe	Parametar	Diureza tokom anestezije (ml/kg/h)			
		1h	2h	4h	6h
Adrenalin	$\bar{x}$	2,25	1,557	0,51**	0,24
	SD	0,50	0,52	0,17	0,35
DMPP	$\bar{x}$	2,05	1,04	0,13**	0,01
	SD	0,24	0,52	0,09	0,02
Ach	$\bar{x}$	1,99	1,28	0,18**	0,04
	SD	0,69	0,22	0,03	0,05
Histamin	$\bar{x}$	1,67	0,67	0,00**	0,00
	SD	0,00	0,00	0,00	0,00
Sve podgrupe	$\bar{x}$	2,05	1,22	0,23**	0,08
	SD	0,46	0,45	0,20	0,18

(F=10,536; p= 0,003749) ** p<0,01

Dobijeni rezultati doprinose definisanju produžene anestezije kao eksperimentalnog modela. Osnovni nedostatak ovog ispitivanja je mali broj životinja u eksperimentu. Iako je zadovoljen statistički minimum, dobijeni rezultati su

sa velikom vrednostima standardne devijacije, naročito pri aplikaciji visokih doza vazoaktivnih supstanci. Dalja ispitivanja treba da otkriju rezultate kardiovaskularnih efekata u uslovima produžene anestezije korišćenjem selektivnih agonista i antagonista receptora autonomnog nervnog sistema.

ZAKLJUČAK

Produžena anestezija sa midazolamom, halotanom i azotoksidulom ne menja kardiovaskularne efekte adrenalina, noradrenalina, dimetilfenilpiperazina, histamina i acetilholina kod pasa. Smanjenje diureze tokom produžene anestezije kod pasa je pod uticajem aplikovanih vazoaktivnih supstanci.

LITERATURA

1. Bednarski R. M., Muir W. W. : Ventricular arrhythmogenic dose of epinephrine in dogs and cats anesthetized with tiletamine/zolazepam and halothane. *Am J Vet Res*, 51, 9, 1468 – 1470, 1990
2. Bibevsky S., Dunlop M.E.: Prevention of diminished parasympathetic control of the heart in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287, 1780 – 1785, 2004
3. Bonner T. I., Buckley N. J., Young A. C., Brann M. R.: Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor. *Science*, 237, 527 – 532, 1987
4. Choppin A., Eglen R. M.: Pharmacological characterization of muscarinic receptors in dog isolated ciliary and urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmac*, 132, 835–842, 2001.
5. Harvey C. A., Owen D. A. A.: Cardiovascular studies with SK&F93319, an agonist of histamine at both H1- and H2- receptors. *Br J Pharmac*, 83, 427 – 432, 1984
6. Hill S. J., Ganellin C. R., Timmerman H., Schwartz J. C., Shankley N. P., Zoung J. M., Schunack W., Levi R., Haas H. L.: International union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev*, 49, 253 – 278, 1997
7. Huang R. R. C., Rapoport D., Schaeffer M. T., Cascieri M. A., Fong T. M.: Molecular cloning of the dog β_1 and β_2 adrenergic receptors. *Journal of receptors and signal transduction*, 17, 4, 599 – 607, 1997
8. Hug C.C. Jr.: The heart and anesthesia. In: Hurst J.W. et al. (editors) *The heart, arteries and veins*, 6th edition, McGraw-Hill, New York, 1986, 1494 - 1452
9. Jiang W., Lim H. D., Zhang M., Desai P., Dai H., Colling P. M., Leurs R., Thurnmond R. L.: Cloning and pharmacological characterization of the dog histamine H4 receptor. *European Journal of pharmacology*, 592, 26 - 32, 2008

10. Johnson J. O., Grecu L., Lawson N. W.: Autonomic nervous system. In: Barash P. G. et al. (editors) *Clinical Anesthesia*, Lippincott Williams & Wilkins, 2009, pages 326 - 369
11. Kittleson M.D., Kienle R.D.: Normal clinical cardiovascular physiology. In: Kittleson M.D., Kienle R.D. (editors): *Small animal cardiovascular medicine*, Mosby, St. Louis, 1998, 11 - 36
12. Levi R., Smith N. C. E.: Histamine H3 receptors: a new frontier in myocardial ischemia. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, 292, 825 - 830, 2000
13. Lomasney J. W. Allen L. F.: Adrenergic receptors in the cardiovascular system. In Sperelakis N. et al. (editor): *Physiology and pathophysiology of the heart*, 4th ed., Kluwer, Boston, 2001, 599 - 609
14. Linderman J. P., Watanabe A. M.: Mechanism of adrenergic and cholinergic regulation of myocardial contractility. In: Sperelakis N. et al. (editor): *Physiology and pathophysiology of the heart*, 3rd ed., Kluwer, Boston, 1995, 559 - 563
15. Maze M., Smith C. M.: Identification of receptor mechanism mediating epinephrine-induced arrhythmias during halothane anesthesia in the dog. *Anesthesiology*, 59, 4, 322 - 326, 1983
16. Olshansky B., Sabbah H. N., Hauptman P. J., Colucci W. S.: Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. *Circulation*, 118, 863 - 871, 2008
17. Spasojević Kosić Lj., Trailović D. R.: Kardiovaskularni poremećaji indukovani produženom anestezijom kod pasa. *Arhiv veterinarske medicine*, 4, 1, 31 - 45, 2011
18. Sumikawa K., Ishizaka N., Suzaki M.: Arrhythmogenic plasma levels of epinephrine during halothane, enflurane and pentobarbital anesthesia in the dog. *Anesthesiology*, 58, 322 - 331, 1983
19. Zhang Y., Popović Z. B., Bibevski S., Fakhry I., Sica D. A., Van Wagoner D. R., Maygalev T. N.: Chronic vagus nerve stimulation improve autonomic control and attenuates systemic inflammation and heart failure progression in a canine high-rate pacing model. *Circulation Heart Failure*, 2, 692 - 699, 2009

Primljeno: 15.04.2012.

Odobreno: 20.05.2012.

PUNKCIJA EPIDIDIMISA NERASTA U CILJU DIJAGNOSTIKE BRUCELOZE SVINJA

**Rogožarski Dragan¹, Dobrosavljević Ivan¹,
Đuričić Bosiljka², Milanov Dubravka³**

¹Veterinarski specijalistički institut, Požarevac

²Fakultet veterinarske medicine, Beograd

³Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

Kratak sadržaj

Na prostoru Srbije, najčešće u regionima koje se prostiru uz reku Dunav, Mlavu i Moravu, javlja se bolest kod ekstenzivno držanih svinja, u narodu poznata kao „rednja“. Pobacuju krmače u celom zaseoku ili selu jer je vršen prirodan pripust jednim nerastom koji je oboleo od bruceloze. Programom mera je predviđena kontrola priplodnih nerastova na brucelozu dva puta godišnje, ali se u ovim ekstenzivnim uslovima nerast ne pregleda jer i nije prijavljen. Prouzrokiivač je tek nedavno izolovan, a tipizacijom je potvrđena *Brucella suis* biotip 2(7). Vlasnici ne prijavljuju pobačaje jer smatraju da su se svinje mehanički povredile prilikom hranjenja i pojenja. Kada je veterinar pozvan može da postavi sumnju na brucelozu. Simptomi ove bolesti su nespecifični i tek kod pobačaja ili otoka testisa nerasta može se posumnjati na brucelozu. Bruceloza svinja se može dijagnostikovati: kliničkim pregledom, izolacijom, identifikacijom i tipizacijom uzročnika, serološkim pregledom i biološkim ogledom. Uzorkovanje krvi je najčešće u slučaju pobačaja radi serološke kontrole na brucelozu, uz dostavljanje pobačenih plodova ili posteljice radi izolacije uzročnika. U literaturi se kao najvažniji uzorci za bakteriološki pregled, pored navedenih, navode mandibularni, retrofaringealni i supramamarni limfni čvorovi, seme nerasta, odnosno testisa posle kastracije. Svi ovi uzorci se ne mogu uzeti kod neblagovremene prijave pobačaja. Ostaje samo krv za serološki pregled. Međutim, u literaturi se ne pominje nigde punktati epididimisa kao mogući značajan uzorak za bakteriološki pregled koji se pored uzorkovanja krvi može dobiti od žive životinje. Fiksiranjem nerasta radi uzorkovanja krvi omogućava se i uzimanje punktata epididimisa iz koga se može izolovati *Brucella suis*. Posle dezinfekcije vrši se ubod sterilnom iglom do 1 cm dubine a zatim vrši aspiracija sadržaja 1-2 ml. Ponekad se pojavi sukrvica koja ne ometa

¹ E mail: rogozdragan@gmail.com

ispitivanje. Materijal se može zamrznuti i ispitati kada za to postoje uslovi i adekvatna laboratorija. Punktat epididimisa se preporučuje kao bezbedan i pouzdan način za uzimanje uzoraka obolele životinje za izolaciju i identifikaciju *Brucella suis* biotip 2. U toku bakteriološkog ispitivanja punktata epididimisa ustanovljeno je da rast *Brucella suis* nije ometan drugim bakterijskim vrstama.

Ključne reči: *Brucella suis*, epididimis, nerast, punkcija

PUNCTURE OF BOAR'S EPIDIDYMISS FOR DIAGNOSING PORCINE BRUCELLOSIS

**Rogožarski Dragan¹, Dobrosavljević Ivan¹,
Đuričić Bosiljka², Milanov Dubravka³**

¹Veterinarski specijalistički institut, Požarevac

²Faculty of Veterinary Medicine, Beograd

³Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad

Abstracts

In Serbia, mostly along the Danube, Morava and Mlava rivers, in animals reared under extensive conditions a disease named "rednja" may be detected. In the settlements where abortion is diagnosed all the sows mate with one boar that is infected with brucellosis. The Veterinary Program designs the control of Brucellosis twice a year, but the boars raised in extensive system are not controlled and they are not registered. The causative agent was only recently isolated, confirmed and typed as *Brucella suis* biotype 2 (7). The owners have not reported the cases of abortion because they had thought that the reason are mechanical injuries that occur during feeding and drinking. After the visit of a vet a suspicion of brucellosis is notified. The symptoms of this disease are nonspecific. Only after abortion and if the swelling of boar scrotum occurs Brucellosis can be suspected. Brucellosis can be diagnosed in pigs by clinical examination, isolation, identification and typing of pathogens, serological and biological examination. Blood sampling is usually done in the case of abortion for serology examination, and also the placenta or aborted foetus is used for determining the cause. In addition to the above mentioned, the most important samples for bacteriological examination are the mandibular, retropharyngeal and suprarenal lymph nodes, boar semen, i.e. testis after castration. All these samples

¹ E mail: rogozdragan@gmail.com

cannot be taken when the reports on abortion are untimely. This means, only blood samples for serological examination can be taken. However, the literature does not mention epididymal puncture as a possible sample that is important for bacteriological examination, in addition to blood sampling from live animals. When the boars are fixed for blood sampling, the puncture of the epididymis can also be carried out for isolation of *Brucella suis*. After the disinfection, a sterile needle is stitched about 1 cm in depth and about 1-2 ml of the content is aspirated. Occasional sanies does not interfere the testing. The material can be frozen and examined when there the conditions are favourable and the laboratory available. Epididymal puncture is recommended as a safe and reliable way of sampling the diseased animals for the isolation and identification of *Brucella suis* biotype 2. During the bacteriological examination it was found that other bacterial species did not affect the growth of *Brucella suis*.

Keywords: *Brucella suis*, epididymis, boar, puncture

UVOD

Na prostoru Srbije, najčešće u regionima koje se prostiru uz reku Dunav, Mlavu i Moravu, dokazano je serološki postojanje bruceloze svinja, ali je pro-uzrokivač tek nedavno izolovan i tipizacijom potvrđen kao *Brucella suis* biotip 2(7). Ova bolest je u narodu poznata kao „rednja“, kada pobacuju svinje u celom zaseoku ili selu, jer je vršen pripust istim zaraženim nerastom. Kada veterinar slučajno sazna za problem, krmača je već zaklana. Nerast se kastrira, a bolest perzistira. U navedenim regionima često se priplodne svinje drže paš-no ili u šumi te je moguć kontakt sa mnogim drugim svinjama, ali i sa divljim (5). Bruceloza svinja se može dijagnostikovati kliničkim pregledom, izolacijom, identifikacijom i tipizacijom uzročnika, serološkim pregledom i biološkim ogledom. Poznata je činjenica da se bolest kod životinja ne manifestuje patognomoničnim kliničkim znacima. To predstavlja veliki problem u dijagnostici bruceloze, što često može dovesti i do grešaka. Simptomi ove bolesti su nespecifični i tek kod pobačaja ili orchitisa nerasta može se posumnjati na brucelozu. Pouzdana dijagnoza se postavlja jedino izolovanjem i identifikacijom uzročnika *B. suis* (6). U slučaju pobačaja obavezna je serološka kontrola na brucelozu uz dostavljanje pobačenih plodova ili posteljice. Serološki pregled je zbog unakrsnih reakcija nedovoljan za postavljanje konačne dijagnoze (naročito u početku bolesti). U malim zaptima svinja (1-5 grla) ove mere se najčešće izbegavaju, u slučaju pobačaja veterinar se ne obavesti, a materijal ne dostavlja na ispitivanje. Mali zapati svinja (koji su u Srbiji najčešći) ne kontrolišu se ni serološki a predstavljaju mogući izvor zaraze.

