

UDK 619

ISSN 1820-9955

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”
Novi Sad

Arhiv veterinarske medicine

Arh. vet. med.	vol. 4	br. 1	str. 1-88	Novi Sad, 2011.
----------------	--------	-------	-----------	-----------------

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

Originalan rad

UDK 619:591.469

UTICAJ STRATUM CORNEUM-A DUCTUS PAPILLARIS-A NA OČUVANOST PARENHIMA VIMENA KRAVA*

Ivana Davidov¹, Miodrag Radinović¹, Dragica Stojanović²

¹Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad

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

Kratak sadržaj

Od 26 krava Holštajn-frizijske rase koje su iz različitih etioloških razloga isključene iz proizvodnje, uzimali smo vimena u cilju praćenja pojava patomorfoloških promena u parenhimu vimena krava. Nakon makroskopskog pregleda vimena, uzeti su vrhovi papila radi dobijanja podataka o debljini stratum corneum-a i duktus papillaris-a i uzorci iz parenhima veličine 1 cm², radi dalje histološke analize. Debljina stratum corneum-a u 104 pregledana ductus papillaris-a je varirala od 90 do 370 μm. Histološkim pregledom 104 parenhima vimena krava, 25 (24,04%) parenhima je imao vrlo visoku leukocitarnu infiltraciju. Statističkom obradom podataka se uočava postojanje negativne korelacije, koja ukazuje da sa povećanjem debljine stratum corneum-a duktus papillaris-a dolazi do pada leukocitarnog infiltrata u parenhimu vimena krava. Ovi rezultati ukazuju da na očuvanost parenhima vimena krava veliki uticaj ima stratum corneum ductus papillaris-a.

Ključne reči: parenhim, ductus papillaris, vime, krava

RELATIONSHIP BETWEEN STRATUM CORNEUM OF DUCTUS PAPILLARIS AND UDDER PARENCHYMA IN COWS

Ivana Davidov¹, Miodrag Radinović¹, Dragica Stojanović²

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

²Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad

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

¹E-mail: ivanadav@polj.uns.ac.rs

Abstract

From 26 cows of Holstein-Friesian, which had been excluded from production for different etiologic reasons, the udder was taken in order to monitor the changes that appeared in cow's udder parenchyma. After macroscopic examination, the tops of papillae were taken to obtain an information on the thickness of a stratum corneum of ductus papillaris and the samples from the parenchyma size 1 cm² were used for further histological analysis. The thickness of stratum corneum in 104 ductus papillaris varied from 90 to 370 µm. Histological examination of 104 cow's udder parenchyma, 25 (24.04%) parenchyma had a very high leukocyte infiltration. Using statistical data processing the existence of negative correlation was observed, indicating that with increasing the thickness of the stratum corneum of ductus papillaris there was a decline in the leukocyte infiltrates in cow's udder parenchyma. Our results indicate that stratum corneum of ductus papillaris influences the udder parenchyma.

Key words: parenchyma, ductus papillaris, udder, cow

UVOD

Ductus papillaris predstavlja primarnu fizičku i hemijsku barijeru i time sprečava prodor mikroorganizmima u unutrašnjost vimena. U pauzi između dve muže, glatki kružni mišić, koji obmotava ductus papillaris, polako se kontrahuje pri čemu približava stratum corneum jedne i druge strane i tako omogućava prodor bakterijama u lumen kanala (Paulrud, 2005). Izgled, a samim tim i očuvanost završetka papile je važan faktor u sprečavanju bakterijske kolonizacije u parenhimu vimena krava. Menjanjem izgleda ductus papillaris-a, a pogotovo njegovog stratum corneum-a dolazi do slabljenja prve linije odbrane i do prodora mikroorganizama u parenhim vimena krava (Davidov, 2010; Paulrud, 2005; Boboš i Vidić, 2005). Promene u tkivu ductus papillaris-a nastaju već posle treće laktacije (Boboš i Vidić, 2005) i dovode do promene i u debljini keratinskog sloja ductus papillaris-a tj. stratum corneum-a (Davidov, 2010; Paulrud, 2005). Takođe na izgled i funkciju ductus papillaris-a utiču izgled ostium papillae, pozicija i dužina papila, broj i stadijum laktacije i produkcija mleka (Avdić i sar., 2008). Ductus papillaris je obložen slojem keratina i predstavlja ulaznicu mikroorganizama koji mogu da dovedu do pojave oboljenja mlečne žlezde. Uklanjanjem keratina tj. stratum corneum-a iz ductus papillaris-a lako dolazi do pojave patomorfoloških promena u parenhimu vimena krava. Millar i sar. (1992) su ispitivali da li se komponente keratina

razlikuju između mamarnih kompleksa sa i bez infekcije. Takođe su poredili i količinu keratina između kliničkih i subkliničkih mastitisa sa neinfektivnim mamarnim kompleksima. Zaključili da ne postoji razlika u komponentama keratina između subkliničkih mastitisa i neinfektivnih mamarnih kompleksa i da je količina ketarina neznatno bila manja kod subkliničkih mastitisa u odnosu na neinfektivne mamarne komplekse. Stratum corneum debljine od 0 do 100 μm , dovodi do povećanja leukocitarne infiltracije u cisterni i parenhimu vimna krava, što rezultira nastanak subkliničkih mastitisa (Davidov, 2010).

Ako mikroorganizmi prođu prvu liniju odbrane - ductus papillaris i prodru u cisternu, susreću se sa drugom linijom odbrane koju čine polimorfonuklearni leukociti, makrofagi, različite klase imunoglobulina i komponente komplementa. Najvažnije fagocitne ćelije mlečne žlezde su polimorfonuklearni leukociti i makrofagi. Makrofaga ima više u neinficiranom, a polimorfonuklearnih leukocita u inficiranom vimenu krava. Makrofagi, a posebno polimorfonuklearni leukociti, proizvode superoksid koji ima baktericidno dejstvo. Pored toga, makrofagi stimulišu aktivnost polimorfonuklearnih leukocita (Shearer i Harris, 2003).

Usled relativne anatomske nezavisnosti četiri dela vimena krava, infektivne upale su uglavnom ograničene na jednu četvrt, ali često dolazi do proširenja oboljenja i na druge četvrti. Zadnje četvrti dominiraju u pogledu učestalosti infekcija. U skladu sa građom vimena krava, anatomska manifestacija upalnih procesa je različita (Boboš, 2005).

Prema Trinidad i sar. (1990), histološka ispitivanja su dragocena u otkrivanju stepena oštećenja tkiva mlečne žlezde krava, koju izazivaju patogeni mikroorganizmi.

MATERIJAL I METOD

Od 26 krava Holštajn-frizijske rase koje su iz različitih etioloških razloga isključene iz proizvodnje, uzeta su vimena u cilju praćenja pojava patomorfoloških promena u parenhimu vimena krava. Posle klanja sa trupa krava su ostrim mesarskim nožem odstranjena vimena, koja su pakovana u sterilne plastične vreće i zatim su transportovana u patološku laboratoriju na dalja ispitivanja. Nakon makroskopskog pregleda vimena, uzeti su vrhovi papila radi dobijanja podataka o debljini stratum cornu-a i ductus papillaris-a i uzorci iz parenhima veličine 1 cm^2 radi dalje histološke analize. Svi uzorci su fiksirani u puferizovanom 10% rastvoru formalina, potom dehidrirani kroz seriju etanola rastuće koncentracije i prožeti ksilolom kao medijumom za uvođenje parafinskog voska - sredstva za kalupljenje. Napravljeni parafinski kalupi su sečeni na mikrotomu debljine 5 μm , deparafinisani i bojeni

hematoksilin eozinom. Tokom histološkog pregleda preparati su posmatrani u celini, a sva mikroskopiranja su vršena svetlosnim mikroskopom i fotografisana digitalnim fotoaparatom Canon.

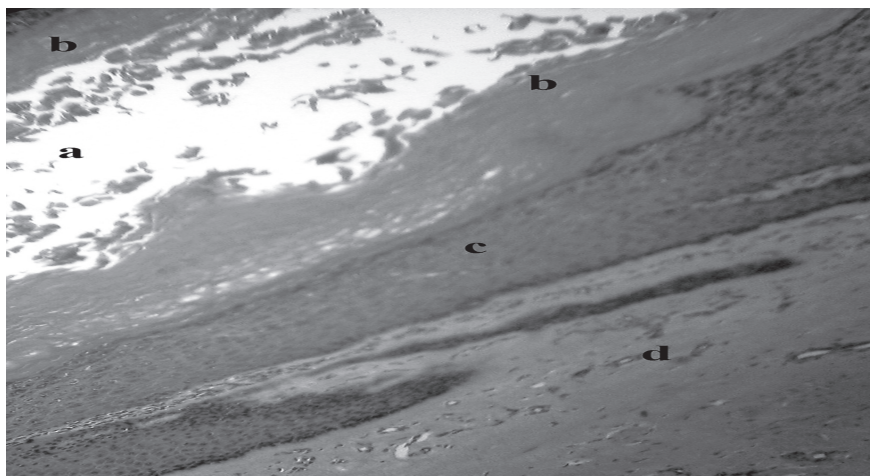
REZULTATI I DISKUSIJA

U našim ispitivanjima smo zabeležili da je debljina stratum corneum-a u 104 pregledana ductus papillaris-a varirala od 90 do 370 μm , što odgovara nalazima i drugih autora (Davidov, 2010; Paulrud, 2005; Boboš i Vidić, 2005).

Od ukupno 104 histološki pregledanih papila 39 (37,5%) su imale debljinu stratum corneum-a od 201 μm do 300 μm , a samo 8 (7,7%) histološki pregledanih papila su imale debljinu stratum corneum-a od 0 do 100 μm (Tabela 1, Slika 1).

Tabela 1. Razultati merenje debljine stratum corneum-a u papilama vimena krava

stratum corneum-debljina	papillae	
	broj	%
0-100 μm	8	7,70
101-200 μm	23	22,11
201-300 μm	39	37,50
301-400 μm	34	32,69
	104	100



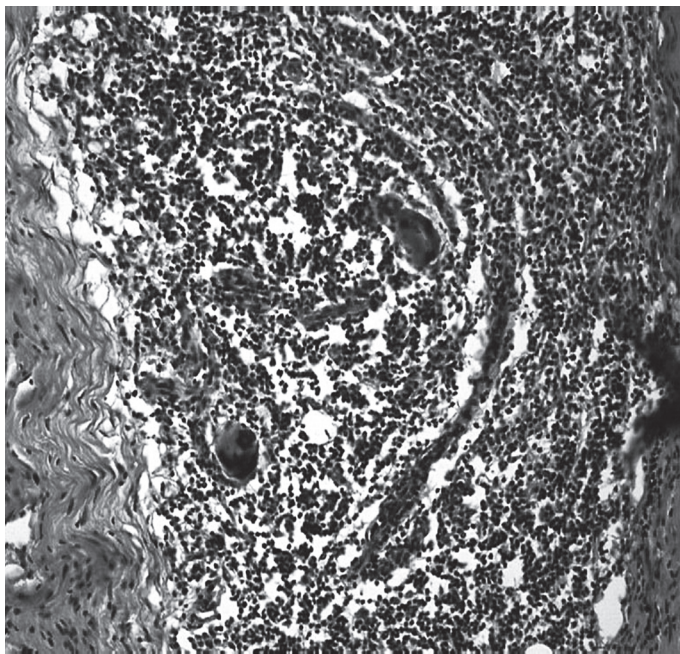
Slika 1. Ductus papillaris: a) lumen kanala, b) stratum corneum, c) stratum epithelialis, d) stratum muscularis

Debljina stratum corneum-a ductus papillaris-a od 0 do 100 μm predstavlja najtanji sloj lactosebum-a, koji je uslovio pojavu patohistoloških promena parenhimu vimena krava (Tabela 2).

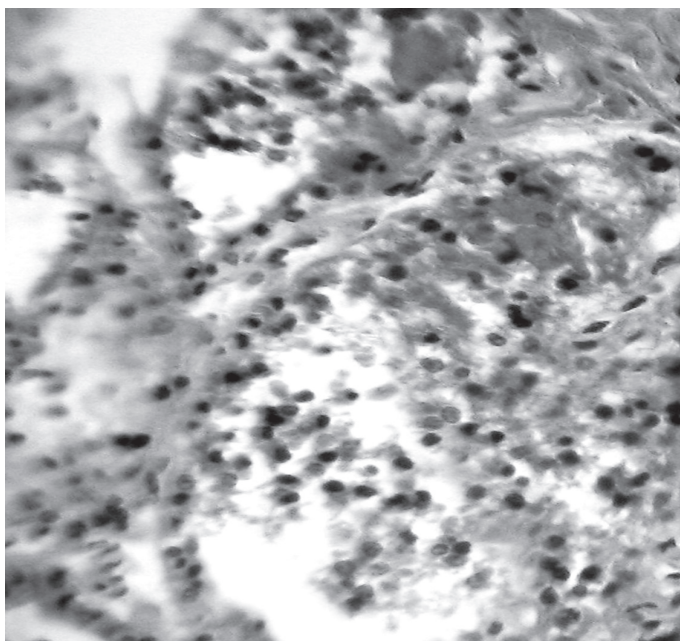
Tabela 2. Rezultati nalaza patohistoloških promena u parenhimu vimena krava u odnosu na debljinu stratum corneum-a ductus papillaris-a

<i>debljina stratum corneum-a ductus papillaris-a</i>	leukocitarni infiltrat parenhima				ukupno
	0-25%	25,1-50%	50,1-75%	75,1-100%	
0-100 μm					
broj mamarnih kompleksa	7	10	41	23	81
% mamarnih kompleksa	6,73%	9,61%	39,42%	22,11%	77,87%
101- 200 μm					
broj mamarnih kompleksa	5	7	2	2	16
% mamarnih kompleksa	4,81%	6,73%	1,93%	1,93%	15,4%
201- 300 μm					
broj mamarnih kompleksa	2	1	1	0	4
% mamarnih kompleksa	1,93%	0,96%	0,96%	0%	3,85%
301- 400 μm					
broj mamarnih kompleksa	1	1	1	0	3
% mamarnih kompleksa	0,96%	0,96%	0,96%	0%	2,88%
ukupan broj mamar-nih kompleksa	15	19	45	25	104
ukupan %	14,42%	18,27%	43,27%	24,04%	100%

Najveća leukocitarna infiltracija parenhima vimena krava (Slika 2) je u 81 (77,87%) četvrti vimena, sa debljinom stratum corneum-a ductus papillaris-a od 0 do 100 μm , od ukupno 104 histološki pregledanih parenhima, što se slaže sa rezultatima i drugih autora (Paulrud, 2005; Davidov, 2010), dok je u 3 (2,88%) parenhima vimena sa debljinom stratum corneum-a ductus papillaris-a od 301 do 400 μm bila najmanja leukocitarna infiltracija (Slika 3), što je prikazano u Tabeli 2.



Slika 2. Parenhim vimena krava sa najvećom leukocitarnom infiltracijom (HE x40)



Slika 3. Parenhim vimena krava sa najmanjom leukocitarnom infiltracijom (HE x40)

Tabela 3. Testiranje korelacije debljine stratum corneum-a ductus papillaris-a i leukocitarnog infiltrata parenhima vimena krava

debljina <i>stratum corneum</i> -a	leukocitarni infiltrat parenhima			
	0-25%	25,1-50%	50,1-75%	75,1-100%
0-100 μm	7	10	41	23
101-200 μm	5	7	2	2
201-300 μm	2	1	1	0
301-400 μm	1	1	1	0
	-0.9845	-0.94673	-0.78739	-0.81793

Statističkom obradom podataka u Tabeli 3 se uočava da postoji negativna korelacija, koja ukazuje da sa povećanjem debljine stratum corneum-a ductus papillaris-a dolazi do pada leukocitarnog infiltrata u parenhimu vimena krava.

ZAKLJUČAK

Dobijeni rezultati ukazuju da postoje variranja u debljini stratum corneum-a ductus papillaris-a i da ta variranja imaju uticaja na očuvanost parenhima vimena krava. Što je stratum corneum ductus papillaris-a tanji to je veća leukocitarna infiltracija u parenhimu vimena krava. Na osnovu izvršenih ispitivanja može se zaključiti da postoji značajna povezanost, kako anatomska tako i funkcionalna, između stratum corneum-a ductus papillaris-a sa parenhimom vimena krava.

LITERATURA

1. Avdić, R., Arnautović, I., Pobrić, H., Tandir, F.: Dužina sisinog kanala u odnosu na oblik vrha papile. Veterinaria, Sarajevo 57, 44-54, 2008.
2. Boboš S., Vidić B.: Mlečna žlezda preživara, Novi Sad: Naučni institut za veterinarstvo, 2005.
3. Davidov I.: Značaj dužine i debljine ductus papillaris-a na pojavu patomorfoloških promena vimena krava. Fakultet veterinarske medicine, Departman za veterinu, Magistarska teza, 2010.
4. Miller, R. H., Bitman J., Bright, S. A., Wood D. L. and Capuco, A. V.: Effect of clinical and subclinical mastitis on lipid composition of teat canal keratin. Journal of Dairy Science, 75, 1436-1442, 1992.

5. Paulrud, C.O.: Basic Concept of the Teat Canal. *Veterinary Research Communication*, 29, 215-245, 2005.
6. Shearer, J. K. and Harris, B.: Mastitis in dairy cow. *J. Anim. Sci.* 22, 1-6, 2003.
7. Trinidad, P., Nickerson, S.C. and Adkinson, R.W.: Histopathology of Staphylococcal Mastitis in Unbred Heifers. *Journal of Dairy Science*, 73, 3, 639-647, 1990.

Originalan rad

UDK 619:616.995.132(497.113)'2005/2009'

NAJČEŠĆE BAKTERIJSKE ZOONOZE U LJUDI U VOJVODINI U PERIODU 2005–2009.*

Ivana Hrnjaković Cvjetković^{*1}, Vesna Milošević¹, Vera Jerant Patić¹, Sandra Stefan Mikić², Dejan Cvjetković², Jelena Radovanov¹, Gordana Kovačević¹

¹Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad

²Klinički centar Vojvodine, Novi Sad

Kratak sadržaj

Cilj rada je utvrđivanje rasprostranjenosti i sagledavanje značaja bakterijskih zoonoza (salmoneloze, lajmske bolesti, kampilobakterioze, leptospiroze, Q groznice) u ljudi u Vojvodini. Ispitivanje je prospektivno zasnovano na podacima Zdravstveno statističkih godišnjaka Republike Srbije od 2005-2009. koje izdaje Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“. Bakterijske zoonoze činile su 1,16% (5610/482596) od ukupnog broja registrovanih zaraznih bolesti u ljudi u Vojvodini u periodu od 2005. do 2009. Među registrovanim bakterijskim zoonozama najzastupljenije su bile salmoneloze sa 62,83% (3525/5610). Incidenca u Vojvodini u posmatranom periodu kretala se između 46,45–22,78 na 100.000 stanovnika. Lajmska bolest je po učestalosti na drugom mestu i čini 19,20% (1077/5610) ukupnog broja bakterijskih zoonoza. Lajmska bolest je u Vojvodini u posmatranom periodu imala trend porasta: broj prijavljenih je rastao od 164 u 2005. god. do 294 u 2009. Sa 92 slučaja za 5 godina Q groznica je na četvrtom mestu. Gotovo svi slučajevi Q groznice u Srbiji su registrovani u Vojvodini (92 od 93 slučaja). Najveća incidenca Q groznice registrovana je 2006. god. i iznosila je 2,29/100 000 stanovnika. Ostale zoonoze su u Vojvodini bile zastupljene sa manje od 2% u odnosu na ukupan broj registrovanih bakterijskih zoonoza: leptospiroza 1,10% (62/5610), bruceloza 0,48% (27/5610), tetanus 0,27% (15/5610), listerioza 0,23% (13/5610), ornitoza 0,07% (4/5610) i tularemija 0,01% (1/5610). Uzročnici bakterijskih zoonoza su bili značajni humani patogeni u Vojvodini u periodu 2005-2009. Među njima najzastupljenije su bile salmoneloze i lajmska bolest.

Ključne reči: zoonoze, salmoneloze, lajmska bolest, kampilobakterioza, leptospiroza, Q groznica

* Rad je deo istraživanja iz projekta TR31084 finansiranog od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije

* E-mail: ivana.hrnjakovic@izjzv.org.rs

THE MOST COMMON BACTERIAL ZOONOSES IN HUMANS IN THE VOJVODINA REGION (SERBIA) IN THE PERIOD 2005–2009

Ivana Hrnjaković Cvjetković¹, Vesna Milošević¹,
Vera Jerant Patić¹, Sandra Stefan Mikić²,
Dejan Cvjetković², Jelena Radovanov¹, Gordana Kovačević¹
Institute of Public Health of Vojvodina¹
Clinical Centre of Vojvodina²
Scientific Veterinary Institute "Novi Sad"³

Abstract

The objective of this paper is to emphasize the significance of bacterial zoonoses in Vojvodina in the period 2005-2009. The study is based on data from the Health Statistical Yearbook of the Republic of Serbia published by the Institute of Public Health of Serbia "Dr Milan Jovanović Batut". Bacterial zoonoses were represented with 1.16% (5610/482596) among the total number of registered bacterial zoonoses in Vojvodina 2005-2009. Among them the most frequent were salmonellosis with 62.83% (3525/5610). The incidence in Vojvodina in the period 2005-2009 ranged between 46.45-22.78 per 100,000 population. According to frequency Lyme disease was at second place with 19.20% (1077/5610) among the total number of registered bacterial zoonoses. Lyme disease in Vojvodina in the period 2005-2009 had an increasing trend: the number of reported cases increased from 164 in 2005 to 294 in 2009. According to the number of registered cases campylobacteriosis was at the third place - 794 cases (14.15%). Q fever was at the fourth place. Almost all cases of Q fever which were registered in Serbia, were from Vojvodina (92 of 93 cases). Other zoonoses in Vojvodina were represented with less than 2% of the total number of registered bacterial zoonoses: leptospirosis 1.10% (62/5610), brucellosis 0.48% (27/5610), tetanus 0.27% (15/5610), listeriosis 0.23% (13/5610), ornithosis 0.07% (4/5610), tularemia 0.02% (1/4816). The causative agents of bacterial zoonoses were important human pathogens in Vojvodina in the period 2005-2009. Among them the most common were *Salmonella* and Lyme disease.

Key words: zoonoses, salmonellosis, Lyme disease, leptospirosis, campylobacteriosis

UVOD

Zoonoze su bolesti životinja koje se u prirodnim uslovima mogu preneti na ljude. Zoonoze u ljudi mogu imati različit tok i ishod. Klinički spektar je različit - od blagih formi sa dobrom prognozom, do teških, sa komplikacijama i smrtnim ishodom. Pojedine zoonoze mogu imati hroničan tok i zahtevati dugotrajno i skupo lečenje. Neke zoonoze se održavaju endemski sa povremenim epidemijama, te predstavljaju javno zdravstveni problem. Zoonoze su značajne i kao profesionalna oboljenja osoba profesionalno izloženih životinjama, njihovim produktima ili samim uzročnicima. Cilj rada je utvrđivanje učestalosti i sagledavanje značaja bakterijskih zoonoza u ljudi u Vojvodini. Ispitivanje je prospektivno zasnovano na podacima Zdravstveno statističkih godišnjaka Republike Srbije od 2005-2009. koje izdaje Institut za javno zdravlje Srbije „Milan Jovanović Batut“ (Zdravstveno statistički godišnjaci, 2005-2009).

BAKTERIJSKE ZOONOZE KOJE REGISTRUJE INSTITUT ZA JAVNO ZDRAVLJE SRBIJE

Salmoneloze. U genusu *Salmonella* se nalazi više od 2400 serotipova. Serotipovi *Salmonella Typhi* i *Salmonella Paratyphi A, B i C* su striktno humani patogeni dok su ostale salmonele sposobne da inficiraju i ljude i životinje i spadaju u zoonoze (Pecić i Jelesić, 2005). Najčešća klinička manifestacija ove infekcije u čoveka je gastroenterokolitis. U velikom broju slučajeva infekcija prolazi za 4–7 dana čak i bez lečenja. U težim slučajevima salmonele prelaze u krvotok, izazivaju septikemiju sa mogućim fokalnim lezijama u plućima, kostima i moždanicama što zahteva hospitalizaciju i antibiotski tretman. U SAD salmoneloza je najčešća infekcija koja se prenosi hranom. Godišnje u SAD bude milion infekcija izazvanih salmonelama, za čiji medicinski tretman troškovi iznose 365 miliona dolara i 2290 hospitalizovanih slučajeva (MMWR, 2011).

Kampilobakterioza. Poslednjih decenija ova zoonoza je značajan medicinski problem kako u razvijenom svetu tako i u zemljama u razvoju. Najčešća manifestacija infekcije je akutna dijarealna bolest. Obično traje 2-5 dana i prolazi bez posledica. Kampilobakterioza može imati kao manifestaciju artritis a u imunokompromitovanih sepsu. Kao komplikacija može se javiti sindrom Guillian-Barre. Na 1000 slučajeva kampilobakter infekcija registruje se jedan Guillian-Barre sindrom. Dve rasprostranjene vrste su *Campilobacter coli* i *Campilobacter jejuni*. Kampilobakterije borave u digestivnom traktu domaće živine, divljih ptica, domaćih životinja i glodara. Infekcije su česte u dece i mladih osoba. Procenjuje se da kampilobakterioza pogađa 2,4 miliona ljudi, odnosno

0,8% populacije u SAD godišnje. Čovek se najčešće inficira konzumiranjem sirovog ili nedovoljno termički obrađenog živinskog mesa ili hrane naknadno kontaminirane u kontaktu sa sirovim mesom inficirane živine. Infekcija nastaje i preko nepasterizovanog mleka, kontaminirane vode i u kontaktu sa inficiranim životinjama. Prenos sa čoveka na čoveka je moguć ali je ređi.

Q groznica. Uzročnik Q groznice je bakterija *Coxiella burnetii*. Inficira ljude, domaće i divlje životinje, ptice, glodare i insekte. Infekcija domaćih životinja, poput krava, koza i ovaca, je često asimptomatska. U nekim slučajevima infekcija životinja ispoljava se pobačajima. Glavni put infekcije čoveka je respiratorni, inhalacijom kontaminirane prašine. Endemski je prisutna u mnogim evropskim zemljama. Epidemiološka istraživanja sprovedena u periodu 1970-2009. pokazuju da u nekim seoskim područjima Evrope 10-30% stanovništva ima antitela na *Coxiella burnetii*. Iako je u 50% slučajeva infekcija ljudi asimptomatska, ova bakterija je značajna za humanu medicinu jer su moguće i teške forme bolesti sa pneumonijom, hepatitisom i endokarditisom. U 1,5-2% akutnih simptomatskih slučajeva razvija se hronična Q groznica u kojoj se smrtnost kreće se od 5-50% (Raoult D i sar., 1999).

Leptospiroza. Leptospiroza je zoonoza izazvana Gram-negativnim, spiralnim bakterijama iz roda *Leptospira*, rasprostranjena širom sveta. U rodu su patogena vrsta *Leptospira interrogans* i saprofitna vrsta *Leptospira biflexa*. Inficira ljude i oko 160 vrsta sisara među kojima glodare, pse, mačke i rakune. Primaran rezervoar leptospira su divlje životinje, posebno glodari koji inficiraju domaće životinje. Leptospire kontaminiraju vode u kojima, pri temperaturi višoj od 22°C, mogu opstati mesecima. Čovek se inficira preko oštećene kože i sluzokože, u kontaktu sa vodom kontaminiranom mokraćom inficiranih životinja. Prenošenje infekcije sa čoveka na čoveka je retko. Može proteći kao blaga subklinička infekcija ili teška bolest sa zahvatanjem CNS, jetre, pluća, bubrega i smrtnim ishodom (Švabić Vlahović, 2005). Smatra se najrasprostranjenijom zoonozom na svetu (Palaniappan i sar., 2007). Procenjuje se da je u umerenom geografskom pojasu ovom zoonozom zahvaćeno 0,1-1 na 100.000 stanovnika. Incidenca na 100.000 stanovnika za Afriku je 95,5, za Zapadni Pacifik 66,4, za Ameriku 12,5, za Jugoistočnu Aziju 4,8 (WHO LERG, 2011). U nekim tropskim zemljama je prisutna endemski. Turistička putovanja u visoko rizične zemlje povećavaju izloženost ovoj bolesti. U mnogim zemljama rasprostranjenost ove zoonoze višestruko je veća od zvanično registrovane zbog znatnog broja asimptomatskih slučajeva i nemogućnosti postavljanja laboratorijske mikrobiološke dijagnoze.

Lajmska bolest. Uzročnik Lajmske bolesti je bakterija *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Prenose je krpelji iz genusa *Ixodes*. U Evropi to su uglavnom *Ixodes ricinus* i *Ixodes persulcatus*. Postoji 15 genospeciesa. Za pojedine genospecijese karakteristični su određeni klinički sindromi. Na primer, *Borrelia burg-*

dorferi sensu stricto povezana je sa artritisom u kliničkoj slici Lajmske bolesti posebno u Severnoj Americi, *Borrelia garinii* sa neurološkim simptomima a *Borrelia afzelii* sa hroničnom bolesti kože, acrodermatitis chronica atrophicans. *Borrelia burgdorferi sensu lato* je endemična u Severnoj Americi, Evropi i Aziji. Registruje se u Skandinaviji, Centralnoj, Južnoj i Zapadnoj Evropi, zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza, Japanu i Kini. Najznačajniji rezervoar borelija u Evropi su glodari miševi i pacovi, insektivore i ptice, među kojima i ptice selice. Krupni sisari, poput konja, jelena i domaće stoke, obezbeđuju hranu za ženke krpelja ali nisu pogodan rezervoar u lancu transmisije (Lindgren, Jaenson, 2006). Na čoveka se borelija prenosi ujedom inficiranog krpelja pri izvođenju profesionalnih ili rekreativnih aktivnosti. Radi se o značajnom humanom patogenu koji samom infekcijom ali i imunološkim mehanizmima koje pokreće, može izazvati oboljenje kože, centralnog nervnog sistema, srca, zglobova i očiju. Ukoliko se ne započne antibiotsko lečenje, u ranoj fazi bolesti, može doći do teškog oboljenja nervnog sistema, srca i zglobova. Broj registrovanih slučajeva u Evropi je oko 85000 godišnje (Lindgren, Jaenson, 2006). 2008. godine u SAD prijavljeno je 35198 slučajeva (MMWR, 2008).

NAJČEŠĆE ZOONOZE REGISTROVANE U LJUDI U VOJVODINI U PERIODU 2005-2009.

Bakterijske zoonoze činile su 1,16% (5610/482596) od ukupnog broja registrovanih zaraznih bolesti u ljudi u Vojvodini u periodu od 2005. do 2009. Najčešće bakterijske zoonoze date su u tabeli 1. Među registrovanim bakterijskim zoonozama najzastupljenije su bile salmoneloze sa 62,83% (3525/5610). Lajmska bolest je po učestalosti bila na drugom mestu i bila je zastupljena sa 19,20% (1077/5610) od ukupnog broja bakterijskih zoonoza. Lajmska bolest je u Vojvodini u posmatranom periodu imala trend porasta: broj prijavljenih je rastao od 164 u 2005. god. do 294 u 2009. Kampilobakterioza je na trećem mestu po broju registrovanih slučajeva - ukupno 794 slučajeva (14,15%). Sa 1,64% među registrovanim zoonozama i 92 prijavljena slučaja u posmatranom periodu Q groznica je bila na četvrtom mestu. Q groznica je uglavnom registrovana u Vojvodini. 2005 godine uz 2 slučaja u Vojvodini, registrovan je 1 slučaj Q groznice u Centralnoj Srbiji. Ostalih posmatranih godina svi registrovani slučajevi Q groznice u Srbiji su bili iz Vojvodine (Vojvodina ukupno 92 slučaja). Sa 1,10% među prijavljenim zoonozama i 62 slučaja u posmatranom periodu leptospiroza je na petom mestu. Ostale zoonoze su u Vojvodini bile zastupljene sa manje od 1% u odnosu na ukupan broj registrovanih bakterijskih zoonoza: bruceloza 0,48% (27/5610), tetanus 0,27% (15/5610), listerioza 0,23% (13/5610), ornitoza 0,07% (4/5610), tularemija 0,02% (1/4816).

DISKUSIJA

Među zoonozama ljudi, koje se registrovane u Vojvodini, najznačajnije su bile salmoneloze, koje su tokom svih 5 posmatranih godina bile na prvom mestu po broju registrovanih slučajeva. Salmoneloze su takođe imale ulogu vodeće humane zoonoze i za Centralnu Srbiju u kojoj se broj registrovanih slučajeva kretao od 1551 2005. god. do 1982 2007. godine. Ukupna incidenca za Evropsku uniju je u periodu 2005-2008. iznosila od 34,1 (za 2007. god.) do 39,62 na 100.000 (za 2008. god.) (ECDC, 2010). U istom periodu incidenca salmoneloza za Vojvodinu bila je viša u poređenju sa ukupnom incidencom za Evropsku uniju 2006. kada je iznosila 46,45, dok je 2008. incidenca u Vojvodini bila niža od ukupne incidence za Evropsku uniju i iznosila je 31,73. Incidenca u Vojvodini 2007. (38,66/100.000) bila je viša nego iste godine u Bugarskoj (15 /100.000), Rumuniji (29/100.000) i a niža od incidence u Mađarskoj (65/100.000) (ECDC, 2009). U zemljama Evropske unije velika incidenca salmoneloza registruje se u Češkoj i Slovačkoj. Tako je 2005 incidenca u Češkoj iznosila 322,16 slučajeva (ECDC, 2007) a 2008. u Slovačkoj 127 slučajeva na 100.000 stanovnika što je mnogo više od incidence za Vojvodinu. (ECDC, 2010). Najniže incidence salmoneloza u Evropskoj uniji su registrovane u Rumuniji 2008. god. 2,9/100.000 i Portugaliji 3,1/100.000 2006. god. što je niže od incidence za Vojvodinu (ECDC, 2010).

U posmatranom petogodišnjem periodu druga po broju registrovanih slučajeva u Vojvodini je bila Lajmska bolest. Incidenca Lajmske bolesti se kretala od 8,07 u 2005. god. do 14,85 slučajeva na 100.000 stanovnika u 2009. god. Po visokim incidencama Lajmske bolesti u Evropi su poznate baltičke zemlje i Švedska na severu i Austrija, Slovenija, Nemačka i Češka u Centralnoj Evropi (Lindgren i Jaenson, 2006). Kako u Vojvodini, tako i u celoj Srbiji postojao je trend porasta broja registrovanih slučajeva i incidence Lajmske bolesti u periodu 2005-2009. god.

Incidenca kampilobakterioze u Vojvodini se kretala između 5,22 (2007. god) i 11,25 (2008. god) na 100.000 stanovnika. 2009. godine kampilobakterioze su bile najčešće registrovane zoonoze u Evropskoj uniji sa 198252 slučaja (EFSA, 2011). Od 2005. do 2008. ukupna incidenca za Evropsku uniju iznosila je od 43,25 do 46,59 slučajeva na 100.000 stanovnika što je više upoređenju sa incidencama kampilobakterioza za Vojvodinu (ECDC, 2007; ECDC, 2010). Zemlja sa najvećom incidencom kampilobakterioza u periodu od 2005–2009. u Evropskoj uniji je bila Češka (296,75/100.000 u 2005. god; 235/ 100.000 u 2007. god. i 193/100.000 u 2008. god.). U Bugarskoj incidenca je 2007. i 2008. bila niža od 1 dok je u Mađarskoj bila 57/100.000 u 2007. god. a 68/100.000 u 2008. god. (ECDC, 2007; ECDC, 2010).

Q groznica je na četvrtom mestu po broju registrovanih slučajeva u posmatranom periodu. Najveći broj slučajeva Q groznice u Vojvodini je registrovan u 2006. god. - 46 slučajeva i incidenca 2,29. Ova incidenca je viša od ukupne incidence za Evropsku uniju gde u periodu od 2005. do 2008. incidenca nije prelazila 0,5/100.000. Ostalih godina incidenca u Vojvodini je bila niža od 1. U Srbiji Q groznica se registruje najčešće u Vojvodini. Za posmatranih 5 godina u Vojvodini je registrovano 92 slučajeva Q groznice, a samo jedan slučaj u Centralnoj Srbiji (2005. god.). U zemljama Evropske unije registrovano je 2007. god. 585, 2008. god. 1594 slučajeva Q groznice, a 2009. god. 1987 slučajeva Q groznice (EFSA Journal, 2011). Ukupna incidenca Q groznice za Evropsku uniju u 2008. god. je 0,43/100.000. U Bugarskoj je 2008. incidenca Q groznice bila 0,2 a u Rumuniji manja od 0,1 (ECDC 2010) što je niže nego u Vojvodini gde je iznosila 0,75/100.000 (ECDC, 2010).

U posmatranom petogodišnjem periodu bilo je 62 slučajeva leptospiroze. Najniža incidenca leptospiroze zabeležena je 2006. (0,40) a najviša 2005. i 2007. god. od 0,79/100.000. Incidenca leptospiroze u svetu je 5 slučajeva na 100.000 stanovnika (od 0,1-975,0) a u Evropi 0,5 (0,1-15,8) što znači da incidenca u Vojvodini odgovara onoj u Evropi (WHO LERG, 2011).

Tabela 1. Najčešće bakterijske zoonoze u ljudi u Vojvodini u periodu 2005-2009.

Godina	2005.	2006.	2007.	2008.	2009.	
Bolest	Br In	Br In	Br In	Br In	Br In	Ukupno
Salmoneloze	729 35,88	935 46,45	778 38,66	632 31,73	451 22,78	3525
Lajmska bolest	164 8,07	180 8,94	195 9,69	244 12,25	294 14,85	1077
Kampilobakterioza	126 6,20	170 8,45	105 5,22	224 11,25	169 8,54	794
Q groznica	2 0,10	46 2,29	12 0,60	15 0,75	17 0,86	92
Leptospiroza	16 0,79	8 0,40	16 0,79	13 0,65	9 0,45	62

Legenda:

Br broj prijavljenih slučajeva

In broj prijavljenih slučajeva na 100.000 stanovnika

LITERATURA

1. ECDC Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2007 Available on line www.ecdc.europa.eu.
2. ECDC Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2009 Available on line www.ecdc.europa.eu

3. ECDC Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2010 Available on line www.ecdc.europa.eu).
4. EFSA The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 9, 3, 2090, pp 378, 2011
5. John T.J., Dandona L., Sharma V.P., Kakkar M.: Continuing challenge of infectious diseases in India, *Lancet*, 77, 9761, 252-69, 2011.
6. Lindgren E., Jaenson T.G.T.: Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, p. 34, 2006.
7. MMWR Centers for Disease Control and Prevention. Summary of notifiable diseases. United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 57, 54, 1-94, 2010.
8. MMWR Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996 –2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60, 22, 749-755, 2011.
9. Palaniappan R.U., Ramanujam S., Chang Y.F.: Leptospirosis: pathogenesis, immunity and diagnosis, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20, 3, 284 -292, 2007.
10. Pecić J., Jelesić Z.: Salmonella. U: Milena Švabić-Vlahović, Medicinska bakteriologija, Beograd: Savremena administracija a.d., 2005, 243-251.
11. Raoult D, Houpikian P, Tissot Dupont H, Riss JM, Arditi – Djiane J, Brouqui P. Treatment of Q fever endocarditis: 2 regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydrochloroquine. *Archives of Internal Medicine*, 159, 2, 167 -173, 1999.
12. Švabić Vlahović M.: Spiralne bakterije. U: Milena Švabić Vlahović, Medicinska bakteriologija, Beograd: Savremena administracija a.d., 2005, 361–369.
13. WHO LERG. Report of the Second meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group WHO 2011 Available in electronic format from <http://www.who.int/zoonose/diseases/lerg/en>
14. Zdravstveno statistički godišnjaci Republike Srbije 2005-2009, Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, Banja Luka.

The presented work is part of the research done in the project TR31084 granted by the Serbian Ministry of Science and Technological Development

SEROPREVALENCA HEPATITIS E VIRUSNE INFEKCIJE KOD DIVLJIH SVINJA U SRBIJI*

Diana Lupulović¹, Tamaš Petrović, Sava Lazić, Jasna Prodanov-Radulović,
Radoslav Došen, Ivan Pušić

Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad

Kratki sadržaj

Hepatitis E (HEV) pripada jednom od do sada 5 opisanih tipova hepatitisa ljudi izazvanih virusnim agensom (hepatitis A, B, C, D i E). Oboljenje se karakteriše kliničkom i epidemiološkom slikom akutnog hepatitisa, a prenosi se prvenstveno fekalno-oralnim putem preko kontaminirane vode i hrane. Infekcija je pretežno ustanovljena u zemljama u razvoju Srednjeg Istoka, Azije i Afrike, naročito u državama sa nezadovoljavajućim sanitarnim uslovima života. HEV infekcija je kod svinja prvi put zabeležena 1990. god. Brojna ispitivanja koja su usledila, dokazala su da HEV može preskočiti barijeru vrste i preneti se sa svinja na ljude. HEV je dokazan kao novi zoonozni uzročnik. Hepatitis E virusom inficirali su se ljudi u Japanu koji su konzumirali nedovoljno termički obrađeno meso jelena, svinjsku jetru i meso divljih svinja. Kod ljudi su ustanovljena četiri genotipa: I, II, III i IV, dok do sada ispitani svinjski izolati pripadaju genotipovima III i IV. Takođe je važno napomenuti da su HEV izolati svinja iz jednog geografskog područja genetski bliži izolatima poreklom od ljudi sa istog područja nego izolatima poreklom od svinja iz drugog dela sveta. Cilj ovog rada je da se prikaže da li je i koliko HEV infekcija prisutna kod populacije divljih svinja u Srbiji, koje predstavljaju rezervoar ove bolesti izazvane značajnim zoonoznim uzročnikom. Preliminarna serološka ispitivanja obuhvatila su ispitivanje 92 uzorka krvnih seruma divljih svinja. Kod 32 životinje, odnosno 34,78%, ustanovljeno je prisustvo specifičnih antitela protiv HEV genotip 3. Uzorci krvi sakupljeni su tokom 2009, 2010. i 2011. godine sa lokaliteta 15 lovišta u Srbiji. Laboratorijsko ispitivanje izvršeno je nekomercijalnim ELISA testom (*in-house* ELISA), gde je kao antigen korišćen rekombinantni kapsidni protein – HEV Δ ORF 2 genotip 3, koji je dobijen laboratorijskim postupkom kloniranja. Rezultati ispitivanja prikazali su da je infekcija he-

* Istraživanje je finansirano od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, broj projekta: TR31084.