U literaturi se kao najvažniji uzorci za bakteriološki pregled navode mandibularni, retrofaringealni i supramamarni limfni čvorovi. Često se koristi i krv iz koje se mogu izolovati uzročnici u akutnoj fazi bolesti. Najčešće se preporučuje uzorkovanje: delova posteljce, pobačenih plodova, vaginalni i prepucijalni bris, kao i seme nerasta, odnosno testisa posle kastracije. Bakteriološki pregled sadržaja otečenih zglobova, apscesa i sl. može nam pomoći u postavljanju dijagnoze (1, 2) (2005). Takođe je dokazano da se kod infekcija biotipom 1 *B. suis* bakteriološkim pregledom malog uzorka limfnih čvorova dobija isti broj pozitivnih rezultata kao i kod serološkog pregleda (4).

Međutim, u literaturi se nigde ne pominje punktat epididimisa kao mogući značajan uzorak za bakteriološki pregled koji se pored uzorkovanja krvi može dobiti od žive životinje.

CILJ RADA

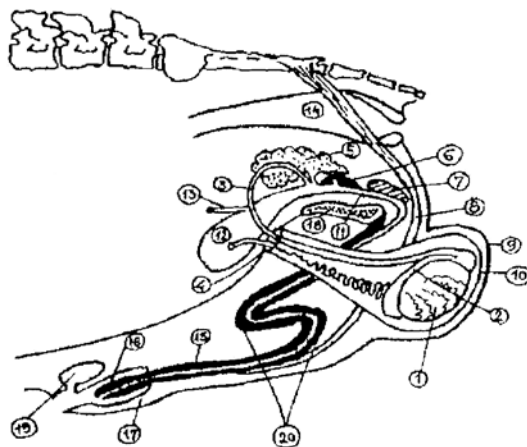
1. da se prikaže punkcija epididimisa nerasta kao jedna od novih metoda uzorkovanja materijala od živih životinja;
2. da se prikaže način izolacije i identifikacije uzročnika bruceloze svinja primenom bakterioloških metoda.

MATERIJAL I METOD RADA

Poznato je da se bruceloza svinja najčešće širi direktnim kontaktom, odnosno prirodnim parenjem (7). Uzročnik bruceloze (*Brucella suis* biotip 2) prisutan je u semenu nerasta već 14 dana po infekciji (7).

Za prikupljanje uzoraka semena iz testisa vrši se punkcija epididimisa. Punkcija epididimisa nerasta vrši se posle pripreme neophodnog materijala: sredstvo za dezinfekciju – povidon jod, sterilni tupferi gaze i vate, sterilan plastični špric od 2-5 ml, sterilne igle za punkciju promera veličine od 1,8 do 2,0. Pre punkcije epididimisa neophodno je izvršiti pripremu mesta punktiranja. Posle fiksiranja nerasta užeatom za gornju vilicu od strane jednog pomoćnika, drugi pomoćnik prihvata levom rukom rep, diže ga gore, a potom desnom rukom prihvata testis u distalnom delu, snažno ga potiskuje gore te dolazi do ispupčenja u proksimalnom delu kranijalno gde se jasno uočava *caput epididymis* (Slika 1, 2 i 3). Posle dezinfekcije vrši se ubod sterilnom iglom do 1 cm dubine, a zatim vrši aspiracija sadržaja. Ponekad se pojavi sukrvica koja ne ometa ispitivanje.

Slika 1. Šematski prikaz položaja polnih organa nerasta (8).



1. Testis; 2. epididimis; 3. semevod; 4. ingvinalni kanal; 5. vezikularne žlezde; 6. prostata; 7. bulbouretralne žlezde; 8. musculus retractor penis; 9. scrotum; 10. tunica vaginalis communis; 11. uretra; 12. mokraćna bešika; 13. ureter; 14. rectum; 15. penis; 16. glans penis; 17. prepuce; 18. sinfiza pelvis; 19. prepucialna burza; 20. flexura sigmoidea penis.



Slika 2, 3. Punkcija epididimisa nerasta.

Dovoljno je 1-2 ml materijala. Posle vađenja igle sterilnom gazom natopljenom povidon jodom vrši se dezinfekcija, a materijal u špricu ili sterilnoj ependorf epruvetici dostavlja laboratoriji na ispitivanje. Metod uzorkovanja i dostavljanja uzorka na pregled je vrlo bezbedan uz nužne osnovne mere zaštite i pažnje.

BAKTERIOLOŠKI PREGLED MATERJALA

Bakteriološki pregled sastoji se od: mikroskopskog pregleda materijala, zasejavanja materijala ezom na odgovarajuće hranljive podloge i identifikacije uspešno izolovanih kultura *Brucelle suis*. Ovom metodom se vrlo često ne dobijaju pozitivni nalazi, pa iz iskustva predlažemo metod zasejavanja Instituta u Zagrebu. Oni preporučuju zamrzavanje uzorkovanog materijala pre zasejavanja. Pre zasejavanja se sadržaj ependorfa ili plastičnog šprica odmrzne, stavi se u kesu za „stomaher“ sa po 5 ml fiziološkog rastvora. Homogenizacija se vrši „stomaher“-om. Po 1 ml homogenata se uzima iz kese i zasejava utrljavanjem i razmazivanjem na hranljivim podlogama u duplikatu (krvni agar, brucella agar i Farelova selektivna podloga). Ploče se zasejavaju i stavljaju u termosta na temperaturu od 37° C na normalnom atmosferskom pritisku sa 5-10% ugljen dioksida. Rast kolonija se kontroliše svakodnevno, a obično je vidljiv posle 3-7 dana.



Slika 1.2. *Brucella suis* biotip 2. VSI Požarevac, na Farelovoj podlozi

ZAKLJUČAK

Punktat epididimisa se preporučuje kao bezbedan i pouzdan uzorak od obolele životinja za izolaciju i identifikaciju *Brucella suis* biotip 2.

U toku bakteriološkog ispitivanja punktata epididimisa ustanovljeno je da rast *Brucele suis* nije ometan drugim bakterijskim vrstama.

LITERATURA:

1. Alton, G. G.: *Brucella suis*. In: Animal Brucellosis, Boca Raton: Fla. CRC Press, str. 411-423, 1990.
2. Alton G.G., Jones M., Angus Lois R.D., Verger J.M.: Techniques for the Brucellosis laboratory, Paris: INRA, 1988.
3. Bacterial infections caused by Gram-negative bacilli. Enterobacteriaceae. In: The Merck Manual, 17th ed. Edited by M.H. Beers and R. Berkow. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., 1999. <http://www.merck.com/pubs/mmanual/section13/chapter157/157d.htm>, 8. Novembar 2002.
4. Corbel M.J., Gill K.P.W., Thomas E.L.: Methods for identification of *Brucella*, Ministry of agriculture, fisheries and food UK - Research Section diseases of Breeding Department Central Veterinary Laboratory Weybridge, 1983.
5. Cvetnic, Ž., Mitak M., Ocepek M., Lojkic M., Terzic S., Jemersic L., Humski A., Habrun B., Šoštaric B., Brstilo M., Krt B., Garin-Bastuji B.: Wild boars (*Sus scrofa*) as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. *Acta Vet. Hung.* 51,465-573.76, 2003.
6. Nagl, T., Hajsig M., Madić J., Pinter Lj.: Veterinarska mikrobiologija. Zagreb: Veterinarski fakultet, 2005.
7. Rogožarski D.: Patogeneza i dijagnostika *Brucella suis* biotip 2, dok. disertacija, Novi Sad: Poljoprivredni fakultet, 2009.
8. Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R.: Clinical veterinary Microbiology, Wolf Publishing, 1994.

Primljeno: 15.01.2012.

Odobreno: 20.05.2012.

ODNOS NEUTROFILA I LIMFOCITA U RANOJ LAKTACIJI KAO PREDIKTIVNI POKAZATELJ ISKLUČENJA KRAVA IZ PROIZVODNJE

Belić Branislava, Cincović Marko R.¹

Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad

Kratak sadržaj

Cilj ovog istraživanja je da se utvrdi granična vrednost i klinički značaj N:L odnosa u proceni isključenja krava iz proizvodnje u laktaciji koja sledi. U toku rutinskog hematološkog pregleda kod 114 krava 7-15 dana posle partusa ispitivali smo broj neutrofila i limfocita kao i odnos neutrofila i limfocita. Granična vrednost N:L odnosa koja najbolje deli krave koje će biti isključene iz proizvodnje od onih koje će u proizvodnji ostati u laktaciji koja sledi je 1,05. Ako je N:L odnos na ovom nivou sa više od 90% verovatnoće (specifičnost 90,32), možemo tvrditi da će krave biti kasnije isključene iz proizvodnje. Ako je vrednost N:L odnosa oko 0,65 sa preko 90% sigurnosti možemo pretpostaviti da će krave ostati u zapatu (senzitivnost 90,92). Površina ispod ROC krive je 0,751, tj. u opsegu $0,7 < AUC \leq 0,9$, što potvrđuje veoma značajnu vezu između vrednosti N:L odnosa posle partusa i isključenja krava sa farmi ($p \sim 0,01$). 72% krava sa vrednošću N:L $> 1,05$ je bilo isključeno iz proizvodnje tokom 12 meseci, nasuprot 20% isključenih krava čiji je N:L $< 0,5$. Odnos neutrofila i limfocita u ranoj laktaciji je koristan indikator za procenu rizika od isključenja krava iz proizvodnje.

Ključne reči: mlečne krave, puerperijum, neutrofili, limfociti, stres, rizik

¹ E-mail: cin_vet@yahoo.com

NEUTROPHIL TO LYMPHOCYTE RATIO IN EARLY LACTATION AS A PREDICTOR FOR FUTURE EXCLUSION OF DAIRY COWS FROM FARM

Belić Branislava, Cincović Marko R.

Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture Novi Sad

Abstract

The aim of this study was to determine the threshold value and clinical significance of neutrophils to lymphocytes ratio in cooling the cows in lactation that follows. In routine hematological examination of 114 cows 7-15 days after parturition, the number of neutrophils and lymphocytes and neutrophil to lymphocyte ratio was examined. The marginal value of N: L correlation that best separates the cows that will be cooled from those that will remain in production in the lactation that follows is 1.05. If the N: L ratio at this level is more than 90% probability (specificity 90.32), it can be claimed that the cows will later be cooled from production. If the value of N: L correlation is about 0.65 with 90% confidence it can be assumed that the cows will remain in the herd (sensitivity 90.92). The area under the ROC curve was 0.751, which confirms a significant association between the values of N:L correlation after parturition and cooling the cows from the farm ($p \sim 0.01$). 72% of cows with the value $N:L > 1.05$ were cooled from production for 12 months, versus 20% of excluded cows with $N:L < 0.5$. The neutrophils to lymphocytes ratio in early lactation is a useful indicator for assessing the risk of cooling the cows from production.

Key words: dairy cows, puerperium, neutrophyle, lymphocyte, stress, risk

UVOD

Analiza leukograma kod goveda omogućuje procenu zdravlja, stresne opterećenosti, monitoring infekcija i slično. Odnos neutrofila i limfocita (N:L odnos) je značajan pokazatelj zdravlja i stresne opterećenosti životinja (Davis i sar., 2008). Fiziološki je ovaj odnos kod odraslih goveda $\sim 0,5:1$. U periodu oko teljenja kod krava postoji tipičan stresni leukogram, koji se odlikuje neutrofilijom, limfopenijom, eozinopenijom i varijabilnom monocitozom. Akutni stres i hiperkortizolemija dovode do porasta koncentracije neutrofila povlačenjem ovih ćelija u centralni pul krvotoka, dok limfociti migriraju ka periferiji, tako da dolazi do porasta odnosa neutrofila i limfocita (N:L odnos često preko 1) (Tornquist i Rigas, 2010). Posle adaptacije na stresne uslove N:L odnos se vraća na fiziološki nivo u periodu 2-7 dana (Lynch i sar., 2010).

Bertoni i sar. (2003) su našli smanjen odnos neutrofila i limfocita na farmama sa dobrom negom i dobrim medicinskim tretmanom krava. Novija istraživanja pokazuju da N/L odnos može biti veći od 1 kod potpuno zdravih krava (George i sar, 2010), pa se upotreba ovog indikatora mora vršiti uz sagledavanje njihovog kompletnog zdravlja i metabolizma.

Predpostavili smo da krave pod prolongiranim stresom posle teljenja (7-15 dana) imaju značajno višu vrednost N:L odnosa. Cilj ovog istraživanja je da se utvrdi granična vrednost i klinički značaj N:L odnosa u proceni isključenja krava iz proizvodnje u laktaciji koja sledi.

MATERIJAL I METODE

U toku rutinskog hematološkog pregleda kod 114 krava 7-15 dana posle partusa ispitivali smo broj neutrofila i limfocita kao i odnos neutrofila i limfocita. Analize su vršene automatski, pomoću uređaja *Hemavet 950*. Ove krave su praćene tokom laktacije, kako bi se utvrdilo da li su i kada isključene iz proizvodnje.