¹ E-mail: diana@niv.ns.ac.rs

patitis E virusom prisutna kod divljih svinja u Vojvodini, koje predstavljaju potencijalni izvor ne samo ove zaraze, već i mnogobrojnih drugih infekcija različite etiologije.

Ključne reči: hepatitis E infekcija, divlje svinje, *in-house* ELISA

THE SEROPREVALENCE OF HEPATITIS E VIRUS INFECTION IN WILD BOARS IN SERBIA

Diana Lupulović¹, Tamaš Petrović, Sava Lazić, Jasna Prodanov-Radulović,
Radoslav Došen, Ivan Pušić
Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Rumenački put 20, 21000 Novi Sad,

Abstracts

Hepatitis E (HEV) belongs to one of five so far described types of viral hepatitis caused by human agents (hepatitis A, B, C, D and E). The disease is characterized by clinical and epidemiological signs of acute hepatitis and is transmitted primarily by fecal-oral route via contaminated food and water. The infection is mainly detected in the developing countries of the Middle East, Asia and Africa, especially in countries with poor sanitary conditions of life. HEV infection in pigs was first recorded in 1990. Numerous studies that followed proved that HEV can skip species barrier and can be transmitted from pigs to humans. HEV has been demonstrated as a new zoonotic agent. Hepatitis E virus has infected people in Japan who consumed insufficiently cooked meat of deer, pig liver and meat of wild boar. In humans four genotypes have been determined: I, II, III and IV, while so far tested swine isolates belong to genotypes III and IV. It is also important to note that the swine HEV isolates from one geographical region are genetically closer to human isolates from the same area than to the other isolates from pigs in the world. The aim of this paper is to show whether and how much HEV infection is present in the population of wild boars in Serbia, which represent a reservoir of this disease caused by a significant zoonotic agent. Preliminary serological tests included the examination of 92 blood serum samples of wild boars. In 32 animals, or 34.78%, the presence of specific antibodies against HEV genotype was detected. The blood samples were collected during 2009, 2010 and 2011 from 15 hunting sites in Serbia. Laboratory testing was performed by non-commercial ELISA (*in-house* ELISA), where the used antigen was recombinant capsid protein-HEV genotype 3 Δ ORF 2, which was obtained by laboratory cloning procedure. The test results showed that the hepatitis E virus is present in wild boars in

Vojvodina, that are a potential source of this infection, as well as for many other infections of different etiology.

Key words: hepatitis E infection, wild boar, in-house ELISA

UVOD

Hepatitis E virus (HEV) pripada porodici *Hepeviridae* i rodu *Hepevirus*. Virusna partikula je sferičnog oblika, dijametra 32-34 nm. Posедуje jednolančanu RNK od 7.2 kb. Potrebno je istaći da su do sada dokazana 4 genotipa HEV kod ljudi (I, II, III i IV). Genotip I je prisutan u regionima Azije i Afrike, dok je genotip II izolovan u Meksiku. Izolati iz područja koja nisu endemska (SAD, Kanada i zemlje Evrope: Španija, Italija, Grčka, Mađarska, Češka i dr.) svrstani su u grupu genotipa III. Genotipu IV pripadaju izolati iz Kine i drugih zemalja Dalekog Istoka.

Oboljenje kod ljudi se karakteriše kliničkom i epidemiološkom slikom akutnog hepatitisa i simptomima žutice (epigastrični bolovi, povraćanje, groznica, ikterus beonjača i tamna mokraća), a prenosi se prvenstveno feko-oralnim putem preko kontaminirane vode i hrane. Infekcija je pretežno ustanovljena u zemljama u razvoju Srednjeg Istoka, Azije i Afrike, naročito u državama sa nezadovoljavajućim sanitarnim uslovima života. U industrijski razvijenim zemljama Evrope i u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), dijagnostikovani su samo sporadični slučajevi akutnog oblika hepatitisa E (9, 21, 25, 28, 34). Međutim, na osnovu objavljenih rezultata nedavnih istraživanja zapažen je izuzetno visok nivo HEV antitela kod ljudi u industrijski razvijenim zemljama koji može biti čak i viši nego kod ljudi u endemskim područjima. Postavljena je sumnja da rezervoar virusa hepatitisa E mogu biti domaće i divlje životinje.

Usledila su brojna ispitivanja i HEV infekcija kod svinja je prvi put zabeležena 1990. god. (9), a prvi dokaz prisustva virusa kod svinja izvršen je u Americi 1997. godine od strane Meng-a i saradnika (19). Kod svinja bolest protiče asimptomatski, a inkubacioni period traje 1-4 nedelje (9, 25, 34). Kod inficiranih svinja prvo se javlja prolazna viremija, koja traje 1-2 nedelje, a zatim se virus izlučuje još 3-7 nedelja putem fecesa. HEV infekcija se najčešće pojavljuje u uzrastu prasadi od 2 do 3 meseca, kada iz cirkulacije nestanu maternalna antitela. To se takođe poklapa i sa periodom kada se prasad prebacuju u tovište, međusobno mešaju i menjaju svoju okolinu, što povećava mogućnost zaražavanja. Virus prodire u organizam životinje oralnim putem, umnožava se u gastrointestinalnom traktu i odatle se dalje putem krvi prenosi u jetru, a u spoljašnju sredinu se izlučuje putem fecesa. Makroskopske morfološke promene na jetri svinja nisu zabeležene, a od mikroskopskih lezija se

mogu javiti zapaljenske promene u vidu infiltracije limfocita, pojave makrofaga i vakuolisanih hepatocita (19).

HEV svinja je široko rasprostranjen na farmama u mnogim zemljama, kao što su: Italija (2, 37), Španija (4, 23, 27), Kanada (36), Južna Koreja (6), Japan, Indija, SAD, Australija (5), Grčka (1), Mađarska (26), Češka (31), Francuska (16), Kina (32) i dr. Međutim, seroprevalenca može da varira od 0 do 100% i različiata je od zapata do zapata i od regiona do regiona (4, 16, 19).

Utvrdeno je da HEV izolati svinja pripadaju genotipovima II i IV. Do sada je u Evropi kod svinja bio utvrđen samo genotip III, a nedavno je po prvi put dokazano i prisustvo virusa hepatitisa E u fecesu svinja poreklom iz Belgije koji pripada HEV genotipu 4c (13). Takođe je važno napomenuti da su HEV izolati svinja iz jednog geografskog područja genetski bliži izolatima ljudi sa istog područja nego izolatima svinja iz drugog dela sveta (19, 21, 22).

Prisustvo HEV je dokazano i kod drugih životinjskih vrsta, kao što su: divlje svinje, glodari, magarci, goveda, psi i ptice. Ustanovljeno je da postoji samo jedan serotip virusa hepatitisa E, odnosno nema podataka o serološkoj heterogenosti virusa (19, 25).

Nakon što je infekcija hepatitis E virusom opisana kod svinja, ustanovljeno je da HEV može preskočiti barijeru vrste i preneti se sa svinja na ljude (20). Sprovedena su i epidemiološka ispitivanja kod ljudi koji dolaze u kontakt sa svinjama. Dokazano je da u rizične grupe ljudi spadaju veterinari koji se bave zdravstvenom zaštitom svinja i radnici na farmama svinja (22,8). Virus hepatitisa E je veoma teško izolovati, pošto za sada ne postoji prijemčiva ćelijska kultura. Istraživači iz Japana su nedavno uspeali da ograničeno umnože virus dobijen iz fecesa ljudi na ćelijskoj kulturi karcinoma jetre ljudi PLC/PRF/5 (30). Što se tiče serološke dijagnostike, ona je zasnovana na primeni imunoenzimskog testa (ELISA) za dokazivanje antitela protiv HEV. Molekularnim metodama dobijen je rekombinantni kapsidni protein kojeg kodira ORF-2 fragment genoma HEV genotipa 3, koji se koristi u tzv. „*in-house*“ (nekomercijalnom) ELISA testu. Ovaj ELISA test se uspešno koristi za dokazivanje prisustva antitela protiv antigena hepatitisa E kod svinja i ljudi (14, 15, 17). Pored ELISA testa može se koristiti i Western-blot tehnika, koja predstavlja potvrđnu metodu i «zlatni standard» u serološkoj dijagnostici ove infekcije (15). Za dokazivanje virusnog antigena u tkivima parenhimatoznih organa koristi se imunohistohemijska metoda, a za virusnu RNK *in-situ* hibridizacija. Virusni genom se dokazuje molekularnim metodama *reverzna transkripcija-polimeraza lančana reakcija* (RT-PCR); *RT nested PCR* i *REAL-TIME PCR*. Molekularnim metodama virus se može dokazivati u krvi, fecesu i tkivima životinja. Međutim, viremija traje samo 2 nedelje i ograničena je na akutnu fazu bolesti, pa se često virus može detektovati samo u fecesu i tkivima gde se duže zadržava i izlučuje.

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje prisustva specifičnih antitela protiv hepatitis E virusa kod populacije divljih svinja u Srbiji.

MATERIJAL I METODE

Ukupno su pregledana 92 uzorka krvnih seruma divljih svinja iz 15 lovišta sa teritorije Srbije. Uzorci su sakupljeni tokom 2009, 2010. i 2011. godine. Starost životinja je iznosila od 1 do 3 godine.

Serološka ispitivanja vršena su nekomercijalnim (*in-house*) ELISA testom, gde je kao antigen korišćen rekombinantni kapsidni protein – HEV Δ ORF 2 genotip 3, dobijen postupkom molekularnog kloniranja u *Trichoplusia ni* larvama (15). Ispitivanja su vršena u saradnji sa Nacionalnim institutom INIA, Madrid, Španija.

REZULTATI I DISKUSIJA

Dobijeni rezultati ispitivanja seroprevalence HEV prikazani su u Tabeli 1. Od ukupno pregledanih 92 uzorka krvnih seruma divljih svinja, kod 36 životinja (34,78%) ustanovljeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa hepatitis E. Analizom dobijenih rezultata može se uočiti da je najveći procenat seropozitivnih divljih svinja utvrđen u lovištu Karakuša (75%), Morović (58,3%), Lovište u okolini Šapca i Odžaka (50%), u okolini Valjeva (40%) i lovište Višnjicevo (29,41%). U lovištima Obedska Bara, Fruška gora, Plavna, Valjevo 2, Šabac 2, Mačva, Bašaid i Subotica nije utvrđeno prisustvo HEV infekcije kod divljih svinja.

Tabela 1: Prikaz seroprevalence HEV kod divljih svinja u Srbiji

Lovište	Br. pregl.	Br. pozitivnih	%
Karakuša	20	15	75
Obedska Bara	5	0	0
Višnjičevo	17	5	29,41
Fruška Gora	5	0	0
Plavna	2	0	0
Valjevo 1	5	2	40
Valjevo 2	1	0	0
Šabac 1	2	1	50
Šabac 2	3	0	0
Šabac 3	14	1	7,1
Mačva	1	0	0
Bašaid	1	0	0
Subotica	2	0	0
Odžaci	2	1	50
Morović	12	7	58,3
Σ	92	36	34,78

Na mapi br. 1 prikazana su lovišta i područja na kojima su uzorkovane krvi divljih svinja (sva obojena polja), a tamnom bojom označena su lovišta u kojima su ustanovljene HEV seropozitivne divlje svinje.

Mapa 1: HEV infekcija kod divljih svinja u lovištima Srbije



Hepatitis E virusom inficirali su se ljudi u Japanu koji su konzumirali nedovoljno termički obrađeno meso jelena, svinjsku jetru i meso divljih svinja (18, 29, 35). U Italiji su zabeleženi slučajevi akutnog oblika hepatitisa E na

Siciliji kod ljudi koji su jeli inficirane školjke (25). Svi ovi podaci ukazali su da su domaće i divlje životinje rezervoari infekcije i da postoji realna opasnost da virus hepatitisa E predstavlja zoonoznu infekciju. Pošto se infekcija prenosi putem hrane i vode, virus hepatitisa E predstavlja zagađivača životne sredine i opasnost za proizvodnju zdravstveno bezbedne hrane, kao i za zdravlje ljudi.

Virusna RNK i specifična antitela protiv HEV su utvrđena kod populacije divljih svinja u mnogim zemljama: Japan, Nemačka, Italija, Španija, Holandija, Mađarska. Seropozitivnost kod divljih svinja varira od oblasti do oblasti i iznosi od 12-42 % (Japan 25,5%; Holandija 12%; Nemačka 29,9%; Španija 42,7%). Utvrđeni procenat seropozitivnih životinja u populaciji divljih svinja u našoj zemlji iznosi 34,78%, što najviše odgovara rezultatima istraživanja dobijenih u Španiji i Nemačkoj.

Prva preliminarna ispitivanja HEV kod svinja u Srbiji izvršena su 2008. godine od strane Petrovića i saradnika. Istraživanjem su obuhvaćeni fecesi i parenhimatozni organi svinja poreklom sa farmi i iz seoskih gazdinstava, kao i od divljih svinja. Virus je ustanovljen molekularnom tehnikom reverznom transkripcijom polimeraza lančanom reakcijom (RT-PCR) i naknadnom *nested* PCR reakcijom. Virusna RNK utvrđena je u 30% pregledanih zbirnih uzoraka fecesa i 45% zbirnih uzoraka tkiva svinja sa farmi i iz seoskih gazdinstva. U zbirnim uzorcima fecesa divljih svinja HEV RNK nije utvrđena (24). Nedavno su izvršena i prva serološka ispitivanja prisustva hepatitisa E kod dvorišno uzgajanih svinja u seoskim gazdinstvima u Vojvodini. Prisustvo specifičnih antitela utvrđeno je kod 34,16% (109/315) ispitanih životinja (17). Hepatitis E virus zastupljen je kod divljih svinja u Srbiji u sličnom procentu (34,78%) kao i kod domaćih svinja (34,16%).

ZAKLJUČAK

- Hepatitis E virus prisutan je kod populacije divljih svinja u Srbiji,
- Seroprevalenca HEV infekcije kod divljih svinja iznosi 34,16%,
- Divlje svinje predstavljaju rezervoar HEV, kao i mnogih drugih infektivnih uzročnika.

LITERATURA

1. Asimoula S, Tzika E, Alexopoulos C, Kyriakis SC and Froesner G: First report of serological evidence of hepatitis E virus infection in swine in northern Greece, *Acta Veterinaria*, 59, 2-3, 205-211, 2009.
2. Bartolo I. D., Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F. and Rugger FM: Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy, *Vet. Microbiology*, 132, 47-55, 2008.

3. Bouwknegt M, Lodder-Verschuur F, Poel W.H., Rutjes S. Husman A: Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in the Netherlands, *J. Food Protect* 70, 2889-2895, 2007.
4. Casas M, Pujols J., Rosell R., Deus de N., Peralta B., Pina S., Casal J. and Martín M: Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain, *Vet. Microbiology*, 135, 248-252, 2009.
5. Chandler J. D., Riddell M. A., Li F., Love R.J., Anderson D.A.: Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds, *Vet. Microbiology* 68, 95-105, 1999.
6. Choi IS, Kwon HJ, Shin NR and Yoo HS: Identification of Swine Hepatitis E Virus (HEV) and Prevalence of Anti-HEV Antibodies in Swine and Human Populations in Korea, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 8, 3602-3608, 2003.
7. Delić D, Nešić Z., Žerjav S., Pešić I., Popović N., Simonović J.: Hepatitis E virusna infekcija u Srbiji: epidemiologija i klinička slika; *Archives of Gastroenterohepatology*, vol. 22, br. 3-4, str. 53-56 (2003)
8. Drobeniuc J, Favorov M. O., Shapiro C. N., Bell B. P., Mast E. E., Dadu A., Culver D., Iarovoi P., Robertson B. H., Margolis H. S.: Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine, *The Journal of infectious diseases*, 184, 12, 1594-7, 2001.
9. Emerson S.U., Purcell R.H.: Hepatitis E virus, *Rev Med Virol*, 13, 45-154, 2003
10. Engle R. E., C. Yu, Emerson S. U., Meng X.-J., R. H. Purcell: Hepatitis E Virus (HEV) Capsid Antigens Derived from Viruses of Human and Swine Origin Are Equally Efficient for Detecting Anti-HEV by Enzyme Immunoassay, *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 12, 4576-4580, 2002
11. Feagins A.R., Opriessnig T., Guenette D.K., Halbur P.G., Meng X.J.: Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA, *J. Gen. Virol.* 88, 912-917, 2007.
12. Ha S.K., Chae C.: Immunohistochemistry for the detection of swine hepatitis E virus in the liver, *Jour of Vir Hep*, 263-267, 2004.
13. Hakze-van der Honing R., Els van Coillie, Wim H.M. van der Poel: Discovery of HEV genotype 4 in swine in Europe through screening of fecal samples, The Netherlands and Belgium, *U. Proceedings, 8th International Congress of veterinary Virology, Budapest (Hungary)*, 2009.
14. Jiménez de Oya N., Galindo I., Romero E.E., Blázquez A.B., Padilla J.A., Halaihel N., Escibano J.M. and Saiz J.C.: Expression and Immunoreactivities of Hepatitis E Virus Genotype 3 Open Reading Frame-2 (ORF-2) Recombinant Proteins Expressed in Insect Cells, *Food and Environmental Virology*, 1, 2, 2009.
15. Jiménez de Oya N., Galindo I., Gironés O., Duizer E., Escibano J.M., Saiz J.C.: Serological Immunoassay for Detection of Hepatitis E Virus on the

- Basis of Genotype 3 Open Reading Frame 2 Recombinant Proteins Produced in *Trichoplusia ni* Larvae, *Journal of Clinical Microbiology*, 2009.
16. Kaba M, Marié JL, Barthet M, Henry M, Tamalet C, Raoult D, Colson P: Frequent transmission of hepatitis E virus among piglets in farms in Southern France, *Journal of Med. Virology*, 81, 1750 – 1759, 2009.
 17. Lupulovic D., Lazic S., Prodanov-Radulovic J., Nereida Jiménez de Oya, Estela Escribano-Romero, Saiz J.C., Petrovic T: First Serological Study of Hepatitis E Virus Infection in Backyard Pigs from Serbia, *J Food and Environmental V.*, DOI. 10.1007/s12560-010-9033-6, 2010
 18. Masuda J., Yano K., Tamada Y., Takii Y., Ito M., Omagari K., Kohno S.: Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, *Japan Hepatology Research*, 31, 3, 178-183, 2005.
 19. Meng X-J, Purcell R.H., Halbur G.P., Lehman J.R., Webb D.M., Tsareva T.S., Hayns, Brad J., Thacker J.S., Emerson S.U.: A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, pp 9860-9865, (1997)
 20. Meng, X.J., Halbur, P. G., Shapiro, M. S., Govindarajan, S., Bruna, J. D., Mushahwar, I. K., Purcell, R. H. & Emerson, S. U. :Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol* 72, 9714–9721, 1998.
 21. Meng X.J.: Swine hepatitis E virus: Cross-species infection and risk in xenotransplantation, *Curr Top Microbiol Immunolo*, 278, 85-216, 2003.
 22. Meng X. J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D. K., Toth T. E, Engle R. E., Emerson S. U., Purcell R. H.: Prevalence of Antibodies to Hepatitis E Virus in Veterinarians Working with Swine and in Normal Blood Donors in the United States and Other Countries, *J Clin Microbiol*, 40, 117-22, 2002.
 23. Peralta B., Casas M, Deus de N, Martín M., Ortuño A., Martín E.P, Pina S., Mateu E.: Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA 2009, *Vet. Microbiology* 137, 66-73, 2009.
 24. Petrovic T., Prodanov J., Lazic S.: First preliminary results on the presence of hepatitis E virus in swine population in Serbia. U: *Proceedings, Symposium Current Developments in Food and Environmental virology/COST Action 929, A European Network for Environmental ad Food Virology*, Pisa, Italy, 52-53, 2008.
 25. Pinto R., Saiz J.C.: Enteric hepatitis viruses,. *Perspectives in medical virology*, vol. 17. Human viruses in water. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. A. Bosch (ed.), 39-67, 2007.
 26. Reuter G., Fodor D., Forgách P, Kátai A., Szűcs G.: Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary, *Journal of Clinical Virology*, 44, 4, 277-281, 2009.