Određivanje granične vrednosti N:L odnosa, koja je značajan prediktor za isključenje krava iz proizvodnje, vršena je ROC analizom (*Receiver Operator Characteristic*). ROC analiza nam omogućuje da ispitamo odnos između senzitivnosti i specifičnosti upotrebe N:L odnosa u proceni isključenja krava iz proizvodnje tako što se bira ona vrednost N:L koja pokazuje najbolji odnos specifičnosti i senzitivnosti. Senzitivnost se definiše kao proporcija krava koje su isključene iz proizvodnje, a čija je vrednost N:L odnosa iznad određene granice (stvarno pozitivan nalaz), dok je specifičnost proporcija krava koje nisu isključene iz proizvodnje, a čija je vrednost odnosa ispod date granice (stvarno negativan nalaz). Interpretacija kritičke vrednosti bazirana je na osnovu površine ispod ROC krive (*AUC – area under the curve*), tako da je vrednost $AUC = 0,5$ smatrana beznačajnom, vrednost $0,5 < AUC \leq 0,7$ značajnom, $0,7 < AUC \leq 0,9$ veoma značajnom, $0,9 < AUC < 1$ visoko značajnom i $AUC = 1$ savršenom.

Formirana je Kaplan-Majerova kriva preživljavanja, tako da je vreme preživljavanja u našoj krivoj zapravo vreme od teljenja do isključenja krave iz proizvodnje.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati istraživanja pokazuju da kod krava u periodu posle teljenja raste N:L odnos na taj način što raste broj neutrofila, a opada broj limfocita. Ovakav leukogram je tipičan u peripartalnom periodu (Belić i sar., 2011) i nastaje kao posledica delovanja kortizola (Detilleux i sar., 1995).

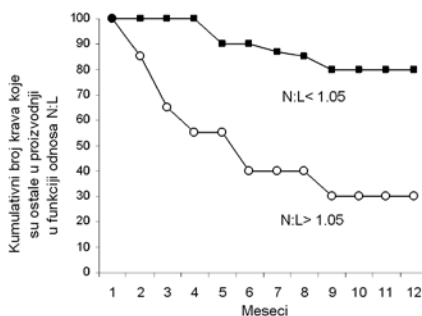
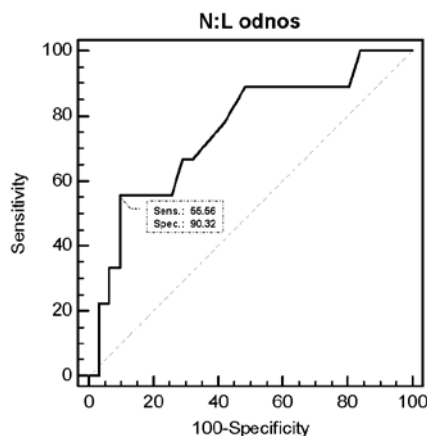
Granična vrednost N:L odnosa koja najbolje deli krave koje će biti isključene iz proizvodnje od onih koje će u proizvodnji ostati u laktaciji koja sledi je 1,05. Ako je N:L odnos na ovom nivou sa više od 90% (specifičnost 90,32) verovatnoće možemo tvrditi da će krave biti kasnije isključene iz proizvodnje. Ako je vrednost N:L odnosa oko 0,65 sa preko 90% sigurnosti možemo pretpostaviti da će krave ostati u zapatu (senzitivnost 90,92) (Tabela 1). Površina ispod ROC krive je 0,751, tj. u opsegu $0,7 < AUC \leq 0,9$, što potvrđuje veoma značajnu vezu između vrednosti N:L odnosa posle partusa i isključenja krava sa farmi ($p \sim 0,01$) (Tabela 2, Grafik 1). Drugi metod koji potvrđuje da je granična vrednost N:L od 1,05 značajna je grafik Kaplan-Majerove krive preživljavanje. 72% krava čija je vrednost N:L $>1,05$ je bilo isključeno iz proizvodnje tokom narednih 12 meseci (Grafik 2). Sa druge strane, isključeno je 20% krava čiji je N:L odnos bio $<1,05$. Ova razlika je signifikantna ($p < 0,01$). U hemogramu 80 ispitanih krava N:L odnos je bio ispod izračunate granične vrednosti, dok je vrednost iznad granične nađena kod 34 krave. Od 42 krave 16 je isključeno zbog mastitisa, 11 zbog endometritisa, 6 zbog bolesti akropodijuma, 4 zbog ketotičnih epizoda, 3 zbog dislokacije abomazuma i 2 zbog hemoragičnog jejunuma.

Tabela 1: Granične vrednost N:L odnosa i njihova specifičnost i senzitivnost u proceni isključenja krava iz proizvodnje

Kriterijum	Senzitivnost	Specifičnost
$>0,6$	100,00	16,13
$>1,05^*$	55,56	90,32
$>1,1$	33,33	90,32
$>1,15$	0,00	100,00

Tabela 2: Statistička značajnost upotrebe N:L odnosa kao indikatora u proceni isključenja krava iz proizvodnje

Površina ispod ROC krive (AUC)	0,751
Standardna greška	0,0985
95% interval pzdnanosti	0,589 to 0,874
Z statistika	2,547
Nivo značajnosti P (površina=0,5)	0,0109



Grafik 1: ROC kriva za graničnu vrednost sa optimalnim odnosom specifičnosti i senzitivnosti

Grafik 2: Kaplan-Majerova kriva preživljavanja

Krave koje 7-15 dana posle teljenja imaju N:L odnos preko fizioloških vrednosti nalaze se u fazi prolongiranog stresa. Taj prolongirani stres može biti uzrokovan prolongiranim metaboličkim stresom sa povišenim vrednostima NEFA i BHB i sniženom vrednošću glikemije koji se javlja kod određenog broja krava posle teljenja. Koncentracija ovih metabolita značajno korelira sa N:L odnosom (Belić i sar., 2011a). Različite peripartalne upale, hirurška stanja i drugi poremećaji dovode do povišenog N:L odnosa (Tornquist i Rigas, 2010), što se može povezati sa kasnijim isključenjem krava iz proizvodnje. Poznato je da epizodno i kumulativno delovanje stresa dovodi do izmena i kompromitovanja imunog sistema i sklonosti ka upalama (Blecha, 2000). U jednom ogledu Thanasak-a i sar. (2004) su ispitali uticaj aplikacije deksametazona na funkciju limfocita u drugoj nedelji posle partusa. Aplikacija deksametazona dovela je do značajnog porasta N:L odnosa, koji je predhodno bio u okviru fizioloških granica, na račun porasta broja neutrofila. Dakle, veštačkim podražavanjem akutne stresne reakcije dolazi do značajnog porasta broja neutrofila u nedeljama posle partusa, što objašnjava našu pretpostavku da krave sa povećanim N:L odnosom u periodu 7-14 dana posle partusa najverovatnije pate od prolongiranog stresa. Vrednost odnosa N:L preko 1 govori da su krave opterećene inflamacijom ili drugim stresorima (Latimer i sar., 2003), sa čime se približno slaže rezultat koji smo dobili.

ZAKLJUČAK

Optimalna granična vrednost N:L odnosa, dobijena iz uzorka krvi uzete 7-15 dana posle partusa, koja ukazuje da će krave biti isključene iz proizvodnje je 1,05. 72% krava čija je vrednost N:L >1,05 je bilo isključeno iz proizvodnje tokom 12 meseci. Odnos neutrofila i limfocita u ranoj laktaciji je koristan indikator za procenu rizika od isključenja krava iz proizvodnje. Ovim se potvrđuje da je N:L odnos značajan u proceni zdravlja i stresne opterećenosti krava.

LITERATURA

1. Belić B., Cincović M.R., Krčmar Lj., Vidović B.: Reference values and frequency distribution of hematological parameters in cows during lactation and in pregnancy. *Contemporary agriculture*, 60,1/2, 145-151, 2011.
2. Belić B., Cincović M.R., Stevančević M., Toholj B.: Parameters of negative energy balance (NEFA, BHB and glucose) and neutrophil to lymphocyte ratio in cows after calving – comparison of two indicators of stress. In: Proceedings, 12th Middle European Buiatric Congress, Pula, Croatia, May 18-22, 281-284, 2011.
3. Belić B., Cincović M.R., Stevančević M., Božić A., Stojanović D., Kovačević Z.: Peripartalni hematološki nalaz kod mlečnih krava u cilju predviđanja sklonosti ka nastanku metritisa i mastitisa. U: Zbornik XIX inovacije znanja u stočarstvu, Zemun, 54, 2010.
4. Bertoni G., Trevisi E., Ferrari A., Archetti I.: Preliminary studies on compatibility between high yield levels and the well-being of dairy cows. *Vet Res Commun*, 27(Suppl 1), 639–641, 2003.
5. Blecha F: Immune System Response to Stress, in: The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare, Moberg G.P. and Mench J.A. (editors), CABI Publishing, 111-121, 2000.
6. Davis A.K., Maney D.L., Maerzl J.C.: The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology*, 22, 760–772, 2008.
7. Detilleux J.C., Kehrli M.E., Stabel J.R., Freeman A.E., Kelley D.H.: Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet Immunol Immunopathol*, 44, 251–267, 1995.
8. George J.W., Snipes J., Lane V.M.: Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Vet Clin Pathol* 39, 2, 138–148, 2010.
9. Thanasak J., Jorritsma R., Hoek A., Noordhuizen J., Rutten V., Müller K.E.: The effects of a single injection of dexamethasone-21-isonicotinate on the

- lymphocyte functions of dairy cows at two weeks post partum. *Vet. Res.*, 35, 103–112, 2004.
10. Latimer K.S., Prasse K.W.: Leukocytes. In: Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW, eds. *Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology*. 4th ed. Ames, IA: Iowa State Press, 46–79, 2003.
 11. Lynch E.M., Earley B., McGee M., Doyle S.: Characterisation of physiological and immunological responses in beef cowsto abrupt weaning and subsequent housing. *BMC Veterinary Research*, 6, 37, 2010.
 12. Tornquist S.J., Rigas J.: Interpretation of Ruminant Leukocyte Responses, In: *Schalms veterinary hematology*. 6th edition, Weiss, D.J. (ed), Wardrop, K.J. (ed), Wiley-Blackwell, 307-313, 2010.

Primljeno: 15.02.2012.

Odobreno: 20.05.2012.

ODNOS BROJA SOMATSKIH ČELIJA U MLEKU KRAVA I KONCENTRACIJA CINKA U KRVNOM SERUMU^{1*}

**Davidov Ivana², Radinović Miodrag¹, Erdeljan Mihajlo¹, Stančić Ivan¹,
Stojanović Dragica², Milanov Dubravka²**

¹Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

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

Kratak sadržaj

Istraživanje je sprovedeno na 15 krava holštajn-frizijske rase starosti između 3 i 5 godina držanih u slobodnom sistemu sa ispašom u letnjem periodu. Zbog praćenja pojava subkliničkih mastitisa uzimani su uzorci mleka dva puta godišnje. Pored mleka uzimani su i uzorci krvi radi određivanja koncentracije cinka u serumu. Na osnovu vrednosti koncentracije cinka u krvnom serumu i broja somatskih ćelija mleka krava data je procena pojave subkliničkih mastitisa kod visoko mlečnih krava. Analizom uzoraka krvnog seruma uočena su variranja koncentracija cinka krvnog seruma, koje su zavisile od godišnjeg doba. Broj somatskih ćelija u prolećnom i jesenjem periodu je u proseku bio preko 400.000/ml mleka. Na osnovu statističke analize, testa korelacije zaključuje se da koncentracija cinka krvnog seruma kod ispitivane grupe krava nije imala značajan uticaj na kretanje broja somatskih ćelija u mleku.

Ključne reči: broj somatskih ćelija, cink, krvni serum, krava

¹ Rad je rezultat istraživanja na projektu Ministarstva prosvete i nauke RS, TR 31071

² e-mail: ivanadav@polj.uns.ac.rs

RELATIONSHIP BETWEEN SOMATIC CELL COUNT AND ZINC BLOOD SERUM CONCENTRATION IN DAIRY COWS

Ivana Davidov¹, Miodrag Radinović¹, Mihajlo Erdeljan¹, Ivan Stančić¹,
Dragica Stojanović², Dubravka Milanov²

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

²Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad

Abstract

The study was conducted on 15 Holstein-Friesian cows aged between 3 and 5 years kept in the free grazing conditions in summer. The samples of milk were taken twice a year for monitoring subclinical mastitis. In addition to milk samples, the blood samples were taken to determine the concentration of zinc in serum. The occurrence of subclinical mastitis in high yielding cows was estimated based on the values of zinc concentration in blood serum and somatic cells of milk. By analyzing the samples of blood serum, a variation in the concentration of zinc in blood serum was noted depending on the season. Somatic cell count in the spring and autumn period in average was over 400.000/ml milk. Based on statistical analysis, the correlation test, it was concluded that the concentration of zinc in blood serum of cows in the experimental group had no significant effect on the somatic cells count in milk.

Key words: somatic cell count, zinc, blood serum, cow

UVOD

Cink je esencijalni element za biljke, životinje i čoveka. Danas je poznato više od 200 enzima u različitim biljnim i životinjskim vrstama, kao i u organizmu ljudi za čije je funkcionisanje važan cink (Hurley and Doane, 1989). Takođe, cink ulazi u sastav enzima koji sprečava aktivnost slobodnih radikala (Vallee and Falchuk, 1993; Prasad et al., 2004; Gressley, 2009). Prema Weiss i Spearu (2006), cink ima značajnu ulogu u imunološkom odgovoru organizma. Cink kao esecijalni element ima značajnu ulogu u očuvanju intergiteta kože (Sordillo et al., 1997; Tomlison et al., 2004; 2008) i ima uticaja na smanjenje broja somatskih ćelija u mleku krava (Kellogg et al., 2004). Mlečnoj žlezdi, kao organu koji predstavlja derivat kože, za razvoj je neophodan cink (Tomlison et al., 2004; 2008), zbog formiranja keratinskog sloja u *ductus papillaris*-u.

Oko 20-30% hranom unetog cinka se resorbuje najvećim delom u duode-

¹ e-mail: ivanadav@polj.uns.ac.rs

numu i proksimalnom jejunumu. Resorpcija cinka se podjednako odvija procesima pasivne difuzije i aktivnim transportom (Lee et al., 1989; Cope et al., 2009). Jedan deo resorbovanog cinka se brzo transportuje kroz ćelije mukoze, a drugi deo se zadržava u mukozu iz koje se polako oslobađa tokom nekoliko narednih časova (Gordon et al., 1981). Na resorpciju cinka utiču brojni faktori kao što su rastvorljivost cinka u digestivnom traktu, vrsta i kategorija životinje, sastav hrane i sadržaj cinka u obroku (Miller, 1970; Wiking et al., 2008; Cope et al., 2009; Rabbiee et al., 2010).

Količina cinka u hrani varira i zavisi od količine cinka u zemljištu, od vrste biljaka i od dela biljke. Smatra se da se količina cinka u biljkama sa zemljišta teritorije Srbije kreće između 25 i 50 mg/kg suve materije (Obračević, 1990). Trave obično sadrže od 30 do 50 mg Zn/kg suve materije, dok leguminoze sadrže veće količine (Kolarski, 1995).

Vrlo je malo literaturnih podataka o uticaju cinka iz hrane na zdravlje mlečne žlezde. Ipak je objavljeno nekoliko studija o uticaju dodataka cinka u hrani na broj somatskih ćelija. U istraživanjima Kellogg (1990) i Tomlinson et al. (2002) uočeno je da je dodavanjem cinka u hrani oko 360 mg/kg hrane svakog dana dovelo do pada broja somatskih ćelija u mleku. Whitaker et al. (1997) dodavanjem 390 mg/kg hrane cinka svakog dana nisu uočili uticaj cinka na pojavu infekcija, kliničkih mastitisa i na smanjenje broj somatskih ćelija u mleku. U eksperimentu koji je izveo Van Suan (2009) na dvanaest krava u laktaciji koje su u hrani dobijale dodatak organskog cinka, uočeno je da je u 33% krava došlo do redukcije broja somatskih ćelija u mleku krava.

Aдекватна koncentracija cinka u hrani, a posledično i u krvi, pozitivno utiče na pravilan imunološki odgovor, dok deficit cinka dovodi do nepravilnog funkcionisanja imunološkog sistema i nepravilne keratinizacije (Hutcheson, 1989; Reddy i Frey, 1990). Prvu liniju odbrane vimena krava predstavlja *ductus papillaris*, koji je sa unutrašnje strane obložen kreatinskim slojem. Davidov i sar. (2011) su utvrdili da debljina keratinskog sloja varira i da ta variranja u debljini imaju uticaja na očuvanost morfologije i funkcije parenhima vimena krava.

Cilj ovog rada je da utvrdi povezanost između koncentracije cinka krvnog seruma i broja somatskih ćelija u mleku krava.

MATERIJAL I METOD

Sa jedne farme Južnobackog okruga kapaciteta 100 krava holštajn-frizijske rase, 15 krava je uključeno u istraživanje. Oglednu grupu su činile krave starosti od 3 do 5 godina, za koje su postojali podaci o povećanju broja somatskih ćelija u mleku. Krave su držane u slobodnom sistemu sa ispašom koja se koristi

u letnjem periodu. Na ispaši životinjama je dostupna paša, na pašnjaku koji je svake godine tretiran mineralnim đubrivom. U toku oglada krave su 24 sata imale pristup pijaćoj vodi.

Uzorci mleka su uzimani dva puta godišnje - u proleće i u jesen. Uzorci krvi su uzeti tri puta: na početku oglada, u proleće i u jesen. Od svake krave je uzeta krv iz repne vene (*vena coccygea*), koja daje najbolji uvid u stanje mlečne žlede. Pre uzimanja uzoraka krvi urađena je dezinfekcija mesta uboda, tako što je koža repa oprana tekućom vodom, obrisana suvom čistom krpom i na kraju očišćena alkoholom, po principu asepse i antiseptice. Uzorci krvi su sakupljeni u desetomililitarskim vakutajner epruvetama (BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions UK) sa antikoagulansom K3E u količini od 0,072 ml. Zbog testiranja vakutajner epruveta, uzeta je mala količina krvi od 3 ml i prema uputstvu proizvođača proverena je efikasnost vakutajner epruveta. Nakon toga je vađena krv krava ogledne grupe. Izvađenja krvi u vakutajner epruveti je nežno mučkana 8 puta zbog mešanja antikoagulansa vakutajner epruvete sa uzetom krvlju. Svaka vakutajner epruveta je bila obeležena i transportovana u laboratoriju Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu. Priprema uzoraka je izvršena metodom vlažne digestije u sistemu Ethos, Microwave Labstation, Milestone. Koncentracije cinka su određene tehnikom spregnute plazme na instrumentu Agilent ICP-MS 7700 preko izotopa ^{66}Zn uz upotrebu inertnog gasa helijuma. Korišćeni su standardi za cink-AccuTrace Reference Standard, AA70N-1, Lot B9025027. Integraciono vreme za cink je iznosilo 0,1 s po tački.

Uzorci mleka od 15 krava holštajn-frizijske rase su uzimani pre jutarnje muže u plastične sterilne bočice od 10 ml. Uzorci zbirnog mleka svake krave su prikupljeni u proleće i u jesen. Pre uzimanja uzorka svaka papila, a naročito njen vrh, je dezinfikovana. Uzeti uzorci mleka su pregledani aparatom fosomatikom (Fossomatic; Foss Electric, Hillerød, Denmark), zbog brojanja somatskih ćelija u mleku.

REZULTATI I DISKUSIJA

Na početku istraživanja uzimani su uzorci krvi i mleka oglednoj grupi krava, za dobijanje vrednosti koncentracija cinka krvnog seruma. Uzorke je bilo neophodno uzeti zbog dobijanja početnog stanja koncentracija cinka i zbog praćenja uticaja cinka na očuvanost morfologije i funkcije vime krava.

Merenjem vrednosti cinka u krvnom serumu 15 krava na početku istraživanja, uočeno je da se koncentracija cinka krvnog seruma kretala u rasponu od 4,95 do 16,75 $\mu\text{mol/l}$ (Tabela 1). Znajući da su fiziološke vrednosti cinka od 7 do 13 $\mu\text{mol/l}$, kod 15 ispitivanih krava 11 (73,33%) vrednosti cinka su bile ispod fizioloških za visokomlečne krave.

Tabela 1. Koncentracija cinka u krvnom serumu krava na početku istraživanja

red.br. krava	Zn μmol/l	red.br. krava	Zn μmol/l	red.br. krava	Zn μmol/l
1.	10,33	6.	5,8	11.	6,64
2.	14,91	7.	9,98	12.	14,22
3.	15,12	8.	11,66	13.	7,13
4.	12,5	9.	7,46	14.	12,71
5.	16,75	10.	4,95	15.	9,98

Merenjem vrednosti cinka u krvnom serumu krava u proleće uočeno je da se koncentracija cinka krvnog seruma kretala u rasponu od 4,95 do 21,15 μmol/l (Tabela 2). Obzirom da su krave bile u štalskim uslovima u zimskom periodu i da su hranjene silažom, senom i koncentratom, uočava se da su vrednosti cinka krvnog seruma kod 5/15 (33,33%) krava u prolećnom periodu bile ispod fizioloških vrednosti.

Tabela 2. Koncentracija cinka u krvnom serumu krava u prolećnom periodu

red.br. krava	Zn μmol/l	red.br. krava	Zn μmol/l	red.br. krava	Zn μmol/l
1.	13,23	6.	10,58	11.	7,64
2.	18,10	7.	13,98	12.	18,62
3.	18,20	8.	15,86	13.	9,61
4.	17,50	9.	9,64	14.	16,61
5.	21,15	10.	4,95	15.	13,28

Merenjem vrednosti cinka u krvnom serumu krava u jesenjem periodu uočeno je da su se koncentracije cinka krvnog seruma kretale u rasponu od 10,78 do 24,87 μmol/l (Tabela 3). U toku letnjeg perioda krave su bile na ispaši na pašnjaku koji je svake godine tretiran mineralnim đubrivom. Od ispitivanih 15 krava sve krave su bile sa vrednostima cinka krvnog seruma u fiziološkim granicama za visokomlećne krave.

Tabela 3. Koncentracija cinka u krvnom serumu krava u jesenjem periodu

red.br. krava	Zn μmol/l	red.br. krava	Zn μmol/l	red.br. krava	Zn μmol/l
1.	15,58	6.	23,72	11.	15,96
2.	20,41	7.	13,36	12.	24,66
3.	15,63	8.	12,62	13.	14,80
4.	24,87	9.	13,58	14.	18,85
5.	18,85	10.	10,78	15.	13,77

Analizom broja somatskih ćelija u mleku kod 15 krava u prolećnom periodu uočeno je da su se vrednosti broja somatskih ćelija u mleku kretale od 380.000 do 580.000 ml/mleka (Tabela 4). Poznato je da nalaz broja somatskih ćelija u mleku preko 400.000/ml indikator subkliničkih mastitisa, uočava se da je u prolećnom periodu 14/15 (93,33%) bilo sa subkliničkim mastitisom.

Tabela 4. Broj somatskih ćelija u mleku (BSĆ) krava u prolećnom periodu

red.br. krava	BSĆ/ml	red.br. krava	BSĆ/ml	red.br. krava	BSĆ/ml
1.	570.000	6.	540.000	11.	580.000
2.	510.000	7.	540.000	12.	560.000
3.	530.000	8.	410.000	13.	530.000
4.	490.000	9.	520.000	14.	400.000
5.	480.000	10.	450.000	15.	380.000

Analizom broja somatskih ćelija u mleku kod krava u jesenjem periodu uočeno je da su se vrednosti somatskih ćelija u mleku kretale od 210.000 do 510.000 ml/mleka (Tabela 5). Uočava se da je u jesenjem periodu 11/15 (73,33%) krava bilo sa povećanim brojem somatskih ćelija u mleku.

Tabela 5. Broj somatskih ćelija u mleku (BSC) krava u jesenjem periodu

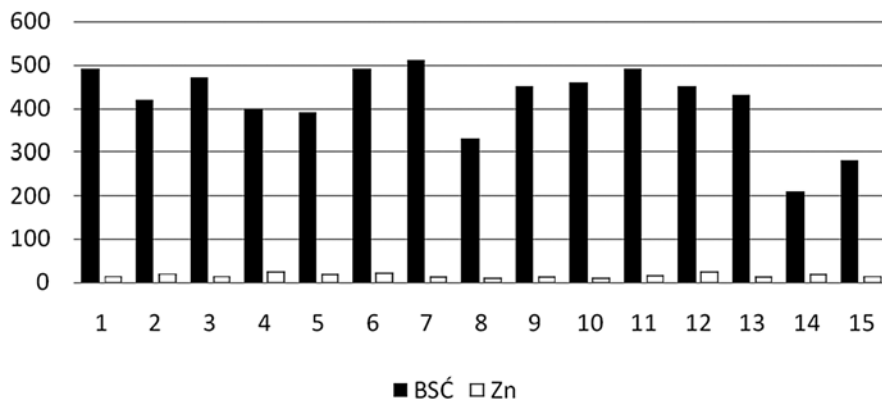
red.br. krava	BSC/ml	red.br. krava	BSC/ml	red.br. krava	BSC/ml
1.	490.000	6.	490.000	11.	490.000
2.	420.000	7.	510.000	12.	450.000
3.	470.000	8.	330.000	13.	430.000
4.	400.000	9.	450.000	14.	210.000
5.	390.000	10.	460.000	15.	280.000

Statističkom analizom korelacije koncentracije cinka krvnog seruma i broja somatskih ćelija u mleku krava uočeno je da koncentracija cinka krvnog seruma krava nema uticaja na broj somatskih ćelija u mleku (Tabela 6, Grafikon 1).

Tabela 6. Test korelacije koncentracije cinka krvnog seruma i broja somatskih ćelija u mleku krava

Broj krava	Zn $\mu\text{mol/l}$	BSC/ml
1.	15,58	490.000
2.	20,41	420.000
3.	15,63	470.000
4.	24,87	400.000
5.	18,85	390.000
6.	23,72	490.000
7.	13,36	510.000
8.	12,62	330.000
9.	13,58	450.000
10.	10,78	460.000
11.	15,96	490.000
12.	24,66	450.000
13.	14,8	430.000
14.	18,85	210.000
15.	13,77	280.000
KORELACIJA		0,00155

Odnos koncentracije cinka u serumu i broja somatskih ćelija



Grafikon 1. Prikaz odnosa koncentracije cinka krvnog seruma i broja somatskih ćelija u mleku krava

ZAKLJUČAK

Dobijeni rezultati ukazuju da postoje variranja u koncentraciji cinka krvnog seruma u različitim periodima godine. Broj somatskih ćelija u mleku ispitivanih krava je pokazao tendenciju variranja. Na osnovu statističke analize, testa korelacije može se zaključiti da koncentracija cinka krvnog seruma kod ispitivane grupe krava nije imala značajan uticaj na kretanje broja somatskih ćelija u mleku.