27. Seminati C., Mateu E., Peralta B., de Deus N., Martin M.: Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain, *Vet. Journal*, 130-132, 2008.
28. Skidmore, S. J., Yarbrough P.O., Gabor K.A., G.R. Reyes: Hepatitis E virus: the cause of a waterborne hepatitis outbreak. *J. Med. Virol.* 37, 58-60, 1992.
29. Tei S., Kitajima N., Takahashi K., Mishiro S: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings, *Lancet*, 362, 371-373, 2003.
30. Toshinori T., Masaharu T., Eiji K. and Hiroaki O.: Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus, *J Gen Virol* 88, 903-911, 2007.
31. Vasickova P., Psikal I., Widen F., Smitalova R., Bendova J., Pavlik I., P. Kra-lik: Detection and genetic characterisation of hepatitis E virus in Czech pig production herds, *Res Vet Sci*, 87, 1, 143-8, 2009.
32. Wang Y.C, Zhang H.Y, Xia N.S., Peng G., Lan H.Y., Zhuang H., Zhu Y.H., Li S.W., Tian K.G., Gu W.J., Lin X.J., Wu X., Li H.M., Harrison J.T.: Prevalence, Isolation, and Partial Sequence Analysis of Hepatitis E Virus From Domestic Animals in China, *Journal of Medical Virology*, 67, 516-521, 2002
33. Wengui L, Ruiping S., Haitao W., Jingyi Z., Yinghua W., Quan S., Yanmei Z., Decheng W and Ruiwen L: Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China, *Veterinary Microbiology*, 133, 75-83, 2009.
34. Worm, H.C., van der Poel W.H.M., Brandstatter G.: Hepatitis E: an overview, *Microbes Infect*, 4, 657-666, 2002.
35. Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Sasaki N., Gotanda Y., Okamoto H: Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food, *J Gen Virol*, 84, 2351-2357, 2003.
36. Yoo D., Willson P, Pei Y, Hayes MA, Decker A., Dewey C.A., Friendship R.M., Yoon Y., Gottschalk M., Yason C., Giulivi A: Prevalence of Hepatitis E Virus Antibodies in Canadian Swine Herds and Identification of a Novel Variant of Swine Hepatitis E Virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* , 1213-1219, (2001).
37. Zanetti A. R.; Schlauder G. G.; Romano L.; Tanzi E.; Fabris P; Dawson G. J.; Mushahwar I. K.: Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy, *J. Med. Virol*, 57, 356-360, 1999.

Primljeno: 25.05.2011.
Odobreno: 20.09.2011.

Originalan rad

UDK 619:616.12-008.1:636.7

KARDIOVASKULARNI POREMEĆAJI INDUKOVANI PRODUŽENOM ANESTEZIJOM KOD PASA

Ljubica Spasojević Kosić^{1*}, Dragiša R. Trailović²

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

²Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Kratak sadržaj

Budući da su komplikovani i obimni hirurški zahvati, koji zahtevaju duži period rada, povezani sa značajnim hemodinamskim poremećajima, ostaje nejasno koliko trajanje anestezije i operacije ima nezavisan efekat na posledice anestezije. U ovom radu ispitan je uticaj šestočasovne anestezije kod 10 pasa, koji nisu podvrgnuti nikakvoj operaciji. Direktnom metodom merenja arterijskog pritiska, praćenjem elektrokardiograma i merenjem diureze procenjeni su kardiovaskularni poremećaji u produženoj anesteziji. Tokom produžene anestezije kod pasa registrovano je statistički značajno smanjenje sistolnog (SAP) ($p < 0,05$, $p < 0,01$), srednjeg (MAP) ($p < ,05$) arterijskog pritiska, srčane frekvencije (SF) ($p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) i diureze ($p < 0,01$, $p < 0,001$), dok je regularnost srčanog ritma bila očuvana. I pored očuvanosti vrednosti pritiska u okviru autoregulatornih granica, uzajamne vrednosti MAP i SF, kao i promene polariteta T talasa, tokom produžene anestezije ukazuju na opasnost od ishemije miokarda.

Ključne reči: produžena anestezija, psi, krvni pritisak, elektrokardiogram

Cardiovascular disturbances related to 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

As major surgical procedures, which last longer, are associated with significant hemodynamic changes, it is unclear how much the duration of both anesthesia and surgery has an independent effect on the outcomes.

*E- mail: ljubicask@polj.uns.ac.rs

In this work the influence of six hours' anesthesia was studied on 10 dogs, under no surgery. Prolonged anesthesia was evaluated by direct blood pressure measurement, ecg monitoring and urine collection. During prolonged anesthesia in dogs, decreases of systolic (SAP) ($p < 0.05$, $p < 0.01$), mean (MAP) ($p < 0.05$) blood pressure, heart rate ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) and urine output ($p < 0.01$, $p < 0.001$), were significant, but the regularity of heart rhythm was maintained. Although blood pressure is preserved within autoregulatory range, the coexisting values of mean blood pressure and heart rate, and T wave polarity changes, point out to existence of myocardial ischemia.

Key words: prolonged anesthesia, dogs, blood pressure, electrocardiogram

UVOD

U hirurškoj praksi često je nemoguće predvideti vreme trajanja operacije. Brojne komplikacije, koje se mogu javiti tokom složenih hirurških zahvata, mogu da dovedu do takve situacije da je za neku hiruršku intervenciju potrebno nekoliko časova rada u opštoj anesteziji. Nisu retki ni slučajevi kada je zbog poremećenih homeostatskih mehanizama organizma ili neadekvatnog anesteziološkog protokola, vreme buđenja iz anestezije produženo na više časova. Obično su velike hirurške procedure povezane sa većim hemodinamskim poremećajima i drugim stresovima. Da li trajanje anestezije i operacije ima nezavisan efekat na posledice anestezije, nije razjašnjeno. Operacije bilo kog tipa, kao i perioperativni period su povezani sa znatnim srčanim morbiditetom i mortalitetom (Falk i Jonsson, 2000; Bosnjak, 2007; Devereaux i sar., 2005). Otkrivanje postojanja ishemije miokarda tokom perioperativnog perioda je značajno, jer omogućava sprečavanje progresije ishemije do infarkta miokarda. Elektrokardiografija (EKG) je neinvazivno i dostupno dijagnostičko sredstvo, ali ova metoda ipak nije dovoljno osetljiva i specifična. Transezofagealna ehokardiografija otkriva ishemiju miokarda preko identifikovanja akutnih abnormalnosti pokreta segmenata zida komora. Ovakve promene se kod ljudi dešavaju pre i češće nego EKG promene, ali zahtevaju viši stepen znanja i veština da bi se tačno interpretirale (Smith i sar., 1985; Shanewise, 2006). U veterinarskoj kliničkoj elektrokardiografiji (Edwards, 1987; Kittleson, 1998) promene konfiguracije i polariteta T talasa, kao i elevacije ST segmenta, ukazuju na hipoksiju/ishemiju miokarda. U veterinarskoj medicini, međutim, nisu uspostavljeni ehokardiografski pregledi sa aspekta provere regionalne pokretljivosti segmenata leve komore. U ovom radu smo pratili hemodinamske parametre i elektrokardiogram, budući da oni čine varijable koje se prate tokom procene stanja pacijenta u anesteziji i operaciji. Praćenjem hemodinamskih varijabli tokom operacije (centralni venski pritisak, kapilarni pulmonalni

pritisak, arterijski krvni pritisak i srčana frekvencija) je procenjeno da prag za ishemiju miokarda indukovanu srčanom frekvencijom zavisi od koegzistirajuće vrednosti krvnog pritiska i obrnuto. Hemodinamski parametar koji predskazuje intraoperativnu ishemiju miokarda predstavlja količnik srednjeg arterijskog pritiska (MAP) i srčane frakvencije (SF) (Lieberman i sar., 1983; Buffington, 1985). Cilj ovog rada je da se, na osnovu hemodinamskih varijabli i elektrokardiograma, definišu kardiovaskularni poremećaji pri produženoj anesteziji kod pasa. Osim detaljnijeg uvida u efekte anestezije na ishemiju miokarda, rezultati ovog ispitivanja definišu i osnovne fiziološke parametre u produženoj anesteziji kao eksperimentalnom modelu.

MATERIJAL I METOD RADA

Ispitivanje je sprovedeno na 10 zdravih pasa mešanaca starosti 12 meseci, telesne mase od 5 do 27 kg. Psi su držani u karantinu u trajanju od najmanje 14 dana pre uključivanja u ogled. Pre nego što je svaki pas bio uključen u ogled, obustavljeno je davanje hrane 12 sati pre anestezije, dok je voda uskraćena 2 sata pre anestezije. Svaki pas je proveo u anesteziji punih 6 časova. Anestezija je u eksperimentu sprovedena korišćenjem midazolam/halotan/azotoksidul. Pankuronijum bromid je, nakon uvida u anesteziju, aplikovan intravenski, kako bi se olakšala endotrahealna intubacija. Nakon uvida u opštu anesteziju, psi su intubirani korišćenjem endotrahealnih tubusa odgovarajućeg promera, shodno veličini životinje, a zatim su povezani sa aparatom Drager. Kod svakog psa je izvršeno preparisanje obe arterije femoralis. Jedna a. femoralis je pomoću kanile povezana sa aparatom Dynograph R 411-Beckman, koji je pratio promene krvnog pritiska. Druga a. femoralis je pomoću kanile povezana sa aparatom Datoskop 5000 sa monitorom, koji je prethodno baždaren za kontinuirano praćenje i merenje arterijskog krvnog pritiska, srčane frekvencije i elektrokardiograma (II odvod). Merenje sistolnog arterijskog pritiska (SAP) i dijastolnog arterijskog pritiska (DAP) je izvršeno putem insercije katetera u a. femoralis, a vrednosti su registrovane pomoću navedenih instrumenata. Srednji arterijski pritisak (MAP) je izračunat korišćenjem formule: $MAP = (SAP + 2 \times DAP) / 3$. Budući da su navedeni aparati merili vrednosti pritiska u mmHg, rezultati eksperimenta su izraženi u mmHg. Kod pasa u eksperimentu je praćena diureza, na početku anestezije, 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, analiza varijanse i korelacija. Za statističku obradu svih rezultata, korišćen je programski paket Statistica version 7.0. Vrednosti $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$ su uzete kao statistički značajne.

REZULTATI

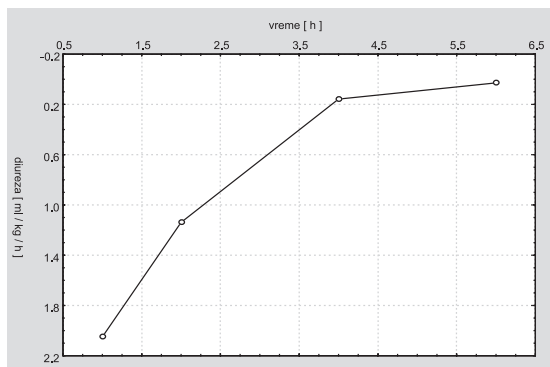
Imajući u vidu preparisanje krvnih sudova, kao kontrolne vrednosti za procenu kardiovaskularnih efekata produžene anestezije uzete su vrednosti na kraju prvog sata anestezije. Tokom održavanja anestezije SAP, MAP i DAP su se smanjivali. U odnosu na kontrolnu vrednost SAP (vrednost 1), skoro sve vrednosti su bile statistički značajno smanjene ($p < 0,05$, $p < 0,001$). Samo vrednosti 4 i 6 nisu pokazale značajno odstupanje od kontrolne vrednosti. Promene SAP tokom produžene anestezije nisu bile klinički značajne. Vrednost MAP tokom šestog sata anestezije je pokazala značajno smanjenje u odnosu na kontrolnu vrednost ($p < 0,05$). Ostale vrednosti MAP nisu bile značajno smanjene. Promene MAP tokom produžene anestezije kod pasa nisu imale klinički značaj. Tokom trajanja anestezije nijedna vrednost DAP nije pokazala značajno smanjenje u odnosu na kontrolnu vrednost. Sve vrednosti DAP su bile u okviru ranga normalnih vrednosti tokom šest sati anestezije. Srčana frekvencija (SF) se smanjivala tokom anestezije. Vrednosti u toku trećeg časa anestezije (vrednosti 4 i 5) su bile značajno smanjene u odnosu na kontrolnu vrednost ($p < 0,05$ i $p < 0,01$), dok su kasnije vrednosti srčane frekvencije pokazale veoma značajno smanjenje ($p < 0,001$). Tokom prva 3,5 sata trajanja anestezije srčana frekvencija je predstavljala tahikardiju, da bi u sledeća 2,5 sata anestezije ona bila svedena na normalnu vrednost. Vrednosti količnika MAP/SF tokom produžene anestezije kod pasa su bile manje od jedan.

Tabela 1. Vrednosti ($\bar{x} \pm SD$) krvnog pritiska i srčane frekvencije tokom anestezije

kontrola vreme	1 1h	2 1h43min	3 2h26min	4 3h9min	5 3h52min	6 4h35min	7 5h18min	8 6h
SAP mmHg	172,90 $\pm$ 30,78	* 157,50 $\pm$ 28,15	* 160,40 $\pm$ 28,98	151,80 $\pm$ 39,02	** 146,60 $\pm$ 26,92	153,40 $\pm$ 36,88	** 143,10 $\pm$ 24,73	* 137,56 $\pm$ 24,96
MAP mmHg	124,23 $\pm$ 33,41	117,10 $\pm$ 31,91	117,47 $\pm$ 31,38	112,53 $\pm$ 37,82	111,40 $\pm$ 28,46	117,40 $\pm$ 38,14	* 106,77 $\pm$ 23,26	103,33 $\pm$ 29,74
DAP mmHg	99,90 $\pm$ 35,34	96,90 $\pm$ 34,73	96,00 $\pm$ 34,04	92,90 $\pm$ 37,68	93,80 $\pm$ 30,09	99,40 $\pm$ 39,98	88,60 $\pm$ 23,66	86,22 $\pm$ 32,94
SF br/min	195,85 $\pm$ 38,69	184,11 $\pm$ 25,83	181,05 $\pm$ 21,43	* 167,10 $\pm$ 34,46	** 150,35 $\pm$ 30,30	*** 141,80 $\pm$ 35,39	*** 138,40 $\pm$ 34,15	*** 134,69 $\pm$ 33,36
MAP/SF	0,67 $\pm$ 0,28	0,65 $\pm$ 0,23	0,65 $\pm$ 0,16	0,69 $\pm$ 0,25	0,76 $\pm$ 0,23	0,88 $\pm$ 0,37	0,81 $\pm$ 0,24	0,83 $\pm$ 0,33

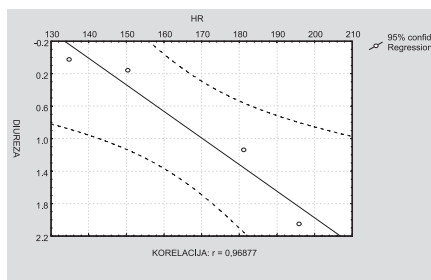
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Vrednosti diureze tokom produžene anestezije kod pasa bile su: $2,05 \pm 0,56$ ml/kg/h, $1,14 \pm 0,32$ ml/kg/h, $0,16 \pm 0,08$ ml/kg/h i $0,03 \pm 0,05$ ml/kg/h. Merenje diureze na kraju drugog, četvrtog i šestog časa anestezije je pokazalo statistički veoma značajno smanjenje u odnosu na vrednost na kraju prvog sata, koja je uzeta kao kontrolna vrednost ($p < 0,01$ i $p < 0,001$). Vrednosti diureze na kraju prvog i drugog sata anestezije su bile u rang normalnih vrednosti proizvodnje urina. Vrednost na kraju četvrtog časa je predstavljala oliguriju, dok je vrednost diureze na kraju anestezije predstavljala anuriju.

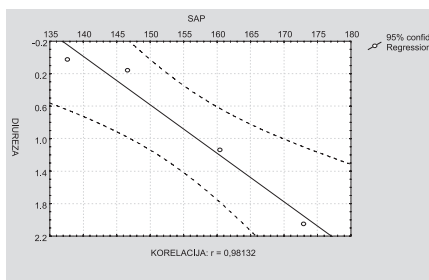


Grafikon 1: Smanjenje diureze kod pasa tokom anestezije

Ispitivanjem postojanja korelacije između hemodinamskih parametara i diureze tokom anestezije, ustanovljeno je postojanje korelacije između SAP i diureze ($r=0,97$) i srčane frekvencije i diureze ($r=0,97$).



A



B

Grafikon 2: Korelacija između sistolnog arterijskog pritiska i diureze (A) i između srčane frekvencije i diureze (B) tokom produžene anestezije

Srčani ritam tokom anestezije je bio sinusnog porekla. Registrovane aritmije bile su sinusna tahikardija, sinusna aritmija, supraventrikularni prevremeni kompleksi (SVPC), AV blok drugog stepena. Za vreme anestezije javljala se sinusna tahikardija sa blokom (drugi stepen AV bloka, tip 2) kod pasa 1, 2, 3, 4, 6 i 7, dok je kod psa 8 AV blok bio prisutan pri normalnoj srčanoj frekvenciji. Kod pasa 1, 3 i 10 zabeležena je pojava supraventrikularnih prevremenih kompleksa (SVPC) tokom anestezije. Aritmije koje su se javile tokom trajanja anestezije su bile povremene i nisu imale većeg kliničkog značaja. Tokom trajanja anestezije zabeležene su i promene polariteta i konformacije T talasa kod 4 psa (pas 1, 2, 5, 7).

Tabela 2. Osnovne varijable u vreme disritmije

Redni broj psa	Ritam	Vreme	AP (mmHg)	SF (br/min)
Pas 1	1) SVPC 2) sinusna tahikardija sa blokom	1) 1:47:40 2) 1:47:40	1) 123/96/85 2) 123/96/85	1) 183/min 2) 183/min
Pas 2	1) sinusna tahikardija sa blokom; 2) sinusna tahikardija sa blokom	1) 2:52:56 2) 3:58:46	1) 131/90/74 2) 147/113/99	1) 173/min 2) 196/min
Pas 3	1) sinusna tahikardija sa blokom 2) SVPC 3) sinusna tahikardija sa blokom 4) sinusna tahikardija sa blokom	1) 0:11:18 2) 0:11:52 3) 1:10:30 4) 2:33:00	1) 194/140/117 2) 198/140/111 3) 195/145/115 4) 185/130/103	1) 176/min. 2) 200/min 3) 187-200-214/min 4) 214-230/min
Pas 4	1) sinusna tahikardija sa blokom; 2) sinusna tahikardija sa blokom	1) 1:05:58 2) 3:13:28	1) 154/122/100 2) 162/131/112	1) 166-176/min 2) 166,66/min
Pas 6	1) sinusna tahikardija sa blokom	1) 0:00:09	1) 221/161/127	1) 244/min.
Pas 7	1) sinusna tahikardija sa blokom	1) 0:24:02	1) 143/109/94	1) 187/min.
Pas 8	1) NSR sa blokom 2) NSR sa blokom	1) 3:44:04 2) 4:32:22	1) 137/107/97 2) 129/109/98	1) 96/min 2) 81/min
Pas 10	1) junkcionalni kompleks	1) 0:00:10	1) 114/83/63	1) 211/min

DISKUSIJA

Ključ svakog anesteziološkog protokola je monitoring i podrška kardiovaskularnog sistema (Ludders, 1995). Monitoring tokom anestezije predstavlja proces zahvaljujući kome anesteziolozi prepoznaju i ocenjuju potencijalne fiziološke probleme u funkciji vremena. Efikasni monitoring smanjuje mogućnost nastanka negativnih posledica anestezije, time što identifikuje poremećaje pre nego što oni dovedu do ozbiljnih ili ireverzibilnih oštećenja (Vender i Gilbert, 1996). Normalne vrednosti sistolnog, dijastolnog i srednjeg krvnog pritiska iznose 13,33-21,33 kPa, 8,00-13,33 kPa i 10,67-16 kPa (odnosno 100-160, 60-100, i 80-120 mmHg). Sistolni pritisak ispod 10,67 kPa (80 mm Hg) i srednji pritisak ispod 8 kPa (60 mm Hg) imaju za posledicu neadekvatnu cerebralnu i koronarnu perfuziju i zbog toga zahtevaju terapiju (Haskins, 1995). I pored više oblika monitoringa kardiovaskularne funkcije (praćenje arterijskog pritiska, EKG, centralni venski pritisak) treba istaći da nijedna od njih nije tako pouzdan pokazatelj adekvatnosti tkivne perfuzije, kao što je to diureza. Normalna vrednost proizvodnje urina tokom anestezije iznosi od 1-2 ml/kg/h (Ludders, 1995).

Na kraju prvog sata anestezije vrednosti SAP, MAP i srčane frekvencije su iznad normalnih vrednosti, dok je DAP na gornjoj fiziološkoj granici. Ovakvi nalazi (hipertenzija i tahikardija) indirektno ukazuju na povišeni nivo simpatikusne aktivnosti. Brojni faktori, kao što su preoperativni period, indukcija anestezije, endotrahealna intubacija, korišćeni anestetici, mogu da utiču na povećanje simpatikusne eferentne nervne aktivnosti. Preoperativni period, kad su u pitanju veterinarski pacijenti, veoma je težak za ispitivanje, zbog nemogućnosti saznanja subjektivnog doživljaja uznemirenosti pacijenta tokom ovog perioda. Takođe je pitanje, koliko bi se dobili validni rezultati prilikom merenja koncentracije kateholamina u plazmi tokom preoperativnog ili perioperativnog perioda, jer se ne može isključiti reagovanje životinja pri manipulacijama kao što su uzimanje uzoraka krvi, uvod u anesteziju, intubacija traheje. Poznato je da midazolam dovodi do značajnog smanjenja koncentracije kateholamina plazme, naročito noradrenalina (Derbyshire i sar., 1984). Pankuronijum bromid predstavlja indirektni simpatomimetički agens (Domenech i sar, 1976; Salt i sar., 1980). Halogenirani inhalacioni anestetici prouzrokuju dozno zavisnu kardiopulmonalnu depresiju, koja obuhvata smanjenje srčanog indeksa, srednjeg arterijskog pritiska i vaskularnog otpora. Halotan proizvodi malu kardiopulmonalnu depresiju, slično izofluranu. Najmanje menjanje SF javlja se pri anesteziji halotanom. Halotan je približno podjednako hipotenzivan anestetik kao i izofluran i metoksifluran. Zbog svojih svojstava da sprovedni sistem srca čini osetljivim na aritmogenične efekte kateholamina, kontraindikovano ga je koristiti kod pacijenata koji su skloni

pojavi srčanih aritmija (Bednarski, 1989). Azot oksidul deluje kao direktni i indirektni simpatomimetički agens (Kawamura i sar., 1980; Ebert i Kampine, 1989; Ebert, 1990; Sellgren i sar., 1990).

Produžena anestezije pasa sa midazolamom, halotanom i azotoksidulom dovodi do statistički značajnog smanjenja SAP, MAP i SF i nemanjanja DAP. Klinički je značajno samo postojanje tahikardije tokom 3,5 sata anestezije, zbog štetnog efekta koji ona ima na snabdevanje miokarda kiseonikom. Ovo može da se objasni uticajem korišćenih anestetika i refleksnim reakcijama organizma na promene pojedinih varijabli pod uticajem upotrebljenih anestetika, odnosno hemodinamskim odgovorima organizma. Budući da tokom trajanja anestezije nismo koristili infuzione rastvore, ni lekove, radi „podrške“ organizma, postepeno je, i pored održavanja srčane frekvencije i arterijskog pritiska u fiziološkim granicama, dolazilo do slabljenja regulacije pritiska.

Normalni ili adekvatni krvni pritisak se zahteva za perfuziju tri glavna vaskularna područja u organizmu: mozak, srce i bubrezi. Sva tri vaskularna područja poseduju prirodno visok otpor proticanju krvi, pa zahtevaju visoke pritiske kako bi se obezbedio protok krvi kroz njih (Braunwald, 1974). Ova vaskularna područja zahtevaju da srednji sistemski arterijski krvni pritisak bude iznad 50-60 mmHg (Kittleson, 1998). Kada dijastolni krvni pritisak pada ispod autoregulatorne granice, koronarni krvotok se smanjuje (Mangano, 1990). Prag ishemije je uzajamno zavisian od srčane frekvencije i koegzistirajućeg krvnog pritiska. Ishemija se ne javljala, ako je srednji arterijski krvni pritisak veći od srčane frekvencije (Buffington, 1985). Za vreme trajanja anestezije srednje vrednosti SAP, MAP i DAP su se kretale u okviru ranga autoregulatorne granice. Međutim, vrednosti srednjeg arterijskog pritiska su bile veće od srčane frekvencije u istim kontrolnim vremenskim intervalima anestezije, odnosno količnik $MAP/HR > 1$, što ukazuje na postojanja ishemije miokarda.

Najznačajniji EKG nalaz u okviru našeg istraživanja je pojava AV bloka drugog stepena tip II (Mobitz II). Mobitz tip II, koga karakteriše iznenadna slabost provođenja impulsa, bez promena PR intervala, je povezan sa ozbiljnim bolestima (Lunney i Ettinger, 1995). Mobitz tip II je u vezi sa oboljenjima srca, uključujući fibrozu AV čvora, Hisovog snopa ili snopa grana (Edwards, 1987) i može da se pogorša i dovede do pojave AV bloka trećeg stepena ili razvoj Stokes-Adams napada (Lunney i Ettinger, 1995). Istraživanja Lazzara i sar. 1975 (cit. Kittleson, 1998) su pokazala da ishemija Hisovog snopa može prouzrokovati pojavu tip I AV bloka drugog stepena kod pasa. Kod svih pasa kod kojih se javio AV blok drugog stepena, izgled QRS kompleksa je bio normalan, što ukazuje da se kašnjenje javlja iznad bifurkacije snopova grana. Budući da je ovo istraživanje sprovedeno na zdravim psima, u sklopu ostalih rezultata ($MAP/HR > 1$ i menjanje polariteta T talasa tokom anestezije kod pasa), može se pretpostaviti da je mogući mehanizam pojave Mobitz II ishe-

mija tokom anestezije. Za vreme trajanja anestezije AV blok II stepena nije progredirao do kompletnog AV bloka. Kod 6 pasa (pas 1, 2, 3, 4, 6 i 7) kod kojih se javio AV blok drugog stepena bila je prisutna sinusna tahikardija, dok je samo kod psa br. 8 AV blok bio prisutan pri normalnoj srčanoj frekvenciji.

Bubrezi su sposobni za automatsko regulisanje i održavanje relativno konstantnog renalnog krvnog protoka u okviru ranga perfuzionog pritiska 80-180 mmHg. Renalni protok krvi i intenzitet glomerularne filtracije se smanjuju kada perfuzioni pritisak pada ispod 80 mmHg i prekidaju se pri pritisku ispod 50 mmHg (Osborne i sar., 1983). Čak i u uslovima adekvatnog srednjeg krvnog pritiska perfuzija bubrega može da bude neadekvatna, ako je vaskularni otpor u bubrezima suviše veliki. Krvni sudovi bubrega su bogato inervisani simpatikusnim nervnim vlaknima, koji dovode do vazokonstrikcije preko α -adrenergičnih receptora (Mason, 1997). Simpatikusni nervni sistem reaguje na traumu, šok ili bol oslobađanjem noradrenalina, koji deluje na arteriole bubrega slično angiotenzinu II. Noradrenalin takođe aktivira renin-angiotenzin-aldosteron sistem i prouzrokuje oslobađanje antidiuretičnog hormona (Monk, Weldon, 1996; Badr, Ichikawa, 1988). Krajnji rezultat odgovara na stres karakteriše se skretanjem krvnog protoka iz renalnog korteksa u medulu, "željnu" reapsorpcije natrijuma i vode i smanjenje proizvodnje urina. Intenzivniji odgovor na stres može, prouzrokovanjem konstrikcije aferentne arteriole, da dovede do pada protoka krvi kroz bubrege i smanjenja intenziteta glomerularne filtracije. Ako ovakva ekstremna situacija nije reverzibilna, može da dođe do ishemičnih oštećenja bubrega i akutna bubrežna insuficijencija (ABI) može da postane klinički manifestna (Badr, Ichikawa, 1988). Bez dovoljnog spiranja toksičnih supstanci iz renalnih tubula, zbog neadekvatnog volumena urina, može da se razvije postanestetička akutna tubularna nekroza (ATN), pa ireparabilna oštećenja bubrega mogu da budu krajnja posledica čak i kod životinja, koje preoperativno pate samo od blagih poremećaja (Mason, 1997).

Smanjenje diureze tokom anestezije nije bilo praćeno hipotenzijom, ali je ustanovljeno postojanje korelacije između promena SAP i srčane frekvencije tokom anestezije i smanjenja diureze. Tokom prva dva sata anestezije diureza je odgovarala normalnim vrednostima. Od kraja drugog do kraja četvrtog sata anestezije vrednosti diureze su predstavljale oliguriju, dok se od kraja četvrtog do kraja šestog sata anestezije javila anurija. Rezultati ovog ispitivanja ukazuju da tokom produžene anestezije, počevši od trećeg sata anestezije, dolazi do naglog pada diureze, tako da se javlja intraoperativna oligurija i anurija. U uslovima produžene anestezije kod pasa diureza se održavala u okviru normalnih vrednosti dva sata, dok nakon toga adekvatna perfuzija bubrega nije postojala. Smanjenje diureze tokom održavanja anestezije, kao i oligurija i anurija su posledica povećane simpatikusne aktivnosti i renin-angiotenzin aktivnosti. Održavanje diureze u normalnim granicama je postojalo zahvaljujući

visokom SAP. Ali kako je tokom održavanja anestezije dolazilo do značajnijeg smanjenja SAP, vrednosti SAP nisu bile dovoljne da savladaju otpor proticanju krvi kroz bubrege. Ostaje da se utvrdi da li tokom šestočasovne anestezije dolazi do razvoja ABI ili ATN.

Potrebno je spomenuti neka ograničenja ovog istraživanja. Postojanje promena elektrokardiograma tokom anestezije mora da bude dodatno analizirano i potvrđeno od strane drugih istraživanja. U tom smislu može se predložiti korišćenje intrakavitarnih i epikardijalnih snimanja elektrokardiograma, u cilju preciznijeg registrovanja poremećaja provođenja impulsa, odnosno depresije ST segmenta, kao i korišćenje transezofagealne ehokardiografije i subendokardijalno postavljanje ultrazvučnih piezoelektričnih kristala, sa ciljem utvrđivanja poremećaja regionalnih pokreta zida, koji ukazuju na ishemiju. Antemortem dijagnostika ishemije miokarda i oštećenja miokarda nastalih kao posledica ishemije može se sprovesti i paralelnim ispitivanjem biomarkera kao što su moždani natrijumuretični peptid (BNP), troponini i kreatin kinaza izoenzim specifičan za miokard. Na ovaj način bi se paralelnim ispitivanjima omogućilo sigurno definisanje hemodinamskih varijabli koje mogu da predvide ishemiju miokarda tokom perioperativnog perioda.

Zaključak

Produžena anestezija sa midazolamom, halotanom i azotokidulom dovodi do statistički i klinički značajnih promena hemodinamskih varijabli. Elektrokardiografske promene T talasa i hemodinamska varijabla-količnik MAP/SF ukazuju na opasnost od postojanja ishemije miokarda. Dalja istraživanja su potrebna kako bi se metodama, koje su osjetljivije i specifičnije od konvencionalne elektrokardiografije, dokazalo postojanje ishemije.

Literatura

1. Badr K.F., Ichikawa I.: Prerenal failure: A deleterious shift from renal compensation to decompensation, *N Engl J Med*, 319: 623-631, 1988.
2. Bednarski R.M.: Anesthesia and pain control. *Vet Clin North Am (Small anim. pract.)*, 19, 6, 1223-1238, 1989.
3. Bosnjak Z.J.: Anesthetics and cardioprotection. *Signa Vitae*, 2 suppl 1, 6-10, 2007
4. Braunwald E.: Regulation of the circulation. *N Engl J Med*, 290, 1420-1432, 1974
5. Buffington C.W.: Hemodynamic determinants of ischemic myocardial dysfunction in the presence of coronary stenosis. *Anesthesiology*, 63, 651-662, 1985

6. Derbyshire D.R., Hunt P.C.W., Achola K., Smith G.: Midazolam and thiopentone: catecholamine and arterial pressure responses to induction and endotracheal intubation. *Br J Anaesth*, 56, 429-438, 1984
7. Devereaux P.J., Goldman L., Cook D.J., Gilbert K., Leslie K., Guyatt G.H.: Perioperative cardiac events in patients undergoing noncardiac surgery: a review of magnitude of the problem, the pathophysiology of the events and methods to estimate and communicate risk, *Canadian Medical Association Journal*. 173, 6, 627-634, 2005
8. Domenech J.S., Garcia R.C., Sasiain J.M.R., Loyola A.Q., Oroz J.S.: Pancuronium bromide: an indirect sympathomimetic agent. *Br J Anaesth*, 48, 1143-1150, 1976
9. Ebert T.J., Kampine J.P.: Nitrous oxide augment sympathetic outflow: Direct evidence from human peroneal nerve recordings. *Anesth Analg* 69, 444-449, 1989
10. Ebert T.J.: Differential effects of nitrous oxide on baroreflex control of heart rate and peripheral sympathetic nerve activity in humans. *Anesthesiology*, 72, 16-22, 1990
11. Edwards N.J.: Interpreting the electrocardiogram. In: Pedersen D, editor, *Bolton's handbook of canine and feline electrocardiography*, Philadelphia: WB Saunders, 1987, 32 – 60
12. Edwards N.J.: The arrhythmias. In: Edwards N.J., editor, *Boltons Handbook of Canine and Feline Electrocardiography*, Philadelphia: WB Saunders, 1987, 60-152
13. Falk T., Jönsson L.: Ischaemic heart disease in the dog: a review of 65 cases. *JSAP*, 41, 97 – 103, 2000
14. Haskins S.C.: Recent advances in patient monitoring devices and anaesthesia management. In: *Proceedings of XX Congress of the WSAVA*, 190-193, 1995
15. Kawamura R., Stanley T.H., English J.B., Hill G.E., Liu W-S., Webster L.R.: Cardiovascular responses to nitrous oxide exposure for two hours in man, *Anesth Analg*, 59, 93-99, 1980
16. Kittleson M.D.: Diagnosis and treatment of arrhythmias (dysrhythmias). In: Kittleson M.D., Kienle R.D., editors, *Small animal cardiovascular medicine*, St Louis: Mosby, 1998, 449-495.
17. Kittleson M.D.: Electrocardiography: Basic concepts, diagnosis of chamber enlargement and intraventricular conduction disturbances. In: Kittleson MD, Kienle RD, editors, *Small animal cardiovascular medicine*, St Louis: Mosby, 1998, 72 – 95.
18. Kittleson M.D.: Pathophysiology of heart failure. In Kittleson M.D., Kienle R.D., editors, *Small animal cardiovascular medicine*, Mosby, St. Louis, 1998, 136-149.

19. Lieberman R.W., Orkin F.K., Jobes D.R., Schwartz A.J.: Hemodynamic predictors of myocardial ischemia during halothane anesthesia for coronary artery revascularization. *Anesthesiology*, 59, 36-41, 1983.
20. Ludders J.W.: Menagement of anesthesia in patients with renal disorders. In: *Proceedings of XX Congress of the WSAVA*, 199-203, 1995.
21. Lunney J., Ettinger S.J.: Cardiac arrhythmias. In: Ettinger S.J., Feldman E.C., editors, *Textbook of Veterinary internal medicine*, Philadelphia: WB Saunders, 1995, 959 – 995.
22. Mangano D.T.: Perioperative Cardiac morbidity. *Anesthesiology*, 72, 153 -184, 1990
23. Mason D.E.: Anesthesia and the urinary system. In: Slatter D., editor, *Textbook of small animal surgery*, Philadelphia: W.B. Saunders, 1997.
24. Monk T.G. and Weldon B.G.: The Renal system and anesthesia for urologic surgery. In: Barash P.G., Cullen B.F., Stoelting R.K. (eds.): *Clinical anesthesia*, 3rd ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996.
25. Osborne C.A., Finco D.R., Low D.G.: Pathophysiology of renal disease, renal failure, and uremia, In: Ettinger S.J., editor: *Textbook of veterinary internal medicine*, 2nd ed., Philadelphia: WB Saunders, 1983, 1805-1833.
26. Salt P.J., Barnes P.K., Conway C.M.: Inhibition of neuronal uptake of noradrenaline in the isolated perfused rat heart by pancuronium and its homologues Org636 8, Org726 8 and NC45. *Br J Anaesth*, 52, 313-319, 1980
27. Sellgren J., Ponten J., Wallin B.G.: Percutaneous recordings of muscle nerve sympathetic activity during propofol, nitruos oxide and isoflurane anesthesia in man. *Anesthesiology*, 73, 20-27, 1990
28. Shanewise J.S.: How to reliably detect ischemia in the intensive care unit and operating room. *Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia*, 10, 1, 101 – 109, 2006
29. Smith J.S., Cahalan M.K., Benefiel D.J., Byrd B.F., Lurz F.W., Shapiro W.A., Roizen M.F., Bouchard A., Schiller N.B.: Intraoperative detection of myocardial ischemia in high-risk patients: electrocardiography versus two-dimension transesophageal echocardiography. *Circulation* 72, 1015-1021, 1985
30. Vender J.S., Gillbert H.C.: Monitoring the anethetized patient. In: Barash P.G., Cullen B.F., Stoelting R.K., editors, *Clinical anesthesia*, 3rd ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996

Primljeno: 25.06.2011.

Odobreno: 20.09.2011.

Pregledni rad

UDK 619:636.5:636.085

NAJČEŠĆE NUTRIOPATIJE U ŽIVINARSKOJ PROIZVODNJI

Miloš Kapetanov*, Dušan Orlić, Dubravka Potkonjak
Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad

Kratak sadržaj

U savremenoj živinarskoj proizvodnji, visoka produktivnost jata približava se biološkom potencijalu hibrida te su i zahtevi u pogledu ishrane i zdravstvene zaštite sve veći. U radu su detaljno analizirana najčešća odstupanja u tehnologiji ishrane, kao što je struktura i distribucija hrane, hranidbeni prostor, stručni i tehnički propusti u dizajniranju sastava kompletnih smeša. Adekvatno i blagovremeno otklanjanje faktora odgovornih za nastanak određene nutriopatije, u vezi sa hranom ili tehnologijom ishrane, predstavlja ključ uspešne živinarske proizvodnje.

Ključne reči: nutriopatije, živina, kvalitet hrane, tehnologija ishrane

THE MOST FREQUENT NUTRIPATHIES IN POULTRY PRODUCTION

Miloš Kapetanov, Dušan Orlić, Dubravka Potkonjak
Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad

Abstract

In modern poultry farming, high productivity approaches close to its biological potentials, so the nutritional and health care requirements are more demanding. In the paper, the most frequent deviations and nutritional requirements are analyzed in detail, such as: structure and distribution of feed, feeding space, expert and technical aberrations in composition of complete diets. Adequate and forehand elimination of factors that had lead to particular nutripthy, directly linked to feed or feeding technology, represent the key of successful poultry production.

Key words: nutripthy, poultry, feed quality, feeding technology

* E-mail: milos@niv.ns.ac.rs

UVOD

Savremena ishrana živine predstavlja veoma precizno zadovoljavanje potreba vrlo zahtevnih novih provijenci živine u cilju profitabilne proizvodnje namirnica animalnog porekla bez štetnih materija (Kapetanov, 1997). Visoka produktivnost koja se sve više približava biološkom maksimumu životinja postavlja i sve veće zahteve, pre svega u pogledu ishrane i zdravstvene zaštite, koje je istovremeno sve teže ispuniti. Otuda često ovakvu proizvodnju u našim uslovima prate brojni problemi i ozbiljno narušavanje kvaliteta proizvoda i zdravstvenog stanja životinja (Kapetanov i sar., 1997). Nastali problemi se karakterišu kao nutriopatije.

U ovom radu ukazano je na najčešće uzroke i posledice nutriopatija u živinarskoj proizvodnji sa ciljem njihovog umanjivanja, odnosno eliminisanja.

KARAKTERISTIKE OBLIKA HRANE

Granulacija hrane. Živina su ptice koje su po prirodi zrnojadi. Pilićima i odrasloj živini je potrebna grubo mlevena brašnasta hrana. Preveliki udeo vrlo finih čestica, kao i prekrupna granulacija hrane dovode do selektivnog uzimanja hrane i neujednačenog snabdevanja pojedinim hranljivim materijama. Sitna granulacija hrane uzrokuje smanjenje konzumacije hrane, što može dovesti do pothranjenosti i ispoljavanja posledica nedostataka pojedinih materija (Pavkov i sar., 1993). U toku vrelog perioda godine, kada je u proizvodnim objektima maksimalno uključena standardna ili tunelska ventilacija, preveliki deo finih – puderastih čestica sa esencijalnim vrednostima hraniva biva izbačen. Prostori ispred i oko ventilatora (crepovi na krovu i deo ekonomskog dvorišta) su prekrivenih naslagama u vidu belih površina.

Oblik hrane varira u velikoj meri jer sam obrok može biti u obliku brašnaste hrane, peleta ili ekstrudata. U nekim delovima sveta je uobičajeno da se pre hranjenja, u samu hranu pomešaju žitarice u zrnju. Uopšteno govoreći peletiranom hranom ili ekstrudatom je mnogo lakše rukovati, u poređenju sa brašnastom hranom. Poznato da pojedinačne čestice ne treba da budu veće od 3 mm u starteru za piliće i 5 mm u hrani živine u odgoju.

Veličina i tvrdoća peleta. Veličina i tvrdoća peleta mora biti usklađena sa vrstom, uzrastom i kategorijom živine. Međutim, ne retko, pelete budu krupne i tvrde. Navedene neusklađenosti peleta kod ishrane živine bivaju evidentne, odmah kod prvog kontrolnog merenja telesnih masa, što će imati tendenciju rapidno zaostajanje u porastu. Opservacijom jata živine zapaža se da je mali broj jedinki oko sistema za hranjenje, te da živina kljunom izbacuje pelete tražeći adekvatne po veličini i tvrdoći. Ostatak jata živine, na pojavu čoveka u objektu, počinju u masi da se kreće za njim uporno ključajući obuću. Oko

sistema za hranjenja postoji dosta izbačene hrane koja se često ne primećuje, ali uklanjanjem tankog sloja prostirke ona se može uočiti. U slučajevima duže konzumacije takvih peleta dolazi do pojave mehaničkih oštećenja usnih duplji. Naša iskustva ukazuju na česte slučajeve pojave kod ćurića u tovu. Prema iskustvima starijih živinara i vlastitim uverenjem o proceni tvrdoće pelete za prvu ruku može da posluži vreme rastvaranja peleta u čaši mlake vode, koja ne sme biti duža od pet minuta za živinu i pola sata za ribe.