LITERATURA

1. Cope C.M., Mackenzie A.M., Wilde D. and Sinclair L.A.: Effects of level and form of dietary zinc on dairy cow performance and health. *J. Dairy Sci.* 92, 2128-2135, 2009.
2. Davidov, I, Radinović, M., Stojanović, D.: Uticaj stratum corneum-a ductus papillaris-a na očuvanost parenhima vimena krava. *Arhiv veterinarske medicine*, 4, 1, 3-10, 2011.
3. Gordon F.E., Gordon C.R., Passal B.D.: Zinc metabolism- Basic, clinical and behavioral aspects. *J. Pediatr.* 99:, 41-349, 1981.
4. Gressley T.F.: Zinc, copper, manganese and selenium in dairy cattle rati-

- ons. In: Proceedings of the 7th Annual Mid-Atlantic Nutrition Conference, pp.65-71, 2009.
5. Hurley W.L. and Doane R.H.: Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *J. Dairy Sci.* 72, 1123-1135, 1989.
 6. Hutcheson D.P.: Nutritional factors affect immune response in cattle. *Feedstuffs*. 61,16-24, 1989.
 7. Kellogg D.W.: Zinc methionine affects performance of lactating cows. *Feedstuffs Aug* 20, 15-20, 1990.
 8. Kellogg D.W., Tomlinson D.J., Socha M.T. and Johnson A.B.: Effects of zinc methionine complex on milk production and somatic cell count of dairy cows: twelve- trial summary. *Anim. Sci.* 20, 295-301, 2004.
 9. Kolarski D.: Osnovi ishrane domaćih životinja. Beograd: Naučna knjiga. 1995.
 10. Lee H.H., Prasad S.A., Brewer J.G., Owyang C.: Zinc absorption in human small intestine. *Am. J. Physiol.* 256, 687-691, 1989.
 11. Miller W.J.: Zinc nutrition of cattle- A review. *J. Dairy Sci.* 53,1123-1135, 1970.
 12. Prasad A.S., Bao B., Beck Jr. F.W., Kucuk O. and Sarkar F.H.: Antioxidant effects of zinc in humans. *Free Radic. Biolo. and Med.* 37, 1182-1190, 2004.
 13. Rabiee A.R., Lean I.J., Stevenson M.A. and Socha M.T.: Effects of feeding organic trace minerals on milk production and reproductive performance in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 93, 4239-4251, 2010.
 14. Reddy P.G. and Frey R.A.: Nutritional modulation of immunity in domestic food animals. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 35, 255-281, 1990.
 15. Sordillo L.M., Shafer-Weaver K. and DeRosa D.: Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 80, 1851-1865, 1997.
 16. Tomlinson D.J., Socha M.T., Rapp C.J. and Johnson A.B.: Summary of twelve trails evaluating the effect of feeding complexed zinc methionine on lactation performance of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 106-111, 2002.
 17. Tomlinson D.J., Mulling C.H. and Fakler T.M.: Invited review: formation of keratins in the bovine claw: roles of hormones, minerals and vitamins in fuctional claw integrity. *J. Dairy Sci.* 87, 797-809, 2004.
 18. Tomlinson D.J., Socha M.T. and DeFrain J.M.: Role of trace minerals in the immune system. In: Proc. Penn. State Dairy Cattle Nutrition Workshop, pp. 39-52, 2008.
 19. Vallee B.L. and Falchuk K.H.: The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 73, 79-118, 1993.
 20. Van Saun R.J.: Ration approach to selenium supplemnetation essential. *Feedstuffs* 15, 15-21, 1990.
 21. Weiss W.P. and Spears J.W.: Vitamin and trace mineral effect on immune fuction of ruminants. In: Sejrsen K., Hvelplund T., Nielsen M.O. (Eds.), Ruminanat Physiology. Wageningen Academic Publishers, Utrecht, The Netherlands, pp. 473-496, 2006.

22. Whitaker D.A., Eayres H.F., Aitchison K. and Kelly J.M.: No effect of a dietary zinc proteinate on clinical mastitis, infection rate and somatic cell count in dairy cows. *Vet. J.* 153, 197-204, 1997.
23. Wiking L., Larsen T. and Sehested J.: Transfer of dietary zinc and fat to milk-evaluation of milk fat quality, milk fat precursors and mastitis indicators. *J. Dairy Sci.* 91, 1544-1551, 2008.

Primljeno: 15.04.2012.

Odobreno: 23.06.2012.

Stručni rad

UDK 637.52.035:664.9.022.3(497.113Novi Sad)

SADRŽAJ NITRITA I UKUPNOG FOSFORA U PROIZVODIMA OD MESA NA NOVOSADSKOM TRŽIŠTU

Prica Nadežda¹, Živkov-Baloš Milica, Mihaljev

Željko, Jakšić Sandra, Kapetanov Miloš

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Rumenački put 20

Kratak sadržaj

Najvažniji konzervansi koji se dodaju u proizvode od mesa su nitriti i nitro, a najvažniji antioksidansi su fosfati. Našim pravilnicima su propisane dozvoljene vrednosti ovih aditiva u različitim proizvodima od mesa. Cilj rada bio je da se u proizvodima od mesa odabranih proizvođača sa novosadskog tržišta, prati sadržaj nitrita i ukupnog fosfora i da se, na osnovu dobijenih rezultata, utvrdi da li proizvođači na pravilan način dodaju aditive u svoje proizvode. U toku jedne kalendarske godine praćen je sadržaj aditiva u proizvodima četiri proizvođača sa novosadskog tržišta. Ispitano je ukupno 140 uzoraka. Sadržaj ukupnog fosfora u proizvodima je veoma varirao i kretao se od 2,34g/kg – 8,45g/kg. Sadržaj nitrita je bio najveći u grubo usitnjenim barenim kobasicama, ali se nije značajno razlikovao u različitim grupama proizvoda različitih proizvođača. Sadržaj ukupnog fosfora je samo u dva uzorka (1,43%) bio viši od propisane vrednosti, dok je sadržaj nitrita samo u jednom ispitanom uzorku bio van okvira dozvoljenih vrednosti (0,71%). Na osnovu rezultata ispitivanja može da se zaključi da proizvođači, uprkos razlici u obimu i načinu rada i kontrole, na pravilan način dodaju aditive u svoje proizvode.

Ključne reči: nitriti, ukupan fosfor, proizvodi od mesa

¹ e-mail: nadja@niv.ns.ac.rs

Rad je rezultat istraživanja po projektu Ministarstva prosvete i nauke RS, TR 31084.

TOTAL NITRITE AND PHOSPHORUS CONTENT IN MEAT PRODUCTS ON NOVI SAD MARKET

Prca Nadežda, Živkov-Baloš Milica, Mihaljev

Željko, Jakšić Sandra, Kapetanov Miloš

Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad, Rumenački put 20

Abstract

The main food preservatives added to meat products are nitrites and nitrates, and the most important antioxidants are phosphates. The content of additives in meat products is prescribed by the Rule Book. The aim of this paper was to monitor the content of nitrites and total phosphorus in meat products of producers from Novi Sad market, and, based on these results, find out whether the additives are used correctly. In one year period the content of additives in the products of four producers that sell on Novi Sad market was monitored. A total of 140 samples was examined. Phosphorus content was highly variable and ranged from 2.34 g/kg-8.45 g/kg. The nitrite level was the highest in the coarse-grained cooked sausages, but was not significantly different from the products of other producers. Only in two samples (1.43%) phosphorus content was higher than the prescribed value, and only in one tested sample it was outside the permissible value (0.71%). It can be concluded that the producers, despite the difference in the volume of production, technology and control, use additives properly.

Keywords: nitrates, total phosphorus, meat products

UVOD

U savremenoj prehrambenoj tehnologiji, najvažniji deo svake proizvodne formule je dobijanje proizvoda željenog izgleda, tekture, mirisa i ukusa i dobijanje zdravstveno-bezbednog proizvoda. Da bi se ovi zahtevi realizovali proizvođačima industrijske hrane, pored primene savremene tehnologije, stoji na raspolaganju preko 70 prirodnih začina i začinskih biljaka, kao i njihovi ekstrakti i mešavine, preko 350 funkcionalnih aditiva, brojni belančevinasti proizvodi u prahu životinjskog, biljnog i mikrobiološkog porekla, čiji se broj i funkcionalnost svakim danom povećava i poboljšava, kao i sve vrste namirnica, uključujući voće, povrće i pečurke. Ovo mnoštvo dodataka ukazuje na to da je došlo vreme kada industrija dodataka – aditiva, začina i funkcionalnih dodataka jača, tako da se ponekad stiče utisak da proizvođači industrijske hrane veću pažnju posvećuju dodacima nego osnovnom prehrambenom proizvo-

du (Turubatović i sar., 2006).

Zdravstvena bezbednost hrane je imperativ savremenog društva i zato većina dodataka, pored ostalih mera koje se primenjuju, mogu u značajnoj meri da pomognu u postizanju ovog cilja, pod uslovom da se pravilno koriste. U suprotnom, preterana i nestručna upotrebe dodataka, ili njihovo neoznačavanje na deklaraciji, može imati negativan uticaj, ne samo na kvalitet proizvoda već i na zdravlje potrošača.

Prehrambeni aditivi se u izradi proizvoda od mesa koriste zbog različitih funkcija koje proizvodima obezbeđuju: održavanje dobre strukture i konzistencije; prevencija od izdvajanja masti i gela; održavanje stabilnosti boje; održivost i produženje održivosti, sprečavanje užeglosti, odnosno održavanje hemijske i mikrobiološke stabilnosti proizvoda; očuvanje palatabilnosti (ukusa) i intenzivnije arome; održavanje alkaliteta, odnosno aciditeta i dr.

Prema Pravilniku (2004) svi sastojci određene namirnice, a to znači i svaki upotrebljen aditiv, moraju biti navedeni u deklaraciji iza reči «sastojci», prema opadajućem redosledu, dok je način deklarisanja aditiva propisan posebnim Pravilnikom (56/2003, 5/2004 i 16/2005). Novi aditivi prolaze kroz kontrolu nadležnih institucija kako bi se utvrdila njihova toksičnost, dnevne doze koje se smatraju sigurnim, kao i prolazne i trajne nuzpojave. Aditivi su i predmet ispitivanja na mutagenost, tetragenost, kancerogenost, a uz to prati se i ispituje i njihov uticaj na embrion i potomstvo.

Korišćenje različitih dodatih aditiva u izradi proizvoda od mesa u domaćoj industriji imao je uobičajen tehnološki razvoj i praktičnu primenu, u skladu sa dostignućima u drugim razvijenim zemljama Evrope. Najvažniji konzervansi koji se dodaju u proizvode od mesa su, bez sumnje, nitriti i nitrati, a najvažniji antioksidansi su fosfati.

Nitriti su natrijumove, odnosno kalijumove, soli nitritne kiseline (HNO_2), bezbojni do svetložućkasti kristali koji su dobro rastvorljivi, naročito u toploj vodi. Hemijski nisu postojani, naročito ako se nalaze u organskoj materiji, u kiseloj sredini ili na povišenoj temperaturi. Mesu daju karakterističnu crvenu boju, poboljšavaju ukus i teksturu proizvoda od mesa (Perši i sar., 2010). U maloj količini u kojoj se koriste, nitriti inhibiraju rast brojnih bakterija, posebno toksogenih vrsta *C. botulinum* i *S. aureus*. Pored toga nitriti stabilizuju boju proizvoda, učestvuju u formiranju prijatne arome i sprečavaju oksidaciju lipida. Danas nije poznata nijedna supstanca koja bi mogla, bar jednim delom, da u proizvodima od mesa zameni nitrite, pogotovo kada je u pitanju antibiotulinusni efekat. Nitriti u mesu nastaju redukcijom nitrata, uz učešće redukujućih enzima određenih vrsta bakterija, kao što su mikrokoke, apatogene stafiloške, bacili i dr. Međutim, pošto aktivnost bakterija u mesu zavisi od mnogih činilaca, količina nitrita koji nastaje iz nitrata uvek je promenljiva i ne-

poznata, pa su nitrati označeni kao «nekontrolisani izvor» nitrita. Zbog činjenice da pod određenim uslovima (kisela sredina, visoka temperatura) nitriti učestvuju u formiranju kancerogenih N-nitrozamina, upotreba nitrita i nitrata bili su godinama predmet brojnih ispitivanja. Na osnovu čega je zaključeno da se nitriti i nitrati ne mogu izbaciti iz upotrebe, jer bi to imalo za posledicu velike probleme, kao što su botulizam, mala održivost i loš kvalitet proizvoda (Prica i sar., 2007).

Pored nitrita poseban tehnološki značaj za proizvode od mesa imaju difosfati, trifosfati i polifosfati. Generalno fosfati poseduju više funkcionalnih svojstava. Oni mogu biti emulgatori, emulgujuće soli, regulatori kiselosti, stabilizatori, sekvestranti, zgušnjivači i dr. Bez obzira na to koji je mehanizam delovanja primaran, fosfati imaju ulogu povećanja sposobnosti ohlađenog i smrznutog mesa da vezuje sopstvenu i dodatu vodu. Fosfati, pored toga, deluju na međupovršinske sile između masnih kapljica i vode, olakšavaju emulgovanje masti i povećavaju stabilnost emulzija. Tehnološko opravdanje za upotrebu fosfata postoji kod proizvoda u koje se dodaje voda i koji se konzervišu toplotnom obradom, kao što su barene kobasice, kuvane kobasice, konzerve, dimljeno meso, dimljena i pečena slanina. Valja napomenuti da meso, kao sirovina, sadrži određenu količinu prirodnog fosfora koja zavisi od vrste životinje, dela trupa na kome se meso nalazi, način ishrane životinje, načina obrade, odnosno otkoštavanja. Dodavanjem polifosfata u količinama većim od tehnološki potrebnih, dolazi do povećanog vezivanja vode u proizvodu, čime se menja njegova prehrambena vrednost, što utiče na loš kvalitet proizvoda (Perši i sar., 2010).

MATERIJAL I METODE

Ispitivanje je izvršeno na sledećim uzorcima: fino usitnjene barene kobasice, grubo usitnjene barene kobasice, kuvane kobasice, fermentisane suve kobasice, dimljeni proizvodi i konzerve od usitnjenog mesa. Uzorci su bili poreklom od četiri različita proizvođača sa novosadskog tržišta. Ukupno je obrađeno 140 uzoraka i to: 42 uzorka fino usitnjenih barenih kobasica, 62 uzorka grubo usitnjenih barenih kobasica, 8 uzorka kuvanih kobasica, 4 uzorka fermentisanih suvih kobasica, 8 uzorka dimljenih proizvoda, 10 uzorka konzervi od usitnjenog mesa, 2 uzorka sveže kobasice i 4 uzorka slanine. Analizirano je ukupno 37 uzoraka proizvođača A, 20 uzoraka proizvođača B, 45 uzoraka proizvođača C i 38 uzoraka proizvođača D. Od svakog proizvođača je mesečno uzorkovano od 1–4 uzorka.

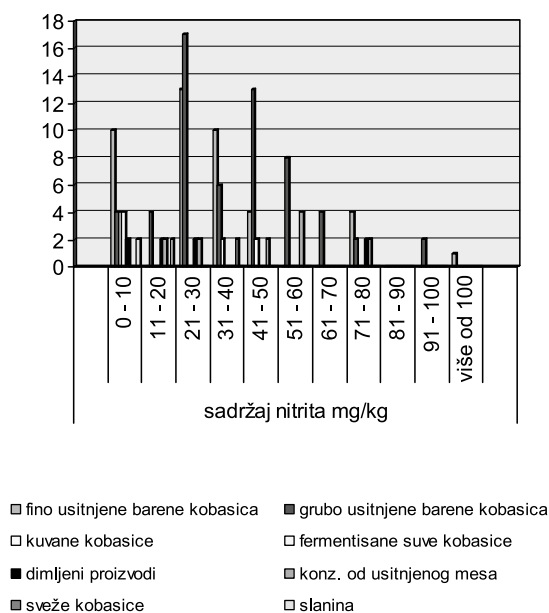
Određivanje sadržaja nitrita izvršeno je metodom SRPS ISO 2918/1999, a određivanje sadržaja ukupnog fosfora metodom SRPS ISO 13730/1999.

REZULTATI I DISKUSIJA

Na grafikonu 1 prikazan je sadržaj nitrita u proizvodima od mesa proizvođača A, B, C i D. Samo u jednom uzorku sadržaj nitrita je bio veći od propisanih vrednosti, a u svim ostalim uzorcima je sadržaj nitrita u proizvodima od mesa bio unutar propisanih vrednosti Pravilnika (56/2003, 5/2004 i 16/2005).

Sadržaj nitrita u grubo usitnjenim barenim kobasicama proizvođača A kretao se od 11,29 mg/kg do 96,33 mg/kg, u fino usitnjenim barenim kobasicama kretao se od 2,30 mg/kg do 78,35 mg/kg, a u domaćoj dimljenoj slanini sadržaj nitrita je bio od 4,5- 17,79 mg/kg.

Sadržaj nitrita u grubo usitnjenim barenim kobasicama proizvođača B, kretao se od 13,73–29,73 mg/kg, u dimljenim proizvodima od 12,19–71,49 mg/kg, a u konzervama od mesa u komadima 10,19–73,47 mg/kg.



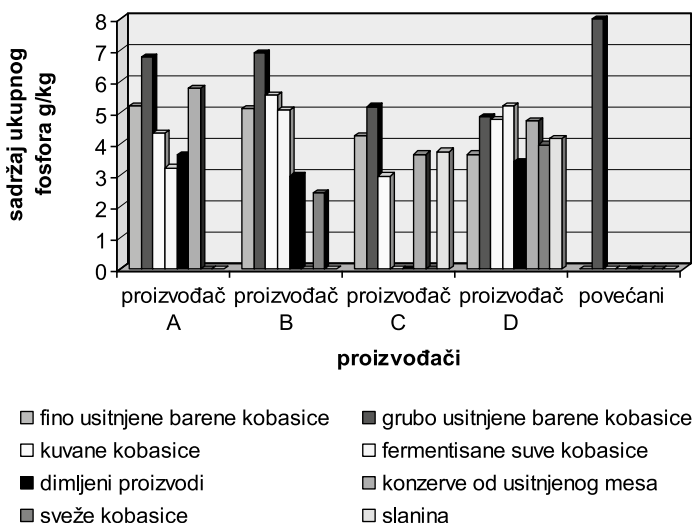
Grafikon 1. Sadržaj nitrita mg/kg u proizvodima proizvođača A, B, C i D

U kuvanim kobasicama proizvođača C sadržaj nitrita kretao se od 9,10–49,99 mg/kg nitrita, u grubo usitnjenim barenim kobasicama od 24,23–46,04 mg/kg, a u fino usitnjenim barenim kobasicama od 24,93 do 101,22 mg/kg. U grubo usitnjenim barenim kobasicama proizvođača D sadržaj nitrita je veoma varirao i kretao se od 15,62–60,97 mg/kg, a u fino usitnjenim barenim kobasicama od 22,42–46,49 mg/kg. Sveže kobasice imale su u proseku 38,87 mg/kg nitrita, kuvane kobasice 8,01 mg/kg, konzerve od mesa u komadima 59,37 mg/kg, fermentisane suve kobasice 9,91 mg/kg, a dimljeni proizvodi 7,20 mg/kg.

Iz Grafikona 1 se može videti da se najveći sadržaj nitrita izmeren u grubo usitnjenim barenim kobasicama, dok se u različitim grupama proizvođača različitih proizvođača ne razlikuje bitno. Povećan sadržaj nitrita izmeren samo u jednom uzorku (što iznosi 0,71%).

Sadržaj ukupnog fosfora u proizvodima od mesa proizvođača A, B, C i D prikazan je na Grafikonu 2.

Sadržaj ukupnog fosfora u uzorcima proizvođača A bio je od 3,86 g/kg do 6,67 g/kg, sadržaj ukupnog fosfora u uzorcima proizvođača B kretao se od 3,23–5,98 g/kg, u proizvodima od mesa proizvođača C sadržaj ukupnog fosfora kretao se od 2,34–6,02 g/kg, a u proizvodima od mesa proizvođača D sadržaj ukupnog fosfora bio je od 3,53–8,45 g/kg.



Grafikon 2. Sadržaj ukupnog fosfora g/kg

Od ukupno 140 ispitanih uzoraka, sadržaj ukupnog fosfora samo u dva uzorka (1,45%) nije odgovarao propisanim vrednostima Pravilnika (31/2012). Sadržaj ukupnog fosfora u proizvodima različitih proizvođača varira u zavisnosti od grupe proizvoda (Grafikon 2).

Prilikom kontrole kvaliteta proizvoda od mesa određuje se, pored ostalog, sadržaj ukupnih fosfata (sadržaj dodatih fosfata max 5 g/kg). Po novom Pravilnika (31/2012) ograničen je sadržaj ukupnog fosfora na 8 g/kg izražen kao P_2O_5 . Ukoliko je količina dodatih fosfata veća od 5 g/kg, kao posledica se javlja prooksidativni efekat i neprijatan adstringentan ukus proizvoda (Vuković i sar., 2004).

ZAKLJUČAK

Od ukupno 140 ispitanih uzoraka, sadržaj nitrita je samo u jednom uzorku (0,71%) bio veći od propisanih vrednosti. Sadržaj ukupnog fosfora je samo u dva uzorka (1,45%) bio veći od propisane vrednosti Pravilnika (31/2012). Na osnovu izvršenih ispitivanja može se zaključiti da proizvođači, uprkos razlici u obimu i načinu rada i kontrole, na pravilan način dodaju aditive u svoje proizvode.

LITERATURA

1. Vuković, I; Mirjana Milanović-Stevanović: Upotreba i deklarisanje aditiva u proizvodima od mesa – nova zakonska regulativa, *Tehnologija mesa* 45, 5-6, 212-218, 2004.
2. Pravilnik o kvalitetu i uslovima upotrebe aditiva u namirnicama i o drugim zahtevima za aditive i njihove mešavine, *Službeni list SCG*, br.56/2003, 5/2004 i 16/2005.
3. Pravilnika o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa, *Službeni list RS*, 31, 2012
4. SRPS ISO 2918/1999 – Meso i proizvodi od mesa. Određivanje sadržaja nitrita (Referentna metoda), Beograd, Savezni zavod za standardizaciju, 1999.
5. SRPS ISO 13730/1999 - Meso i proizvodi od mesa. Određivanje sadržaja ukupnog fosfora (Spektrometrijska metoda), Beograd: Savezni zavo za standardizaciju, 1999
6. Turubatović, L, Matekalo-Sverak, Vesna, Milanović-Stevanović, Mirjana: Uticaj aditiva, začina i dodatih sastojaka na bezbednost proizvoda od mesa, *Tehnologija mesa*, 47, 3-4, 89-96, 2006..
7. Prica N., Petrović J., Rackov O.: Sadržaj nitrita i ukupnog fosfora u proizvodima od mesa različitih proizvođača sa teritorije Južnobačkog i Sremskog okruga tokom 2006. godine. *Tehnologija mesa*, 225 – 229, 2007
8. Periši Nina, Paladin Jelka, Vulić Ana: Aditivi u mesu i proizvodima od mesa, *Veterinarska stanica* 41, 5, 409 – 420, 2010.
9. Pravilnik o deklarisanju i označavanju upakovanih namirnica, *Službeni list SCG*, br.4, 12, 48, 2004

Primljeno: 15.03.2012.
Odobreno: 20.05.2012.

Vektorske zoonoze PASA u Vojvodini

Savić Sara¹, Vidić Branka¹, Grgić Živoslav¹,
Jurišić Aleksandar², Čurčić Vladimir³,
Ruzić Maja⁴, Lolić Zoran⁵

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

²Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija

³„Bilja & Olja“, privatna veterinarska ambulanta, Novi Sad, Srbija

⁴Medicinski fakultet, Klinika za infektivne bolesti, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija

⁵„Leo“, privatna veterinarska ambulanta Novi Sad, Srbija

Kratak sadržaj

Istraživanja u polju vektorskih oboljenja i zoonoza u Srbiji su aktuelna poslednjih desetak godina. Kao posledica klimatskih promena regionu prisustvo pojedinih vektora i nekih uzročnika bolesti u njima se menja u odnosu na prethodni period. Vektori koji se najčešće mogu pronaći su krpelji, komarci, mušice, itd. Krpelji koji se mogu naći u regionu Vojvodine su *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Haemaphysalis punctata*. Najpoznatija oboljenja životinja koja se prenose krpeljima u Vojvodini su piroplazmoza, Q groznica i lajmska bolest. Prisustvo krepelja može da se utvrdi tokom cele godine u severnom delu Srbije (Vojvodina). Tokom proteklih pet godina različitim istraživanjima je utvrđeno da je 25-30% krepelja u Srbiji inficirano *Borrelia burgdorferi* s.l. Procenti se razlikuju od regiona do regiona. Takođe, zabeležen je izvestan broj kliničkih slučajeva lajmske bolesti kod ljudi i pasa. Procenat krepelja inficiranih sa *Borrelia burgdorferi* s.l. u Vojvodini se kreće od 25-28%. Analizom krepelja na odabranim urbanim lokalitetima izvršenom tokom tri godine, utvrđena je zaraženost krepelja od 25%. Tokom tog perioda je sakupljeno ukupno 1224 krepelja, sa različitih lokaliteta Vojvodine. Dominantna vrsta krepelja bila je *Ixodes ricinus* (62%). Komarci su takođe vektori koji mogu da se nađu često u Vojvodini tokom toplog perioda godine, od juna do oktobra. Oni mogu da prenose uzročnike raznih oboljenja kao što su bolest plavog jezika, infektivna anemija konja, dirofilarioza ljudi i pasa, itd. Dijagnostika dirofilarioze kod pasa u Srbiji je započeta pre 5 go-

¹ E-mail: sara@niv.ns.ac.rs

dina. Slučajevi dirofilarioze (*Dirofilaria immitis* i *Dirofilaria repens*) u Vojvodini su zabeleženi i kod ljudi i kod pasa. Prvi slučajevi oboljenja kod pasa su otkriveni kao slučajan nalaz tokom obdukcije. Prisustvo *Phlebotomina* ("mušice") je davno utvrđeno u južnim delovima Srbije, a ovi vektori su poznati u mediteranskim zemljama kao prenosioci lajšmanioze. U regionu Vojvodine još uvek nije utvrđeno njihovo prisustvo. U prethodnom periodu od tri godine je pronađeno više pasa sa kliničkim simptomima koji liče na lajšmaniozu (krvarenje iz nosa, kaheksija, blede sluzokože, promene na koži, slepilo, letargija) i sa seropozitivnim nalazom za isto oboljenje u centralnoj Srbiji i u Vojvodini. Prvi potvrđeni slučajevi lajšmanioze pasa su bili nakon infekcije u drugim zemljama, međutim tokom 2010-2011. godine ovakav nalaz pronađen kod nekoliko pasa koji nikad nisu napustili svoje mesto boravka. U periodu 2008 -2010. godina pregledani su uzorci krvi od 23 pasa u Načnom institutu za veterinarstvo "Novi Sad" na prisustvo specifičnih antitela protiv uzročnika lajšmanioze, serološkom metodom ELISA.