Zrnasta hrana u vreme parenja. Važno je napomenuti značajan broj paunova u гине u vreme parenja konzumirajući najčešće celo zrno kukuruza. U proleće za vreme parenja mužjaci pauna se, da bi privukli ženke pored svoje raskošne lepote, veoma glasno oglašavaju kada naiđu na hranu. Odazivanjem ženki na poziv da se u blizini nalazi hrana, mužjak halapljivo uzima celo zrno kukuruza koje ne završava svaki put u jednaku, već odlazi u traheju („jevrejski kraj“) i tu se zauvek zadržava. Tako paun okonča plaćajući glavom muški egoizam. Mužjaci kod kojih je zrno kukuruza otišlo u traheju nekoliko sati uporno pokušavaju da ga izbace kretajući se unazad ispruženog vrata. Vremenom zrno kukuruza bubri otežavajući disanje i dovodi do neizbežnog uginuća. Naravno-učeni je bi bilo da se u vreme parenja jato pauna ne hrani zrnastom hranom, pogotovo ne celim zrnom kukuruza.

HRANIDBENI PROSTOR I DISTRIBUCIJA HRANE

Nezavisno od tipa sistema hranjenja koji se koristi, hranidbeni prostor je od suštinskog značaja. Ukoliko je hranidbeni prostor nedovoljan, stopa prirasta će biti smanjena, a uniformisanost jata značajno ugrožena. Danas napredni tovljači brojerskih pilića u cilju povećanja hranidbenog prostora pored savremene opreme za hranjenje koriste prvih desetak dana tova dodatno ekološki bezbedan samorazgrađujući papir (*chick paper*, papir za piliće) na koji se u manjim količinama a u češćim navratima posipa hrana. Širina samorazgrađujućeg papira je od 1 do 1,5 m, a dužina predstavlja 1/3 proizvodnog objekta. Menadžment brojerske proizvodnje vodio se idejom da u cilju iskorišćavanja genetskog potencijala brojerskih pilića obezbedi dovoljnu količinu potpune smeše, ali i njenu dostupnost, što je ključ za postizanje ciljne stope konverzije hrane. Dosadašnja iskustva ukazuju da ne mali broj pilića posle konzumiranja hrane ostaju u hranilicama onemogućavajući pristup ostalim, a ovakvi slučajevi naročito su izraženi u hladnijem periodu godine. Postavljanjem samorazgrađujućeg papira postiže se povećanje hranidbenog prostora i dostupnosti hrane, što se pozitivno odražava na prirodne pokazatelje proizvodnje pilića.

Nedovoljan hranidbeni prostor i slaba distribucija hrane kod odgojnih jata lakog ili teškog genotipa živine sa restriktivnom ishranom ostavlja posledice na opšte slabe rezultate proizvodnje i zdravstveno stanje;

- U odgojnim farmama živina zaostaje u porastu, uniformisanost telesnih masa jata je nezadovoljavajuća sa visoko izraženim intervalom varijacije.
- Tokom hranjenja jedinke se ozleđuju, naročito glavu, vratove i ekstremitete, jer se istovremeno povećava međusobna konkurencija za hranom. Između osme i petnaeste nedelje uzrasta u fazi odgoja dolazi do masovnih pojava jednostranih ili obostranih otoka skočnih zglobova. Sekcijskim pregledom skočnih zglobova žrtvovanih ili uginulih jedinki konstatovano je zamućenje sinovijalne tečnosti i prisustvo neprijatnog purulentnog sadržaja. Bakteriološkom analizom suspektnih organa redovno je izolovan *Staphylococcus aureus* (Kapetanov i sar., 1999). Dakle, mehaničkim povređivanjem ekstremiteta prilikom neuslovnog hranjenja stvorena su vrata infekcije. Mehaničko povređivanje skočnih zglobova sa stafilokoknom infekcijom uglavnom je prisutno kod odgoja petlova teških roditeljskih linija. Često se postavlja pitanje kasnije funkcionalnosti petlova u eksploataciji roditeljskog jata nakon stafilokokne infekcije skočnih zglobova.

Smanjeno konzumiranje hrane bilo zbog nedovoljnog hranidbenog prostora ili neadekvatne distribucije jedinke kompenzuju žderanjem prostirke i to se naročito dešava u periodu osvežavanja tj. nanošenja novog sloja seckane slame ili hoblovine. U ovakvim prilikama se često javlja klostridioza živine poznata kao štalska infekcija (Kapetanov i sar., 2008).

U odgojnim jatima živine gde se osnovna zaštita protiv kokcidioze ne vrši sprovođenjem imunoprofilakse nego hemoterapijom koristeći lekove-antikokcidijale previdi se da je kod njih prisutna restriktivna ishrana. U takvim uslovima, s jedne strane korišćenjem hemoterapeutika protiv kokcidioze i, s druge strane, restriktivnom ishranom, kokcidioza je vrlo česta pojava, a naročito kada se tehnologija ishrane ne poštuje. Pojava kokcidioze obično koincidira sa vremenom promene antikokcidijala. U našim slučajevima ne retko se dešava pojava mešanih infekcija kokcidioze i klostridioze u odgojnim jatima. Kod ovakvih mešanih infekcija nismo svaki put bili sigurni koja je bolest bila uzrok, a koja posledica. Poučeni ranijim iskustvom potrebno je da se uzorkuju organi na sveobuhvatnu analizu kako bi se moglo sa sigurnošću i blagovremeno primeniti lečenje.

Kod kaveznog sistema eksploatacije komercijalnih koka nosilja neretko su sistemi za hranjenje, takozvani valovi, deformisani tako da dobijaju izgled kanapa. Deo dužine valova koji su u vidu knapa više zadržava hranu i time omogućuje dužu dostupnost kokama ispred čijih se kaveza nalaze u odnosu na ostale.

Analizom strukture uginuća u jatima gde ne postoji dovoljno hranidbenog prostora i neadekvatne distribucije hrane dominiraju: gušenje, gladni mortalitet, tehnološki škart, mehaničke povrede i posledice pojave pojedinih uslovljenih bolesti (Kapetanov i sar., 1997; Kapetanov i sar., 2000; Kapetanov i sar., 2003; Orlić i sar., 2005; Živkov-Baloš, 2007).

STRUČNO TEHNIČKI PROPUSTI U KOMPLETNIM SMEŠAMA I NJENIM KOMPONETAMA

Toksičnost lekova. Prilikom donošenja odluke o sprovođenju terapije u jatima živine koja koriste hranu sa ugrađenim antikokcidijalima neophodno je sagledavanje eventualne kontraindikacije izabranog leka. Istovremena upotreba pojedinih lekova, kao primer jonoformnih antibiotika i tiamulina, monenzina i sulfonamida ili eritromicina i sl., potencira njihovu toksičnost i u terapijskoj dozi. Neželjeni efekti se za vrlo kratko vreme ispoljavaju u vidu ekscitacije jedinki u jatu, ubrzanim i otežanim disanjem, otokom glave, eksudativnom i hemoragičnom dijatezom i uginućem sa ispruženom glavom i donjim ekstremitetima. Dakle, svaku pošiljku proizvedene hrane treba da prati deklaracija u kojoj je naveden svaki dodat sastojak mimo standarda sa njenom kontraindikacijom.

Deficit kalcijuma. Posledica nedostatka kalcijuma u potpunim smešama je konstatovana u svim fazama odgoja i eksploatacije živine, međutim najpogubnija je u punoj fazi proizvodnje jaja. Postavljanje dijagnoze deficita kalcijuma u ovoj fazi je vrlo zahvalno s obzirom na veliki broj slupanih jaja i mekih ljuski, pod uslovom da su isključene moguće virusne infekcije jata. Međutim, kada se u fazi predpronošenja jata ne obezbedi blagovremeno i dovoljno konzumiranje hrane koja će u sebi sadržati veći procenat proteina i kalcijuma kako je tehnologijom ishrane predviđeno, postavljanje dijagnoze je teže. Iznosimo naša iskustva u takvim slučajevima. Nailazili smo na velik broj koka koje su ležale, često sa opuštenom glavom, nakostrešenim perjem na vratu, opruženim nogama bez striktnog pravila i čestim pingvinskim stavom, pokretanje pomažući se krilima, omekšan i deformisan kljun i deformacije grudnog koša usled savijanja sternuma, rebra i kičme.

Deficit vitamina E. Deficit vitamina E u hrani pilića manifestuje se kroz dva sindroma, koji mogu da nastanu zajedno ili pojedinačno i to kao encefalomalacija i eksudativna dijateza pilića.

Encefalomalacija pilića se obično javlja u uzrastu od 2-4. nedelje, ali nisu retki slučajevi da se oboljenje javlja ranije već sa sedmim danom. Prvi simptomi se manifestuju pospanošću, ataksijom, kretanjem u krug, tremorom, kloničnim grčevima, tortikolisom i opistotonusom, nešto kasnije nastupa postrano ležanje i smrt. Sekcijski nalaz je obično oskudan. Samo u retkim slučajevima može se primetiti edem mozga i retka tačkasta krvarenja na površini preseka mozga. Eksudativna dijateza kod pilića se javlja od treće do šeste nedelje života. Na pilićima se uočavaju potkožni edemi na vratu, grudima i abdomenu. Koža na tim mestima je prljavo plave boje i hladna. Prema našim iskustvima, slučajevi oba oblika deficijencije vitamina E javljali su se u letnjem periodu godine i to isključivo u brojerskim jatima pilića koji su postizali izvanredne

priraste. Hrana kojom su hranjeni pilići sa ispoljenom eksudativnom dijatezom često je odavala specifičan miris koji je podsećao na užeglost koja je bila naročito izražena trljanjem hrane između dlanova. Interesantno je napomenuti kao zajedničku osobinu za oba oblika oboljenja da se pilići normalno oglašavaju. Rešavanje nastalih zdravstvenih problema sa zadovoljavajućim uspehom postizali smo kada smo uspjeli da otklonimo uzrok koji je doveo do oboljenja i potpornom terapijom kombinacijom vitamina E i selen. Gotova kombinacija vitamina E i selen već postoji pod komercijalnim imenom "Evitaselen", data u količini 50 ml na 1000 kg žive mere jednokratno u trajanju od tri dana. Takođe, dobre rezultate postizali smo i primenom polivitaminskih preparata koji u svom sastavu sadrže visoke koncentracije vitamina E i A i selen.

Trovanje nedovoljno termički obrađenim sojinim proizvodima. Pored visokog sadržaja hranljivih materija, u soji su prisutne i neke nepoželjne i toksične supstance. Sirovi sojini bobovi sadrže inhibitore tripsina, a takođe lipoksidazu, hemaglutine i alergene. Sve navedene supstance su iz grupe belančevina, koje se u uslovima primene određene temperature obrade denaturišu, a njihova aktivnost se snižava do bezopasnog nivoa. Međutim, u našim ispitivanjima aktivnosti ureaze u sojinim proizvodima (sojina sačmi, pogača i griz) u periodu 2009-2010. godine posle završetka žetve i u toku njene najveće prerade, dobijeni rezultati su bili nepovoljni. Laboratorijskim ispitivanjem utvrđen je značajan udeo neispravnih sojinih proizvoda bilo da su nedovoljno ili preterano termički obrađeni: 19,56% sojine sačme, 28,95% sojinog griza i 14,29% sojine pogače. Slučajevi trovanja živine nedovoljno termički obrađenim sojinim proizvodima zabeleženi su kod svih vrsta i kategorija živine. Najčešće smo oboljenja registrovali kod brojlerskih pilića s obzirom da oni najviše konzumiraju hrane u kojima su ugrađeni sojini proizvodi. Držaoci brojlerskih pilića najčešće su se obraćali za pomoć kada su pilići bili u uzrastu od 3 do 4 nedelje. U tom uzrastu kod pilića se počela jasno uočavati neuniformisanost jata, slaba vitalnost praćena grupisanjem oko grejnih tela i ispoljeni simptomi bolesti u vidu pareze i paralize ekstremiteta i kljućanja prostirke, zida, sistema za hranjenja i napajanja. Prostirka je bila vlažna usled proliva žute do blede crvene boje, uz vidljivi sadržaj nesvarene hrane. Telesna masa pilića bila je ispod zadatih tehnoloških normativa, a u narednim merenjima zaostajanje je bilo sve izraženije. Posle svakog kontrolnog merenja povećavao se broj izdvojenih pilića za koje nije postojala ekonomska opravdanost daljeg tova. Uginuli pilići nalazili su se ravnomerno po celoj površini proizvodnog objekta u položaju sa ispruženim donjim ekstremitetima. Koža i vidljive sluznice pilića bile su blede i anemične, konstatovana je slaba operjalost uz značajno prisustvo paperja i zaprljanosti kloake zbog nalaza retkog izmeta. Sekcijom su utvrđeni slabo razvijeni žlezdani i mišićni želudac, atrofija do hipertrofije pankreasa i izražen kataralni enteritis prednjih partija digestivnog trakta. Anamnestički podaci

držaoca živine, klinička slika i patoanatomski nalaz obolelih i uginulih jedinki nisu signifikantni u postavljanju dijagnoze bez prethodnog uvida u tehnološke pokazatelje proizvodnje i hemijske analize sojinih proizvoda. Interesantno je zapažanje da su redovnim serološkim kontrolama jata nakon izvršenih vakcinacija rezultati vrlo često bili ispod zaštitnih vrednosti za određene bolesti. Kada postoji osnovana sumnja da su sojini proizvodi u potpunim smešama nedovoljno termički obrađeni potrebno ih je odmah zameniti ispravnim uz davanje polivitaminskih preparata koji u sebi sadrže esencijalne aminokiseline (Kapetanov i sar., 2010).

Posledica upotrebe sveže skinutih žitarica u potpunim smešama. Proizvođači stočne hrane ili držaoci živine, zbog nedostatka ili visokih cena pojedinih žitarica na tržištu, kao što su pšenica ili kukuruz, odmah ih po završetku žetve ugrađuju u potpune smeše pri tom ne vodeći računa o procentualnoj zastupljenosti. Ovakve žitarice sadrže nedopustiv visok sadržaj vlage i toksičnu materiju histamin. Konzumirajući ovakve žitarice, ugrađene u potpunim smešama, živina za kratko vreme oboljeva. Simptomi bolesti su pareza, paraliza, eksudativna dijateza, redak sadržaj izmeta sa dosta nesvarenih čestica hrane, kataralni enteritis, a zatim takve jedinke uginjavaju. Simptomi bolesti uglavnom su registrovani u brojerskoj proizvodnji. Otklanjanjem uzroka nastanka oboljenja uz davanje vitamina E i selen problem su bili za kratko vreme rešeni.

ZAKLJUČAK

Adekvatno i blagovremeno otklanjanje nutriopatija u živinarskoj proizvodnji, bilo da je direktno ili indirektno vezano za hranu ili tehnologiju hranjenja, predstavlja bitan ključ uspešne proizvodnje. Analiziranjem nutritivne vrednosti hraniva, odnosno komponenti, hraniva treba isključivo sagledavati kroz njihovu dobrobit za živinu. Kada se tehnološki normativi ne ostvaruju u živinarskoj proizvodnji, u skladu sa vrstom i kategorijom živine, a uslovi držanja su ispunjeni, potrebno je da se ispitivanja usmere na kvalitet hrane i tehnologiju ishrane.

Na živinarskim farmama je potrebno svakodnevno evidentiranje:

- količina i vrsta isporučene hrane sa eventualnim naznakama ili izmenama na deklaraciji;
- organoleptička odstupanja hrane u odnosu na prethodne isporuke: boja, miris, frakcija, rastresitost;
- vreme i dužina hranjenja uz eventualna odstupanja od normalnog: rasipanje, česti i iznenadni prekidi konzumacije hrane uz naizmenično uzimanje vode;

- od svake isporučene količine hrane potrebno je da se uzme reprezentativan uzorak radi eventualne analize.

Svakodnevним zdravstvenim nadzorom u jatima moguće je da se blagovremeno uoče promene kao što su pojava uznemirenosti jedinki u jatu, promene boje i konzistencije fecesa, otok glave, pareza i paraliza ekstremiteta, pojava eksudativnih i hemoragičnih dijateza i dr.

Pri kliničkom pregledu obolele i sekciji uginule živine korisno je da se praktikuje termometriranje i pregled ileocekalnih tonzila. Ovako mali, dodatni pregledi mogu da ukažu da li je u obolelom jatu živine prisutan biološki agens ili neki drugi uzrok.

Kada postoji sumnja na oboljenje jata živine uzrokovano hranom potrebno je smešu zameniti novom količinom, uz potpurnu polivitaminsku terapiju.

LITERATURA

1. Kapetanov M.: Uticaj pojedinih ekonomsko-organizacionih faktora na proizvodnju pilića u tovu na farmi PIK Bečej u periodu od 1988-1995. godine. Magistarski rad, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 1997.
2. Kapetanov M., Mrđen M., Orlić D., Mašić Z., Stojanov I.: Stepen kontaminiranosti plesnima kod kompletnih krmnih smeša za živinu. U: *Zbornik radova*, VII Simpozijum tehnologija stočne hrane, Tara, Novi Sad: Tehnološki fakultet, Zavod za tehnologiju stočne hrane, 1997, 118-123.
3. Kapetanov R., Pejin I., Tešić M., Palić T., Kapetanov M.: Retardation of natural indicators in cooperative production of broiler chicks. U: *Zbornik radova*, XI Svetski kongres živinara, Budimpešta, 1997, 369.
4. Kapetanov M., Stojanov I., Orlić D., Nikolovski N., Palić T.: Stafilocokne infekcije kao problem oboljenja organa za kretanje kod petlića teških roditelja. *Nauka u živinarstvu*, 1-2, 4, 1999.
5. Kapetanov M., Kapetanov R., Suvajdžić LJ., Velhner M.: Prilog poznavanja kolere -pastereloze u roditeljskim jatima. *Živinarstvo*, 35, 11, 211-213, 2000.
6. Kapetanov M., Orlić D., Velhner M.: Osnovni principi tehnologije odgoja nojevskih pilića. *Živinarstvo*, 38, 10, 7-8, 2003.
7. Kapetanov M., Potkonjak D., Stojanov I., Velhner M., Orlić D.: Prisustvo klostridioze u jatu fazanskih roditeljskih parova. U: Blagoje Stančić, urednik, *Zbornik kratkih sadržaja*, Simpozijum Stočarstvo, veterinarstvo i ekonomika u proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane sa međunarodnim učešćem, 22-29. jun, Herceg Novi, Novi Sad: Poljoprivredni fakultet, 2008, 75.

8. Kapetanov M., Orlić D., Potkonjak D., Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Prunić B.: Trovanje živine nedovoljno termički obrađenim sojinim proizvodima i mogućnost preveniranja. In: Jovanka Lević, editor, *Proceedings*, 2nd Workshop FEED-TO-FOOD FP/REGPOT-3 [i] XIV International Symposium Feed Technology, 19-21 October, Novi Sad, Novi Sad: Institut za prehrambene tehnologije, 2010, 242-243.
9. Orlić D., Kapetanov M., Velhner M., Potkonjak D., Milojević M.: Analiza hazarda primenom sistema kritičnih tačaka kontrole (HACCP) u živinarskoj industriji. U: Blagoje Stančić, urednik, *Zbornik kratkih sadržaja*, Simpozijum Stočarstvo, veterinarstvo i agroekonomija u tranzicionim procesima, 19-24. juni, Herceg Novi, Novi Sad: Poljoprivredni fakultet, 2005, 79.
10. Pavkov S., Mašić Z., Mihaljev Ž., Kapetanov M., Kapetanov R.: Ispitivanje uticaja mikroelemenata i toksičnih metala iz hraniva na živinarsku proizvodnju. *Živinarstvo*, 28, 7-9, 75-77, 1993.
11. Živkov-Baloš M., Mihaljev Ž., Kapetanov M., Orlić D., Košarčić S.: Prime-na fitaze u ishrani živine u cilju povećanja svarljivosti mineralnih materija = Effect of phytase in broilers nutrition on performances and availability of mineral matters. *Savremena poljoprivreda*, 56, 1-2, 59-64, 2007.

Primljeno: 25.07.2011.

Odobreno: 20.09.2011.