Ključne reči: vektorske zoonoze, lajm borelijoza, dirofilarioza, lajšmanioza

CANINE VECTOR-BORNE ZOONOSES IN VOJVODINA

Savić Sara¹, Vidić Branka¹, Grgić Živoslav¹,
Jurišić Aleksandar², Čurčić Vladimir³,
Ruzić Maja⁴, Lolić Zoran⁵

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad, Serbia

²Faculty of Agriculture, Novi Sad, Serbia

³„Bilja & Olja“, Private Veterinary Clinic, Novi Sad, Serbia

⁴Faculty of Medicine, Clinic for Infectious Diseases, University of Novi Sad, Serbia

⁵„Leo“, Private Veterinary Clinic, Novi Sad, Serbia

Abstract

Research on vectors and zoonoses in Serbia has been going on for more than a decade now. Due to the climate changes during the last years, the presence of vectors has changed and also the presence of zoonotic agents inside them has changed, too. Vectors that can be found are ticks, mosquitoes, flies, etc. Ticks that can be found in Vojvodina are *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*,

¹ E- mail: sara@niv.ns.ac.rs

Haemaphysalis punctata. The most common diseases known as tick borne in Vojvodina are piroplasmosis, Q fever and Lyme disease. The study done recently has shown that the presence of ticks can be found throughout the whole year in Northern part of Serbia (Vojvodina province). During the last five years different surveys have shown that ticks in Serbia are infected with *B. burgdorferi* s.l. at a rate of 25-30%, depending on the region. Also, a number of clinical cases of Lyme disease has been registered in humans and dogs. The percentage of ticks infected with *B. burgdorferi* s.l. in the province of Vojvodina ranges from 25-28%. An analysis of ticks in selected urban regions performed during a three-year period revealed an infection rate of 25%. During the three-year study period, a total of 1224 ticks were collected from different locations in Vojvodina. The dominant species was *Ixodes ricinus*, accounting for 62% of all collected ticks. Mosquitoes are another vectors that can be found in Vojvodina very often during the warm period of the year (June-October). Diseases that they can carry are blue tongue disease, equine infectious anemia, dirofilariosis in humans and dogs, etc. Diagnostic of dirofilariosis in Serbia begun some 4 years ago when *Dirofilaria* were found (*Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*) in dogs and later on in humans. First cases of dirofilariosis were found in dogs during the autopsy as a side finding. The presence of *Phlebotominae* has been detected in southern Serbia long time ago and they are known as vectors for leishmaniasis. Their presence has still not been detected in Vojvodina. Three years ago several dogs were found with clinical signs (epistaxis, cachexia, pale mucosa, skin lesions, blindness, lethargy) and seropositive finding for leishmaniasis in the central part of Serbia and Vojvodina. At first, all of the dogs were infected abroad, but since 2010, few dogs have been found that have never left their homes. During the period 2008-2010 in Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“ 23 dogs were examined for the presence of antibodies against leishmania by ELISA serological method.

Key words: vector borne zoonoses, lyme borreliosis, dirofilariosis, leishmaniasis

UVOD

Istraživanja u domenu infektivnih bolesti pasa većinom obuhvataju bolesti koje drastično ugrožavaju populaciju pasa. Međutim, ima infektivnih bolesti koje se javljaju kod pasa ređe, klinički simptomi nisu izraženi i nisu karakteristični. Ove bolesti mogu biti zoonoznog karaktera, pa time predstavljaju opasnost i za javno zdravlje, a psi su u tom slučaju rezervoari infekcije. Za prenošenje nekih bolesti između pasa i sa pasa na ljude, potrebni su vektori

u kojima se odigrava i deo životnog ciklusa uzročnika oboljenja. Istraživanja vektorskih oboljenja u našem regionu su intenzivirana u poslednjih desetak godina. Klimatske promene tokom poslednjih dešetak godina dovode do promena u sezonskoj pojavi različitih vektora, do promene u broju vektora, kao i do pojave različitih uzročnika zoonoza. Najčešći vektori kojima se poklanja najveća pažnja su krpelji, komarci i mušice.

Krpelji koji mogu da se nađu na teritoriji Vojvodine su *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Haemaphysalis punctata* (Jurišić, 2008). Prema poslednjim istraživanjima krpelji na regionu Vojvodine mogu da se nađu tokom cele godine - izgubila se sezonalnost pojave krpelja. Najpoznatije bolesti pasa koje prenose krpelji u Vojvodini su piroplazmoza (babezioza) i lajmska bolest. Lajmska bolest je zoonozno oboljenje koje se može javiti kod pasa, a uzročnika je *Borrelia burgdorferi* s.l. prenosi krpelj *Ixodes ricinus* vrste. Različita istraživanja tokom poslednjih pet godina ukazuju na podatke da su krpelji u Srbiji zaraženi uzročnikom lajmske bolesti u procentu od 25-30% u zavisnosti od regiona (Milutinović et al., 2004; Milutinović et al., 2008; Cekanac et al., 2009), a u Vojvodini 25-28% (Savić et al., 2007). Klinički slučajevi lajmske bolesti su registrovani i kod ljudi i kod pasa (Dmitrović, 1993; Savić-Jevđenić et al., 2008). Analizom krpelja u urbanim delovima Vojvodine otkrivena je inficiranost 25% (Jurišić, 2008).

Komarci su druga vrsta vektora koji su interesantni i brojni u Vojvodini. Oboljenje koje oni prenose na pse je dirofilarioza, koja takođe može da se prenese i na ljude. Dokazivanje dirofilarioze kod pasa počinje tokom 2000. godine, ali se kao deo redovne laboratorijske dijagnostičke prakse primenjuje tek krajem 2006. i to samo u većim gradovima, odnosno urbanim sredinama. Dirofilarioza je otkrivena najpre kod pasa, a kasnije i kod ljudi u Vojvodini. Komarci su uglavnom prisutni tokom toplog dela godine, od juna do oktobra meseca, ali je moguće da se nađu i u rano proleće ili kasnu jesen, u zavisnosti od godine. Kod pasa u Vojvodini mogu da se nađu i *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*. U početku je dirofilarioza otkrivana samo kao sporedan nalaz tokom obdukcije pasa, a dijagnostikovana je kao srčana mana ili se javljala u vidu promena na koži. Prvi podaci o dirofilariozi u Srbiji (bivšoj Jugoslaviji) su objavljeni tokom 90-tih godina prošlog veka, kada su otkriveni prvi slučajevi oboljenja kod ljudi i pasa (Kulišić et al., 1989; 1994; 1995; Dimitrijević, 1999). Tokom narednih godina urađen je čitav niz istraživanja na prisustvo dirofilarioze, o seroprevalenci kod pasa, dijagnostičkim metodima, terapiji, slučajevima kod ljudi i sl. (Lalošević, 2004; Savić-Jevđenić et al., 2004, 2006; Tasić et al., 2003, 2007; Dorđević et al., 2010; Spasojević-Kosić et al., 2011). Za područje Vojvodine rađeno je više istraživanja tokom poslednjih sedam godina u vezi sa pojavom dirofilarioze, seroprevalence (Savić-Jevđenić et al., 2006; 2007; Tasić

et al., 2008; Pajković et al., 2011), dijagnostičkih metoda (Savić-Jevđenić et al., 2004; Savić et al., 2009). Među uzročnicima dirofilarioze pronađeni su *Dirofilaria repens* (Džamić et al., 2009; Tasić et al., 2007) i *Dirofilaria immitis*.

Lajšmanioza je zoonozno oboljenje koje se može naći kod pasa i ljudi. Ovo oboljenje se u Evropi uglavnom javlja u mediteranskim zemljama – Grčka, Italija, Crna Gora, u kojima ima i vektora za ovo oboljenje. Bilo je slučajeva da se bolest javila kod pasa koji su putovali u neku od ovih zemalja sa svojim vlasnicima, uglavnom tokom godišnjih odmora, kada je nastala infekcija. Razvoj bolesti i pojava kliničkih simptoma bi se desio po povratku, ali nijedna od ovih infekcija nije bila autohtone prirode. Klinički simptomi mogu biti veoma različiti (letargija, kaheksija, promene na koži, preveliki nokti, slepilo...), a s obzirom da se oboljenje retko javlja, veterinari i vlasnici često previde da je možda u pitanju lajšmanioza.

MATERIJAL I METODE

Za utvrđivanje lajmske bolesti kod pasa materijal su predstavljali 16 pasa sa kliničkim simptomima karakterističnim za lajmsku bolest koji su dolazili kod veterinara u veterinarske ambulante. Osim kliničkih simptoma koji su posmatrani, rađene su i serološke analize ELISA metodom i brzim testom, na prisustvo specifičnih antitela protiv *Borrelia burgdorferi* s.l.

Dirofilarioza je praćena na uzorcima 71 psa od kojih nisu svi imali kliničke simptome oboljenja, tokom perioda od tri godine. Serološka dijagnostika uzoraka krvi pasa na prisustvo specifičnih antitela protiv *Dirofilaria* je rađena metodom ELISA, a prisustvo mikrofilaria u cirkulaciji je utvrđeno modifikovanim Knott-ovim testom.

Na lajšmaniozu su pregledana 23 psa sa različitim kliničkim simptomima tokom perioda od tri godine. Serološka dijagnostika uzoraka krvi ovih pasa na prisustvo specifičnih antitela protiv *Leishmania* je rađena ELISA metodom.

REZULTATI I DISKUSIJA

Lajmska bolest pasa: Kod 16 posmatranih pasa su utvrđeni sledeći klinički simptomi: hramanje, teško hodanje, hramanje koje se ponavlja i nije uvek na istim ekstremitetima, gubitak apetita, opšta malaksalost, povremeno povišenje telesne temperature od 39,5-40°C uz anamnestičke podatke dobijene od vlasnika kao što su prisustvo krpelji na telu životinje, ubod krpelja u poslednjih 2 meseca - za koje se smatra da mogu biti simptomi lajmske bolesti. Klinički simptomi, uz anamnestičke podatke, ukazivali su na oboljenje od lajmske bolesti. Nakon uočavanja kliničkih simptoma i potvrdne serološke dijagnostike,

kod ovih pasa sprovedena je terapija. Šest od ovih pasa su bili na nespecifičnoj antibiotskoj terapiji širokog spektra pre analize uzorka krvi, koja nije imala uspeha, a simptomi, uglavnom hramanje, su se ponovili nakon prekida terapije.

U Tabeli 1 dati su rezultati analize krvnih seruma pasa grupe II na lajm boreliozu. Serološkom dijagnostikom dobijen je pozitivan serološki nalaz kod 14 pasa na *B. burgdorferi* s.l. ELISA metodom i kod 13 pasa brzim testom. Kod dva psa nije ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv *B. burgdorferi* s.l. nijednom od navedenih metoda. Kod istih 13 pasa ustanovljeno je prisustvo specifičnih antitela protiv *B. burgdorferi* s.l., odnosno pozitivan serološki nalaz sa obe metode.

Tabela 1 – Prikaz rezultata pregleda krvnih seruma pasa na prisustvo specifičnih antitela protiv *B. burgdorferi* s.l. dobijenih primenom testa ELISA i brzog testa

Ukupan broj pasa - uzoraka	Broj pasa – uzoraka sa pozitivnim nalazom na <i>B. burgdorferi</i> s.l. brzim testom	Broj pasa – uzoraka sa pozitivnim nalazom na <i>B. burgdorferi</i> s.l. ELISA testom
16	13 (81,25%)	14 (87,5%)

Nakon postavljanja dijagnoze lajmske bolesti 4 psa su lečena primenom antibiotika: doksiciklin, u periodu od 14 dana, ili longacef 20 dana, a zatim vibramicin tokom 20 dana. Nakon terapije ponovljena je analiza krvi na prisustvo specifičnih antiela protiv *B. burgdorferi* s.l. ELISA metodom i kao rezultat su dobijene manje vrednosti nivoa specifičnih antitela. Dobijene vrednosti serološkog nalaza su prema uputstvu proizvođača tumačene kao negativan serološki nalaz (kod 2 psa) i na granici sa sumnjivim (kod 2 psa), na prisustvo specifičnih antitela protiv *B. burgdorferi* s.l., odnosno kod ponovljenih analiza serološki nalaz više nije bio pozitivan na lajm boreliozu. Kontrolna analiza je vršena najmanje mesec dana nakon prve analize, a posle tog perioda tretirani psi više nisu imali kliničke simptome bolesti karakteristične za lajmsku bolest. Zbog odsustva kliničkih simptoma vlasnicima posmatranih pasa više nije bilo u interesu da se serološke analize ponavljaju, tako da psi nisu dalje pregledani.