KONTROLA I DIJAGNOSTIKA AUJESKIJEVE BOLESTI SVINJA*

Ivan Pušić¹, Jasna Prodanov-Radulović, Radoslav Došen,
Tamaš Petrović, Igor Stojanov, Marko Maljković
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

Kratak sadržaj

Aujeskijska bolest (*Morbus Aujeszky*, MA) je infektivno virusno oboljenje, čiji je uzročnik svinjski alfa herpes virus 1. Oboljenje se javlja kod velikog broja različitih vrsta domaćih i divljih životinja, izuzev primata i ljudi. Svinje su prirodni rezervoar virusa i jedina životinjska vrsta koja može preživeti infekciju virusom MA ali i vrsta kod koje postoji mogućnost nastanka subkliničke i latentne infekcije. Uvođenje u zapat subklinički inficiranih svinja predstavlja glavni put širenja infekcije. Sa druge strane, izlaganje organizma dejstvu stresnih faktora (transport, hvatanje, prašenje) može dovesti do reaktivacije latentne infekcije i izlučivanja virulentnog virusa. Cilj rada je bio prikaz metoda koje se koriste u dijagnostici i diferencijalnoj dijagnostici Aujeskijske bolesti svinja. Materijal za ispitivanje je poreklom sa dve farme svinja, na kojima su registrovana povećana uginuća prasadi na sisi. Metode ispitivanja su obuhvatale epizootiološka i klinička ispitivanja, patomorfološki pregled, standardne laboratorijske metode za utvrđivanje prisustva aerobnih i anaerobnih bakterija, izolaciju virusa na kulturi ćelija, serum neutralizacioni test za utvrđivanje titra specifičnih antitela protiv MA i mikrobiološko ispitivanje uzoraka hrane. Pojava MA na farmi svinja koja ne obavlja imunoprofilaksu i nabavlja priplodni materijal sa farmi nepoznatog zdravstvenog statusa može naneti velike štete, kako direktne usled uginuća prasadi, pobačaja tako i indirektne zbog zaostajanja u rastu tovljenika i velikih troškova kontrole oboljenja.

Ključne reči: Aujeskijska bolest, latentna infekcija, dijagnostika

* Rad je realizovan po projektu TR31084 koji se finansira od strane Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije

¹ E-mail: ivan@niv.ns.ac.rs

DIAGNOSIS AND CONTROL OF AUJESZKY'S DISEASE IN PIGS

Ivan Pušić¹, Jasna Prodanov-Radulović, Radoslav Došen,
Tamaš Petrović, Igor Stojanov, Marko Maljković
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad

Abstract

Aujeszky's disease (Morbus Aujeszky, MA) is an infectious viral disease caused by swine alpha-herpes virus 1. The disease may be found in different animal species, both domestic and wild, except in primates and humans. Pigs are a natural reservoir of the virus. They are the only species that can survive the infection, but with a possibility of subclinical and latent infection. The main way of spreading the infection is through introduction of subclinically infected pigs into a herd. On the other hand, if the case of stress (transport, capture, dust) reactivation of latent infection and excretion of the virulent virus occurs. The aim of this study was to present the methods used in diagnosis and differential diagnosis. The material for examination originated from two pig farms with increased mortality of suckling piglets. The epizootic and clinical examination were used as well as pathomorphological examination, standard laboratory methods for determining the presence of aerobic and anaerobic bacteria, virus isolation in cell culture, serum neutralization test for determining the titer of specific antibodies against MA and microbiological testing of feed samples. The cases of MA on the pig farm where immunoprophylaxis against MA was not carried out, and the breeding animals were purchased from pig farms with unknown health status, causes great direct losses, like for example mortality of piglets, abortion, as well as indirect losses, like growth retardation and high cost of disease control.

Keywords: Aujeszky's disease, latent infection, diagnosis

UVOD

Aujeskijska bolest (*Morbus Aujeszky*, MA) je infektivno virusno oboljenje, čiji je uzročnik svinjski alfaherpes virus 1. Oboljenje se javlja kod velikog broja različitih vrsta domaćih i divljih životinja, izuzev primata i ljudi. Svinje su jedina životinjska vrsta koja može preživeti infekciju virusom MA ali i vrsta kod koje postoji mogućnost nastanka subkliničke i latentne infekcije (Allepuz et al., 2009; Carr, 2006). Ishod infekcije i klinička slika kod svinja najviše zavise

od uzrasta (prasad na sisi, priplodne jedinke, tovljenici) ali i od virulencije virusa i imunološkog statusa životinja (Yoon et al., 2006). Sa ekonomskog aspekta, oboljenje nanosi velike ekonomske gubitke svinjarskoj industriji jer je mortalitet u kategoriji prasadi na sisi i do 100% u prve dve nedelje života (Yoon et al., 2007; Yuan et al., 2009).

Infekcija se dominantno širi direktnim kontaktom prijemčivih sa akutno ili latentno inficiranim jedinkama, zatim aerogenim prenošenjem virusa i indirektno, kontaminiranim ambijentom (Newby et al., 2002). Smatra se da uvođenje subklinički inficiranih svinja (kliconoša) u zapat, predstavlja glavni put širenja infekcije. Izlaganje organizma dejstvu stresnih faktora (transport, hvatanje, prašenje) može dovesti do reaktivacije latentne infekcije i izlučivanja virulentnog virusa (Allepuz et al., 2009; Yoon et al., 2007). Posledično, dolazi do oslobađanja virusnih partikula u spoljnu sredinu i prenošenja infekcije na neinficirane jedinke (Yoon et al., 2006; Yuan et al., 2009). Cilj rada je bio prikaz metoda koje se koriste u dijagnostici i diferencijalnoj dijagnostici Aujeskijske bolesti svinja.

MATERIJAL I METODE RADA

Materijal za ispitivanje je obuhvatao dve farme svinja, na kojima su registrovani zdravstveni problemi prasadi na sisi. U zavisnosti od specifičnosti ispitivanog slučaja i dostupnog materijala, primenjene su sledeće metode ispitivanja: epizootiološka i klinička ispitivanja, patomorfološki pregled, standardne laboratorijske metode za utvrđivanje prisustva aerobnih i anaerobnih bakterija, virusološko ispitivanje (izolacija virusa na kulturi ćelija PK-15), serum neutralizacioni test (SNT) za utvrđivanje titra specifičnih antitela protiv virusa MA i mikrobiološko ispitivanje uzoraka hrane u cilju ustanovljavanja prisustva plesni i mikotoksina (metoda tankoslojne hromatografije).

REZULTATI I DISKUSIJA

Na prvoj ispitivanoj farmi svinja, na kojoj je na osnovu kliničkog nalaza postavljena sumnja na pojavu MA, epizootiološkim ispitivanjem je utvrđeno da se priplodne jedinke (nerastovi i nazimice) kupuju iz različitih izvora, nepoznatog zdravstvenog statusa u pogledu MA. Isto tako, značajan je podatak da se na farmi svinja ne obavlja imunoprofilaksa protiv MA. Kliničkim pregledom utvrđeno je da se poremećaj zdravstvenog statusa javlja dominantno kod prasadi na sisi. U toj kategoriji ustanovljeni su znaci poremećaja funkcije centralnog nervnog sistema (CNS): veslanje nogama, opistotonus, pleurotonus, tortikolis, konvulzije i epileptiformni napadi. Osim toga, utvrđena je i po-

java proliva žute boje, otežano ustajanje, ležanje na boku ili zauzimanje psećeg položaja pri sedenju. U pojedinim slučajevim oboljenje je zahvatilo celo leglo sa znacima teške apatije, pri čemu su prasadi bila nakostrešena, sa pojavom pene na ustima i nisu se oglašavala prilikom hvatanja (afonija). U toku prvih pet dana po pojavi kliničkih znakova oboljenja na ispitivanoj farmi je od ukupno 730 prasadi na sisi, uginulo 220 komada. Anamnestičkim ispitivanjem je ustanovljeno da je kod krmača-majki naglo opala konzumacija hrane, krmača su izgledale pospane, sporadično se javljalo i povraćanje. Takođe, smanjena konzumacija hrane je zapažena kod nazimica i tovljenika. Kod nerastova i zalučene prasadi nije utvrđen poremećaj zdravstvenog statusa.

Patomorfološkim pregledom uginule prasadi na sisi (25 komada) dominantno su ustanovljene promene na tonzilama (difteroidno-nekrotični tonzilitis), blago uvećani, kongestionirani i u pojedinim slučajevima hemoragični limfni čvorovi. Pregledom organa trbušne duplje u najvećem broju slučajeva ustanovljeno je prisustvo fokalne nekroze na jetri i slezini (sivo beličaste pege veličine vrha čiode i glavice čiode, difuznog rasporeda) i pareza mokraćne bešike (mokraćna bešika prepunjena, veličine kajsije do manje jabuke, bez promena na sluzokoži). Sporadično su ustanovljena i tačkasta (petehijalna) krvarenja na kori bubrega ispod bubrežne kapsule, dok je na poprečnom preseku bubrega utvrđena samo kongestija tkiva. Na plućnom tkivu nalaz je karakterisao intesticijalni otok, kongestija, kod pojedinih jedinki i hepatizacija pluća. Nakon otvaranja lobanje, na moždanim ovojnicama i mozgu ustanovljena su krvarenja. Dijagnostički postupak u laboratoriji je obuhvatao izolaciju virusa na kulturi ćelija i diferencijalno dijagnostički bakteriološki pregled organa uginule prasadi. Bakteriološkim pregledom organa uginule prasadi izolovani su sledeći mikroorganizmi: *Escherichia coli*, *Escherichia coli haemolytica*, *Streptococcus alfa hemolyticus*, *Streptococcus beta hemolyticus* i *Clostridium perfringens*. Laboratorijskim pregledom organa i tkiva uginule prasadi (moždano tkivo, slezina, tonzile) izolovan je virus MA na kulturi ćelija PK-15. Kontrolom imunološkog statusa priplodnih jedinki na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa MA (SNT), ustanovljen je visok titar specifičnih antitela kod velikog broja priplodnih grla: od 150 ispitanih jedinki, kod 62 je ustanovljen titar antitela 1: 128 i 1: 256, što ukazuje na prisustvo infekcije virusom MA.

Infekcija virusom MA kod prasadi na sisi dovodi do masovnog oboljenja sa pojavom nervnih simptoma i visokim morbiditetom i mortalitetom. Klinički znaci poremećaja CNS-a su posledica razvoja negnojnog meningoencefalitisa (Newby et al., 2002). Klinički simptomi oboljenja koji se smatraju kao tipični za MA prasadi na sisi su: nezainteresovanost prasadi za sisanje, febra, drhtanje, obimna salivacija, gubitak koordinacije, ataksija i epileptiformni napadi. Inficirana prasadi sede u psećem sedećem položaju, ili leže iscrpljena i

veslaju nogama ili hodaju u krug. Patomorfološke promene koje ukazuju na infekciju virusom MA su: fokalne nekroze na jetri, krvarenja na moždanim ovojnicama, otok moždanog tkiva, krvarenja po plućima i limfnim čvorovima (Yuan et al., 2009). Stepenn mortaliteta može biti 90-100% kod prasadi uzrasta ispod 10 dana, 70% kod prasadi uzrasta 10-20 dana i 10% kod jedinki uzrasta 20-50 dana. Nakon 60 dana života, mortalitet je znatno niži (Carr, 2006). Kod starijih kategorija (nazimad, svinje u tovu), infekcija može da protiče asimptomatski ili se javljaju anoreksija i respiratorni poremećaji, ponekad i nervni simptomi u vidu nekoordinisanog kretanja. Mortalitet u ovoj kategoriji svinja nije visok, ali obolele životinje zaostaju u porastu i podložne su sekundarnim bakterijskim infekcijama (Martinez-López et al., 2009). Kada se virus MA prvi put unese u zapat, pored visokog mortaliteta prasadi na sisi, ustanovljava se i slabije napredovanje priplodnih jedinki, abortusi i prašenje mumificirane prasadi. Oboljenje obično prelazi u hroničan tok, životinje kijaju i kašlju, imaju oslabljeni apetit i komplikovane pneumonije (sekundarne infekcije) (Carr, 2006). Gubitak produktivnosti na farmi je izrazito visok. Kod suprasnih nazimica i krmača virus može dovesti do uginuća i resorpcije plodova, abortusa (do 15%), mumifikacije fetusa i rađanja mrtve ili slabovitalne prasadi (Newby et al., 2002).

Ukoliko se primeni samo mera vakcinacije, eradikacija oboljenja neće biti uspešna upravo zbog problema postojanja latentne infekcije i kliconoštva. Vakcinisane jedinke ne pokazuju kliničke znake oboljenja, ali u kontaktu sa terenskim virusom, mogu postati kliconoše. Ukoliko kod ovih životinja nastupi izlučivanje virusa, sve neimune jedinke u zapatu će se inficirati (Carr, 2006). Endemska infekcija je glavni problem u suzbijanju i eradikaciji MA i najvažniji zadatak je eliminacija latentno inficiranih jedinki (Carr, 2006; Newby et al., 2002). Ispitivanjem prisustva specifičnih antitela protiv virusa MA kod nevakcinisanih svinja na području Vojvodine, utvrđeno je da je populacija svinja enzooski inficirana virusom MA. Prisustvo specifičnih antitela protiv virusa MA je ustanovljeno kod 32,7% nevakcinisanih svinja u individualnim gazdinstvima i kod 19,3% jedinki iz farmškog uzgoja (Pušić et al., 2009).

Smatra se da je rizik od unošenja MA kupovinom priplodnih svinja do 14 puta veći kada se primenjuje samo mera karantina u odnosu na istovremeno serološko ispitivanje. Nabavka životinja je značajan izvor infekcije, pri čemu je naročito visok stepenn rizika povezan sa remontom nazimica (Martinez-López et al., 2009). Kompanije ili centri za veštačko osemenjavanje koje se bave proizvodnjom priplodnog materijala, u obavezi su da priplodne zapate održavaju slobodnim od MA (Carr, 2006; Newby et al., 2002).

U drugom ispitivanom slučaju prisustvo mikotoksina u hrani dovedeno je u vezu sa pojavom MA na farmi svinja. Anamnestički je utvrđen poremećaj

zdravstvenog statusa krmača i njihove prasadi. Epizootiološki je ustanovljeno da je farma pre 2 meseca kupila 50 krmača za koje je serološkim pregledom (SNT) kod 6 jedinki utvrđeno prisustvo specifičnih antitela protiv MA. Međutim, iako je ustanovljen titar specifičnih antitela, ostao je nepoznat uzrok ovakvog imunološkog statusa odnosno da li radi o postvakcinalnom ili infektivnom titru. Epizootiološki bitan podatak je da je ispitivana farma svinja još pre osam godina prekinula sa merama imunoprofilakse protiv MA. Kliničkim pregledom je kod krmača konstatovana inapetencija, blaga apatija i agalaksija. Kod prasadi na sisi klinički su ustanovljene jedinice sa izraženim simptomima poremećaja funkcije centralnog nervnog sistema (iskolačene oči, pena na ustima, padanje na stranu, veslanje nogama, ležanje po strani, tremor, pareza i paraliza), povišena telesna temperatura (40,4-41°C) apatija, skupljanje prasadi u gomile. Nervni simptomi su se intenzivirali spoljnim nadražajem (dodirom, hvatanjem). U pojedinim slučajevima celo leglo je uginulo u periodu od 2 dana. Terapija primenjena u lečenju obolele prasadi i krmača nije dala očekivane rezultate. Kliničkim pregledom svinja u tovu utvrđeno je da svinje nisu konzumirale hranu od prethodnog dana, apatija, ležanje. Patomorfološkim pregledom uginule prasadi na sisi (15 komada) ustanovljene su promene karakteristične za infekciju virusom MA: fokalne nekroze mase jetri, tačkasta krvarenja po kori bubrega i difteroidno-nekrotični tonzilitis. Mikrobiološkim pregledom hrane za krmače dojare ustanovljeno je prisustvo plesni (*Fusarium sp.*, *Mucor*) i aflatoksin (AF 0,02 mg/kg). Virusološkim ispitivanjem iz uzoraka organa uginule prasadi na prijemčivim kulturama ćelija (PK-15) izolovan je virus Aujeskiyeve bolesti.

Supresija imunološke funkcije prouzrokovana mikotoksinima može imati za posledicu pored umanjivanja otpornosti organizma na infektivna oboljenja, i reaktivaciju hroničnih infekcija i umanjivanje efikasnosti terapijskih tretmana i imunoprofilakse (Oswald et al., 2005; Prodanov et al., 2011). Upravo u drugom ispitivanom slučaju, mikotoksini (AF) u hrani se mogu dovesti u vezu sa reaktivacijom hronične (latentne) infekcije krmača. Ustanovljeno je da AF umanjuju otpornost organizma na bakterijske, fungalne, virusne i parazitske bolesti svinja. Posledično, vakcinacija protiv infektivnih oboljenja može biti manje efikasna kod jedinki koje su eksponirane mikotoksinima. Čak i kada je prisutan u malim koncentracijama AF utiče na imunološki odgovor, što može biti faktor predispozicije za pojavu infektivnih oboljenja svinja (Taranu et al., 2005; Prodanov et al., 2011).

U državama gde se MA javlja endemski, kontrola oboljenja se bazira na intenzivnoj vakcinaciji svinja. Međutim, postojeće atenuisane vakcine ne prevenciraju u potpunosti uspostavljanje latentne infekcije virusom MA (Pušić et al., 2009; Yoon et al., 2006). Važan cilj vakcinacije je postizanje uniformnog nivoa

zaštite u populaciji. Na priplodnim farmama prisutne su dve populacije, krmače i prasadi, sa različitim imunološkom dinamikom. Cilj programa vakcinacije nije samo postizanje zadovoljavajuće imunizacije krmača već i postizanje uniformnog nivoa zaštite prasadi tokom prvih nedelja života (Casal et al., 2004).

ZAKLJUČAK

Pojava Aujeskijske bolesti na farmi svinja koja ne obavlja imunoprofilaksu i nabavlja priplodni materijal iz izvora nepoznatog zdravstvenog statusa može naneti velike štete, kako direktne usled uginuća prasadi, pobačaja, rađanja avitalne, mumificirane prasadi tako i indirektne, zbog zaostajanja u rastu tovljenika i velikih troškova kontrole oboljenja. Dijagnostika MA je kompleksna i zahteva sveobuhvatni pristup, zbog pojave subkliničkih formi i latentne infekcije svinja.

Odmah nakon kliničke, patomorfološke i laboratorijske dijagnostike oboljenja, na ispitivanim farmama koje ne vrše vakcinaciju protiv MA, preduzete su hitne mere imunoprofilakse (vakcinacija primenom atenuisane vakcine). Pored vakcinacije koja predstavlja uspešnu meru za sprečavanje širenja infekcije i pojave kliničke forme bolesti kod svinja, neophodna je stroga kontrola prometa i poznavanje zdravstvenog statusa zapata iz kojih se obavlja kupovina priplodnih životinja.

LITERATURA

1. Allepuz A., Seaz M., Solymosi N., Napp S., Casal J.: The role of spatial factors in the success of an Aujeszky's disease eradication programme in a high pig density area (Northeast Spain, 2003-2007). *Preventive Veterinary Medicine* 91, 153-160, 2009.
2. Carr J.: Aujeszky's disease (Pseudorabies). In: Whittemore's Science and Practice of Pig Production, In: Ilias Kyriazakis and Colin T. Whittemore, Third Edition, Blackwell Publishing, Chapter 7, *The Maintenance of Health*, 311-312, 2009.
3. Casal L., Planasdemunt LL., Varo J. A., Martin M.: The Use of Different Vaccination Schedules for Sows to Protect Piglets against Aujeszky's Disease. *J Vet Med*, B 51, 8-11, 2004.
4. Martinez-López B., Carpenter T. E., Sánchez-Vizcaino J. M.: Risk assessment and cost-effectiveness analysis of Aujeszky's disease virus introduction through breeding and fattening pig movements into Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 90, 10-16, 2009

5. Newby T. J., Carter D. P., Yoon K.-J., Jackwood M. W. and Hawkinse P. A.: Assessment of Replication and Virulence of Attenuated Pseudorabies virus in Swine. *J Vet Sci* 3(2), 61-66, 2002.
6. Oswald IP, Marin DE, Bouhet S, Pinton P, Taranu I and Accensi F: Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Additives & Contaminants*, 22, 4, 354-360, 2005.
7. Prodanov-Radulović Jasna, Došen R., Stojanov I., Pušić I., Živkov-Baloš Milica, Ratajac R.: Interaction between the mycotoxins and causative agents of swine infective diseases. *Proc Nat Sci Matica Srpska* 120, 251-259, 2011.
8. Pušić I., Đuričić B., Došen R., Prodanov J., Petrović T., Bursać V., Urošević M.: Evaluation of the presence of specific antibodies against Morbus Aujeszky virus in unvaccinated swine in Vojvodina province. *Biothechnology in Animal Husbandry*, 25, 5-6, 887-893, 2009.
9. Taranu I, Marin D.E., Bouhet S., Pascale F., Bailly J.D, Miller J.D., Pinton P, Oswald IP: Mycotoxin Fumonisin B₁ Alters the Cytokine Profile and Decreases the Vaccinal Antibody Titer in Pigs. *Toxilogical Sciences*, 84, 301-307, 2005.
10. Yoon H.A., Eo S.K., Aleyas A. G., Cha S.Y., Lee J.H., Chae J.S., Jang H.K., Cho J.G., Song H.J.: Investigation of Pseudorabies Virus Latency in Nervous Tissues of Seropositive Pigs Exposed to Field Strain. *J Vet Med Sci*, 68, 2, 143-148, 2006.
11. Yoon H.A., Aleyas A. G., George J. A., Park S. O., Han Y. W., Hyun B. H., Lee J. H., Song H. J., Cho J. G., Eo S. K.: Correlation between the nature of immunity induced by different immunogens and the establishment of latent infection by wild-type pseudorabies virus. *Research in Veterinary Science*, 83, 73-81, 2007.
12. Yuan J. F., Zhang S. J., Jafer O., Furlong R. A., Chausiaux O. E., Sargent C.A., Zhang G. H. and Affara N. A.: Global transcriptional response of pig brain and lung to natural infection by Pseudorabies virus. *BMC Microbiology*, 9, 246, 2009.