Brzi test može da se koristi kao skrining test u brzom dijagnostici lajmske bolesti pasa. Kod sumnje na lajmsku bolest pasa sa kliničkim simptomima ili u rutinskoj dijagnostici, treba uvek prvo primeniti brzi test. Svaki pozitivan nalaz treba potvrditi nekim od osetljivijih metoda (ELISA). Ako je uzorak seruma negativan, a klinički simptomi ipak postoje, analizu takođe treba ponoviti nekom od osetljivijih metoda (ELISA) u određenom vremenskom intervalu, radi dobijanja potpunije i sigurnije dijagnoze. Mnogi autori smatraju da je ELISA

najpogodniji metod za vršenje monitoringa i kliničko praćenje lajmske bolesti u populaciji pasa, zbog visoke osetljivosti i objektivnosti rezultata (Magnarelli et al., 1988; Goosens et al., 2000).

Osnovni parametri za uspešno postavljanje dijagnoze na lajmsku bolest kod pasa su:

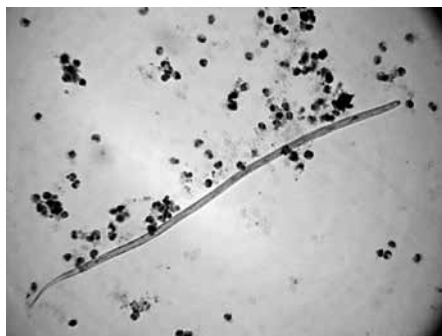
- klinički simptomi/znaci oboljenja (kao što su hramanje, bolovi u zglobovima, otežano kretanje i opšta malaksalost);
- epizootiološki podaci (prisustvo zaraženih krpelja i obolelih pasa u regionu), povoljan odgovor na antibiotsku terapiju protiv lajmske bolesti;
- prisustvo specifičnih antitela protiv *B. burgdorferi s.l.* u tkivnim tečnostima obolelih životinja.

Dirofilarioza: Nakon više slučajeva dirofilarioze pasa koja je otkrivena tokom obdukcije pasa, kao slučajan nalaz, počelo se sa rutinskom dijagnostikom dirofilarioze pasa u Vojvodini, različitim metodama – modifikovanom Knott-ovim testom i ELISA testom.



Slika 1 – Odrasli oblici *Dirofilaria* pronađeni tokom obdukcije uginulog psa sa kliničkim simptomima srčane mane (Pajković, 2011)

Tokom perioda od tri godine pregledano je 49 uzoraka krvi pasa koji nisu imali kliničke simptome, na prisustvo specifičnih antitela protiv *Dirofilaria* i na prisustvo mikrofilarija. Kod 9 pasa utvrđeno prisustvo mikrofilarija, što predstavlja seroprevalencu od 18%.



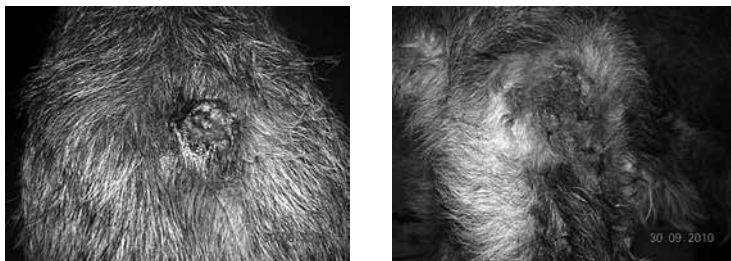
Slika 2 – Mikrofilarija *Dirofilaria* u uzorku krvi psa modifikovanim Knott-ovim testom (Pajković, 2011)

Knott-ov test je brz i pouzdan test za otkrivanje mikrofilarija u cirkulaciji pasa. Za dijagnostiku prisustva odraslih oblika u srcu neophodno je koristiti neku od seroloških metoda kao što je ELISA, kojom se utvrđuje postojanje specifičnih antitela protiv *Dirofilaria*. Za rutinsku dijagnostiku u veterinarskim ambulantama mogu da se koriste i brzi testovi, ali kod pozitivnog nalaza ili postojanja kliničkih simptoma mora se uraditi i potvrda dijagnoze ELISA metodom ili modifikovanim Knott-ovim tetom kojim može i da se uradi identifikacija *Dirofilaria immitis* ili *Dirofilaria repens* (Savić-Jevđenić et al., 2004; Savić et al., 2009). S obzirom na sve češću pojavu ovog oboljenja kod pasa, sve je više zahteva i veterinara i vlasnika da se uradi kontrola na dirofilariozu prilikom rutinskog pregleda pacijenta, jer je odsustvo kliničkih simptoma moguće dug vremenski period. Tokom posmatranog perioda često su dijagnostikovani slučajevi dirofilarioze kod pasa u Vojvodini i time preventivna terapija protiv dirofilarioze postaje sve više obavezna u našem regionu.

Sve je jača svest i o tome da je ovo oboljenje i zoonoza, odnosno da postoji opasnost i po javno zdravlje. Slučajevi humane dirofilarioze takođe postoje u Vojvodini, ali se još uvek nemaju u vidu tokom dijagnostike. Lekari još uvek nisu potpuno upoznati sa dijagnostikom dirofilarioze kod ljudi, a takođe još uvek nema ni neinvazivnih dijagnostičkih protokola na tržištu (Đorđević et al., 2010).

Lajšmanioza: Tokom perioda od tri godine pregledano je više pasa sa kliničkim simptomima koji su ličili na simptome nekih drugih bolesti, ali simptomatsko lečenje nije imalo dugoročno kvalitetne rezultate. Nakon urađenih seroloških pretraga dobijeni su pozitivni nalazi na lajšmaniozu. Na početku istraživanja su svi slučajevi obolelih pasa bili inficirani u inostranstvu, ali od 2010. godine javljaju se slučajevi oboljenja pasa sa kliničkim simptomima koji mogu da se tumače kao lajšmanioza, ali ti psi nisu nikad napuštali svoje mesto

boravka. Tokom trogodišnjeg perioda pregledano je 23 uzorka krvi pasa, na prisustvo specifičnih antitela protiv *Leishmania*, ELISA metodom. Od ukupnog broja pasa 21 pas je proveo neko vreme u nekoj od mediteranskih zemalja (Italija, Grčka ili Crna Gora), dok dva psa nisu nikad napustili svoje mesto boravka (Novi Sad). Kod ukupno šest pasa je utvrđen pozitivan serološki nalaz na lajšmaniozu, a tri psa su imala kliničke simptome lajšmanioze. Dva psa koji nikad nisu boravili u inostranstvo su imali kliničke simptome – epistaksija, kaheksija, blede sluzokože, promene na koži, slepilo, letargija i pozitivan serološki nalaz.



Slika 3 – Promene na koži kod psa sa pozitivnim serološkim nalazom na lajšmaniozu

U Vojvodini postoje ozbiljni razlozi za sumnju da se lajšmanioza javlja kao oboljenje. S obzirom da još uvek nije utvrđeno prisustvo vektora, ostaje prostora za dalja istraživanja čvrstih dokaza da je lajšmanioza, zapravo, prisutna u našo zemlji. Zbog klimatskih promena letnje temperature u Vojvodini sve više pogoduju razvojnom ciklusu *Phlebotomina* i traju dovoljno dugo tokom leta.

Aknowledgements

This work was supported by a grant 31084 from the Ministry of Education and Science of Serbia.

LITERATURA

1. Cekanac R., Pavlović N., Gledović Z., Grgurević A., Stajković N., Lepsanovic Z., Ristanović E.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Belgrade area, *Vector Borne Zoonotic Disease*, Dec 18, 2009
2. Dimitrijević S.: *Dirofilarioza ante portas*. In: *Clinica Veterinaria* 1, Proceedings, 58, 1999
3. Dmitrović R, Popović N (1993) „Lajmska bolest“, *Veterinarski glasnik* 1-2, Vol 47, 59-63

4. Džamić A.M., Čolović I.V., Arsić-Arsenijević V.S., Stepanović S., Boričić I., Džamić Z., Mitrović S.M., Rašić D.M., Stefanović ., Latković Z., Kranjčić-Zec I.F.: Human *Dirofilaria repens* infection in Serbia, *Journal of Helminthology*, 83, 129-137, 2009
5. Đorđević J., Tasić S., Miladinović-Tasić N., Tasić A.: Diagnosis and clinical value of human dirofilariosis (serb), *Acta facultatis medicae Naissensis*, 27, 2, 81-84, 2010
6. Jurišić A.: Krpelji-prenosioci uzročnika bolesti kod ljudi i životinja, monografija, Biblioteka Akademia, Beograd: Zadužbina Andrejević, 2008.
7. Kulišić Z., Kranjčić-Zec I., Mitrović S., Radojičić B.: New case of human dirofilariosis in Yugoslavia (serb). U: Zbornik radova, 6. Kongres mikrobiologa Jugoslavije Maribor, 1989.
8. Kulišić Z., Milosavljević P.: Modern techniques in diagnostic of dirofilariosis in dogs (serb), *Veterinarski glasnik*, 48, 9, 745-749, 1994.
9. Kulišić Z., Mišić Z., Milosavljević P., Popović N.: Dirofilariosis in dogs in Yugoslavia (serb). U: Zbornik radova, 8. Savetovanje veterinara Srbije, Zlatibor, 1995.
10. Lalošević D.: *Dirofilaria* spp parasite like in mesenterium removed by surgery (serb), *Medicinski pregled*, 5-6, 307-8, 2004.
11. 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 Applied Acarology*, 45, 171-183, 2008.
12. Milutinović M., Radulović Ž., Jovičić V., Oreščanin Z.: Population dynamics and *Borrelia burgdorferi* infection rate of *Ixodes ricinus* ticks in the Belgrade area, *Acta Veterinaria*, 54, 2-3, 219-225, 2004.
13. Pajković D., Savić S., Veljković P., Grgić Ž.: Study on dirofilariosis in military dogs of Serbian army (serb), U: Zbornik radova, Prvi internacionalni epizootiološki dani, 6-9. april 2011. godine, Sijarinska banja, Lebane, 68-69, 2011
14. Savić S., Grgić Ž., Vujkov B., Fenjac I., Pajković D., Žekić M.: Diagnostic of dirofilariosis by ELISA method and modified Knott test (serb), *Arhiv veterinarske medicine*, ISSN 1820-9955, 71-77, 2009
15. Savić-Jevđenić S., Grgić, Ž., Vidić B., Petrović A.: Lyme disease – the great imitator, *Biotechnology in animal husbandry*, 23, 5-6, 215-221, 2007.
16. Savić-Jevđenić S., Vidić B., Grgić Ž., Jurišić A., Lako B.: Lyme borreliosis in hunting dogs. In: Book of Proceedings, VI international Conference on ticks and tick-borne pathogens, TTP-6, Buenos Aires, Argentina, 317, 2008
17. Savić-Jevđenić S., Milovanović A., Grgić Ž., Kojić S.: Outspread of dirofilariosis in Novi Sad region-six years later (serb) U: Zbornik kratkih sadržaja, VIII epizootiološki dani sa međunarodnim učešćem, Banja Vrdnik, 60, 2006.

18. Savić-Jevđenić S., Vidić B., Grgić Ž., Lolić Z.: The appearances of dirofilariosis in Serbia - Vojvodina. In: Proceedings, First European Dirofilaria Days, Zagreb, Croatia, 202, 2007.
19. Savić-Jevđenić S., Vidić B., Grgić Ž., Milovanović A.: Fast diagnostic of dirofilariosis in novi Sad region (serb), *Veterinarski glasnik*, 693-698, 2004.
20. Spasojević-Kosić Lj., Lalošević V., Lalošević D., Naglić A.: Heart worm disease – clinical case in dog, *Veterinarski glasnik*, 65, 3-4, 257-267, 2011
21. Tasić A., Rossi L., Tasić S., Miladinović-Tasić N., Ilić T., Dimitrijević S.: Survey of canine dirofilariosis in Vojvodina, Serbia, *Parasitol Res*, 103, 1297-1302, 2008.

Primljeno: 15.06.2012.

Odobreno: 23.06.2012.

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. Skraćeenice 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 skraćeenice 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 skraćeenice, 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 skraćeenice, 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 poleđini svake fotografije treba napisati redni broj i strelicom označiti gornji deo slike. Za svaki primerak rukopisa dostaviti po jednu sliku.

Poglavljja rada

Poglavljja 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

Rumenački 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 bellow the graph..

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

Photographs number with the Arabic numerals (bellow 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
Rumenacki put 20, tel. 021/ 4895392, e-mail: arhiv@niv.ns.ac.rs