Primljeno: 25.07.2011.

Odobreno: 20.09.2011.

PRIMENA DVOSTRUKO ZAŠTIĆENIH BRISEVA U DIJAGNOSTICI BAKTERIJSKIH INFEKCIJA MATERICE KOBILA

Miroslav Urošević¹, Dragica Stojanović², Ivan Pušić²,
Jasna Prodanov-Radulović², Vladan Đermanović³

¹Poljoprivredna škola sa domom učenika, Futog

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

³Poljoprivredni fakultet, Beograd, Zemun

Kratak sadržaj

Na osnovu brojnih istraživanja utvrđeno je da su infekcije materice kobila značajan uzrok ekonomskih gubitaka u konjarstvu. Redovan pregled polnih organa kod priplodnih grla u našoj zemlji se retko sprovodi, što je, inače, uobičajena praksa u zemljama sa razvijenim konjarstvom, a često i obaveza. U radu je opisan značaj i tehnika upotrebe dvostruko zaštićenih briseva u dijagnostici bakterijskih infekcija materice kobila u cilju poboljšanja njihove plodnosti.

Ključne reči: kobila, materica, bakterije, bris

APPLICATION OF DOUBLE PROTECTED SWABS IN DIAGNOSTICS OF BACTERIAL INFECTIONS THE MARE'S UTERUS

Miroslav Urošević¹, Dragica Stojanović², Ivan Pušić²,
Jasna Prodanov-Radulović², Vladan Đermanović³

¹Agricultural School with Students' Dormitory, Futog

²Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad

³Faculty of Agriculture, Belgrade, Zemun

Summary

Numerous studies have shown that a mare can develop a uterine infection that causes significant economic losses in horse breeding. Assessment of the reproductive system in breeding animals in our country has been

¹ E-mail: uros_vet@yahoo.de

rarely carried out, however this is a common or compulsory practice in countries that have developed horse breeding. This paper describes the importance and different techniques for the use of double protected swabs in the diagnostics of bacterial infection of the mare uterus in order to improve their fertility.

Key words: mare, the uterus, bacteria, swabs

UVOD

Poremećaji plodnosti kobilu

Konji imaju najmanju plodnost u odnosu na druge domaće životinje, iz razloga što je ova osobina vekovima zapostavljana u odnosu na njihovu upotrebu u radu, ratu i sportu (Caudle, 1997). Etiološki slabiju plodnost kobilu može da izazove čitav niz faktora, kao što su dug estrus, greške u pripustu i razna patomorfološka stanja polnih organa: afunkcija jajnika, tihi estrus, ovarijalne ciste, endometritisi, težak rad, starost, slaba i deficitarna ishrana, parazitoze, greške u držanju, nedovoljna higijena i dr.

ULOGA BAKTERIJSKIH INFEKCIJA U POREMEĆAJIMA REPRODUKCIJE

Poznato je da su infekcije materice kobilu značajan uzrok ekonomskih gubitaka u konjarstvu (Caudle, 1997). Nažalost, širenju zaraznih bolesti konja bakterijske etiologije na izvestan način doprinose i vlasnici, odnosno, držaoci konja. Zbog nedovoljne i neadekvatne primene veterinarskih mera nemaju uvid u reproduktivnu patologiju u svojim zaptima. To se odnosi na klinička i laboratorijska ispitivanja (serološka, mikrobiološka, molekularno-biološka). Redovan pregled polnih organa kod priplodnih grla u našoj zemlji se retko sprovodi, što je inače uobičajena praksa u zemljama sa razvijenim konjarstvom (Urošević i sar., 2008).

Infekcije materice u polno zrelih kobilu već godinama predstavljaju izazov za veterinare kliničare i naučne radnike, posebno kod kompleksnih kliničkih slučajeva kada je neophodno razjasniti uzroke infekcije i patogenezu, kako bi se sprovedla efikasna terapija (Traub-Dargatz i sar., 1991). Bakterijske infekcije materice dovode do najvećih gubitaka u konjarstvu, prvenstveno kod priplodnih grla, jer se javlja kod 25-60% jalovih kobilu. Među prvim koji su posvetili pažnju istraživanjima bakterijske etiologije u kliničkoj patologiji konja bio je Bain (1963) u državi Novi Južni Vels u Australiji. Utvrdio je da bakterije iz roda *Streptococcus* tada klasifikovane kao Lancefield grupa C (beta hemolitičke streptokoke) spadaju u najvažnije uzročnike reproduktivnih i neonatalnih poremećaja konja na ergelama. Takođe, Hughes i Loy (1969) su ustanovili da

bakterijske infekcije genitalnog trakta spadaju u najčešće uzroke steriliteta u kobilu. Najčešće identifikovan uzročnik u brisevima endometrijuma kod kobilu sa endometritisom je *Streptococcus equi* subsp. *zooepidermicus*.

Na osnovu istraživanja Wittenbrink i sar. (1997) u genitalnoj mikroflori je ukupno dijagnostikovano 19 vrsta gramnegativnih i 12 grampozitivnih bakterija. Međutim, nisu svi izolati patogeni i virulentni kao, naprimer, *S. zooepidemicus*, *Taylorella equigenitalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i dr.

U istraživanjima drugih autora iz materica kobilu sa endometritisom izolovani su sledeći mikroorganizmi: *S. zooepidemicus* i *E. coli*, više striktno patogenih sojeva *K. pneumoniae*, posebno sa kapsulom tip 1, 2, 5 i *P. aeruginosa* (Shin i sar., 1979). I novije istraživanje od strane Aurich-a (2005) potvrđuje da poseban značaj imaju genitalne infekcije kobilu uzrokovane sa: *S. zooepidemicus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *T. equigenitalis*. Prema istraživanju Ozgur-a i sar. (2001), najčešće izolovane bakterije kod kobilu sa oboljenjima materice su *S. zooepidermicus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus spp.*, *Pasteurella spp.* i *T. equigenitalis*.

PATOGENEZA INFEKCIJA MATERICE KOBILA

Infekcije materice u najvećem broju slučajeva zahvataju endometrijum, izazivajući endometritis. Samo u izuzetnim slučajevima, patološki proces obuhvata i dublje slojeve tkiva materice kao što je, na primer, miometrijum, kada nastaje metritis. Ako se to desi infekcija se brzo širi na dublje slojeve tkiva, tako da se može razviti perimetritis, peritonitis, ali i septikemija. U slučaju endometritisa, zapaljenskim procesom većinom su zahvaćeni cerviks i vagina. Dalje širenje procesa na jajovode uglavnom sprečavaju uterotubarne veze.

Patogene bakterije imaju sposobnost adhezije, tj. prilepljivanja na površinu ćelija endometrijuma pomoću sitnih treplji (fimbrije), vezivanjem za protein fibronektin iz sekreta endometrijuma ili se inkapsulišu i na taj način se brane od fagocitoze, dejstva antiseptika i antibiotika. Uz to, mnoge patogene bakterije izlučuju egzotoksine kao što su: alfa i beta hemolizini koji oštećuju ćelije endometrijuma i izazivaju zapaljenje (Wittenbrink i sar., 1997).

Da li će doći ili neće doći do infekcije zavisi od efikasnosti lokalnih mehanizama materice (opšte anatomsko-fiziološke karakteristike genitalnih organa, humoralni imunitet). Prema istraživanju LeBlanc (1997), bakterija *E. coli* je češće izolovana kod kobilu sa anatomskim defektima regiona perineuma i vulve, što predstavlja predispoziciju za pojavu pneumovagine i fekalnu kontaminaciju genitalnih organa.

Kod nekih kobilu dolazi do naseljavanja bakterija i razvija se infekcija materice, pri čemu izvori kontaminacije materice mogu biti koitus, partus ali i pregled genitalnih organa. Takve kobile postaju perzistentno inficirane i nazi-

vaju se „predisponirane kobile”, a mogu imati i anatomske defekte kao što su pneumovagina, povrede od ždrebljenja, što sve predstavlja predispoziciju za endometritis (Caudle AB., 1997).

KLINIČKA SLIKA ENDOMETRITISA

Akutni endometritis se karakteriše eksudativnim zapaljenskim procesom. Eksudat može da bude u obliku seroznog ili gnojnog iscedka, ali vaginalni iscedak se zapaža samo u srednje do teškim slučajevima endometritisa. Iscedak može dovesti do slepljivanja dlake na repu i okolnoj regiji. Pri ginekološkom pregledu često se zapaža zacrvenjenost sluzokože cerviksa, a ponekad se u području cerviksa ili na dnu može zapaziti gnojni sekret.

Kliničke karakteristike ispoljavaju se u vidu: izrazito crvene i vlažne sluzokože u prednjem delu vagine, sa manjim ili većim količinama patološkog sekreta, zavisno od stepena i karaktera endometrita. Cerviks je mlitav, vlažan i upaljen i iz njega ponekad ističe mukopurulentan sekret, koji se nakuplja u ventralnom delu forniksa vagine. Međutim, problem predstavljaju subklinički endometritisi bakterijske etiologije, kada nema navedenih simptoma kod kobilica.

DIJAGNOSTIKA ENDOMETRITISA

Dijagnostika oboljenja materice i kontrola plodnosti obuhvataju klinička (ultrazvučna), bakteriološka, citološka i patohistološka ispitivanja.

Uzorci genitalnih briseva za mikrobiološka ispitivanja uzimaju se sa klistorisa, materičnog grlića ili materice u cilju otkrivanja mikroorganizama koji uzrokuju neplodnost. Ovde bi posebno izdvojili bakteriološka ispitivanja.

O značaju bakteriološkog pregleda materice najbolje govori primer iz SAD-a. Prema pravilniku udruženja uzgajivača punokrvnih engleskih konja u centralnom delu države Kentaki (Kentucky, SAD) sve juvenilne kobile i omice, pre prvog pripusta, moraju imati negativan bakteriološki nalaz materice. Dovoljava se oplodnja samo kobilica koje imaju sertifikat ovlašćene laboratorije o negativnom bakteriološkom nalazu (Riddle i sar., 2005).

UPOTREBA DVOSTRUKO ZAŠTIĆENIH BRISEVA U DIJAGNOSTICI

Po izveštajima više autora, uzimanje uzoraka sa sluznice materice radi bakterioloških ispitivanja najbolje je uraditi specijalnim, dvostruko zaštićenim brisevima, kojima se sprečava moguća kontaminacija prilikom prolaskom

kroz polne organe (Slika 1). Ovi plastični kateteri za jednokratnu upotrebu se sastoje iz brisa na štapu oko kojeg je unutrašnji plastični omotač, a oko njega i spoljni omotač, odnosno futrola, što je i prikazano na Slici 2.

Dobrim rešenjem su se pokazali kateteri-brisevi kompanije „Minitube GmbH“, Tiefenbach, Nemačka (Urošević i sar., 2010).

Da bi omogućili uzimanje uzoraka sa zida materice, prethodno se perineum kobila opere i rep bandažira. Zatim se kateter izvuče iz najlonskog omotača, odnosno ambalaže, i pomoću sterilnog spekulum ili prstima uvodi kroz materični grlić u unutrašnjost materice. Pritiskom drške katetera spolja, bris se otkriva, odnosno izvuče iz spoljašnjeg omotača nakon prolaska kroz cerviks u unutrašnjost materice, kako bi se onemogućila kontaminacija uzorka mikroflorom vagine. Bris se razmaže po zidu materice kružnim pokretima drške katetera, vraća u spoljnu futrolu (omotač) i vadi iz polnih organa kobile. Zatim se izvlači i iz unutrašnje futrole (omotača), lomi na predviđenom mestu (10 cm dužine brisa) i stavlja u transportni medijum u epruveti, najčešće tioglikolatna hranljiva podloga. Na tržištu se mogu nabaviti komercijalne hranljive podloge u epruvetama za transport uzoraka briseva kompanije „BECTON DICKINSON“ (New Jersey, SAD). Nakon kolekcije, bris se pregleda zasejavanjem u laboratoriji prema rutinskim bakteriološkim metodama.

Više autora je potvrdilo važnost korišćenja dvostruko-zaštićenih briseva u dijagnostici bakterijskih infekcija materice kobila.

U istraživanju Ulgen i sar. (2003) u Turskoj višekratno su uzimani uzorci sa materice kobila za mikrobiološka ispitivanja. Za uzorkovanje za zida materice su korišćeni dvostruko zaštićeni brisevi, a uzorci su dopremani do laboratorije u Amies transportnoj podlozi ili Stuart hranljivoj podlozi. U retrospektivnoj studiji u Švedskoj (Albihn i sar., 2003) urađeno je mikrobiološko ispitivanje materice kod 239 kobila sa reproduktivnim poremećajima. Uzorci iz materice uzeti su sa dvostruko zaštićenim brisevima i transportovani do bakteriološke laboratorije na dalju obradu. Mikrobiološkim pregledom 152 uzorka, izolovana je najmanje jedna bakterija. Najčešće identifikovane kulture bile su *E. coli* (104 izolata), beta hemolitičke streptokoke (31) i gljivice (16).

U rezultatima bakteriološkog pregleda materice kobila u Iranu od strane Ghasemzadeh i sar. (2004), kao najčešće izolovani patogeni mikroorganizam ustanovljena je *E. coli*.

U novijem istraživanju perzistentnog endometritisa autori Nash i sar. (2008), takođe navode da su nakon pripusta najčešće izolovani iz materice *S. zooepidemicus* i *E. coli*. Uzorkovanje je obavljeno pomoću dvostruko zaštićenih briseva za matericu i zasejavanjem na osnovu standardnih mikrobioloških metoda.

LITERATURA

1. Albihn A., V. Baverud and U. Magnusson: Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Vet Scand*, 44, 121–9, 2003.
2. Aurich Ch.: *Reproduktionsmedizin beim Pferd. Gynäkologie – Andrologie – Geburtshilfe*. Stuttgart: Parey Verlag, 2005.
3. Bain A.M.: Common bacterial infections of foetuses and foals' and association of the infection with the dam. *Aust Vet J*, 39, 413-22, 1963.
4. Caudle A.B.: Bacterial causes of infertility and abortion. In: R.S. Youngquist (ed.): *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, W.B. Saunders Co., USA, 1997, 179–85.
5. Hughes J.P. and Loy R.G.: Investigations on the effect of intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. In: *Proc. 15th Ann. Conv. Am. Assoc. Equine Pract.*, 1969, 285-9.
6. LeBlanc M.M.: The equine endometrium and the pathophysiology of endometritis. In: *Proc. Reprod. Pathol.*, 78-84, 1997.
7. Nash D, Lane E, Herath S, Sheldon IM. Endometrial explant culture for characterizing equine endometritis. *Am J Reprod Immunol*, 59, 105-17, 2008.
8. Ozgur Y., Ikiz S., Carioglu B., Kilicarslan R., Yilmaz H., Akay O., Ilgaz A.: Contagious equine metritis in Turkey: first isolation of *Taylorella equigenitalis* from mares. *Vet. Rec.*, 28, 120-22, 2001.
9. Riddle W.T., LeBlanc M.M., Pierce S.W., Stromberg A.T.: Relationships between Pregnancy Rates, Uterine Cytology, and Culture Results in a Thoroughbred Practice in Central Kentucky. In: *Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 2005, 51-4,
10. Shin S.J., Lein D.H., Anderson A.L., Nusbaum S.R.: The bacteriological culture of equine uterine contents in vitro sensitivity of organism isolated and interpretation. *J Reprod Fert Suppl*, 27, 307-15, 1979.
11. Traub-Dargatz J.L., Salman M.D., Voss J.L.: Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *J Am Vet Res*, 198, 1745–7, 1991.
12. Ulgen M., Seyrek-Intas K., Misirliogly D., Seyrek-Intas D., Kocabiyyik A.L., Sevimli A.: Importance of reproductive management on fertility of Mares in Turkey. *Revue Med Vet*, 154, 5, 345-50, 2003.
13. Urošević M., Lako B., Milovanović A., Milanov D., Stojanović D., Miličić Ž.: Ispitivanje utjecaja različitih faktora na poremećaje reprodukcije kobila u Vojvodini. U: *Zbornik radova*, 2. Hrvatski simpozij o lipicanskoj pasmini – sa međunarodnim sudelovanjem, Đakovo, 2008, 138-45.

14. Urosevic M., Lako B., Milanov D., Urosevic I., Aurich C.: Results of bacteriological and cytological examinations of the endometrium of subfertile mares in stud farms in Serbia. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 123, 9/10, 10-13, 2010.
15. Wittenbrink M.M., Hölzle L., Meister A.K.: Mechanisms of bacterial Pathogenesis in Equine. *Pferdeheilkunde*, 13, 450-2, 1997.

Prilog 1.



Slika 1. Prikaz dvostruko zaštićenog katetera briseva za uvođenje u polne organe kobile („Minitube GmbH“, Tiefenbach, Nemačka)

Prilog 2:



Slika 2. Spoljni omotač katetera i izvađen kateter u unutrašnjem omotaču sa brisom („Minitube GmbH“, Tiefenbach, Nemačka)

Primljeno: 25.08.2011.
Odobreno: 20.09.2011.

STRUKTURA DOKUMENTACIJE ZA REGISTRACIJU LEKA KOJI SE KORISTI U VETERINARSKOJ MEDICINI I NAJČEŠĆE GREŠKE U NJOJ

Gordana Žugić*, Aleksandra Labudović

Agencija za lekove i medicinska sredstva Republike Srbije, Beograd

Kratki sadržaj

Sa regulatornog aspekta, farmaceutsko-hemijsko-biološka dokumentacija predstavlja potvrdu kvaliteta u svakom segmentu premarketinškog života predloženog leka. Kvalitet gotovog proizvoda dokumentuje se, obrazlaže i potvrđuje u okviru farmaceutsko-hemijsko-biološke dokumentacije u procesu dobijanja dozvole za stavljanje u promet veterinarskih lekova na teritoriji Republike Srbije. U radu autori navode kratak pregled strukture dokumentacije neophodne za registraciju leka koji se koristi u veterinarskoj medicini i najčešće greške koje nastaju prilikom njenog sastavljanja. Regulatorna iz oblasti lekova predstavlja polje kontinuiranog usavršavanja, s obzirom na permanentan razvoj i unapređivanje znanja i opreme koja se koristi u farmaceutskoj industriji. U tom smislu, postavljanje i implementacija regulatornih zahteva stoje u tesnoj povezanosti na putu ka bržem plasiranju kvalitetnih, bezbednih i efikasnih lekova na tržište.

Ključne reči: veterinarski lek, dokumentacija, greške

STRUCTURE OF DOCUMENTS FOR REGISTRATION OF DRUGS USED IN VETERINARY MEDICINE AND COMMON ERRORS

Gordana Žugić*, Aleksandra Labudović

Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, Belgrade

Abstracts

From the regulatory point of view registration documentation is confirmation of quality of every part of pre-marketing production of veterinary medicine. Registration documentation also confirms the quality of given

* E mail: gordana.zugic@alims.gov.rs

veterinary medicine during marketing authorization in Serbia. In the article, the authors gave short overview of the documentation structure and indicate the most common errors which arise during its compiling.

Key words: veterinary medicine, documentation, errors

UVOD

Regulativa iz oblasti veterinarskih lekova je naučna disciplina koja predstavlja spoj znanja iz oblasti farmaceutske tehnologije, industrijske farmacije, analitike lekova i važećih zakonskih propisa naše zemlje kao i smernica Evropske agencije za lekove.

Kvalitet gotovog proizvoda dokumentuje se obrazlaže i potvrđuje u okviru farmaceutske-hemijsko-biološke dokumentacije u procesu dobijanja dozvole za stavljanje u promet veterinarskih lekova na teritoriji Republike Srbije.

Sa regulatornog aspekta, farmaceutske-hemijsko-biološka dokumentacija predstavlja potvrdu kvaliteta u svakom segmentu premarketinškog života predloženog leka.

STRUKTURA FARMACEUTSKO-HEMIJSKO-BIOLOŠKE DOKUMENTACIJE

Struktura farmaceutske-hemijsko-biološke-dokumentacije o leku koji se upotrebljava isključivo u veterinarskoj medicini propisana je članom 45. Pravilnika o postupku i uslovima za dobijanje dozvole za stavljanje leka u promet (*Službeni glasnik RS*, br. 93/2005.).

Farmaceutsko-hemijsko-biološka dokumentacija o veterinarskom leku treba da sadrži podatke navedene u Tabeli 1.

Sastav leka predstavlja sadržaj aktivnih supstanci i ekscipijenasa u jedinici doziranja.

Preporučljivo je tabelarno izražavanje podataka.

Tabelarni prikaz jedinične formule gotovog proizvoda treba da sadrži:

- aktivne supstance
- ekscipijense (boje, konzervansi, korigensi, itd)
- ulogu komponenata u formulaciji
- reference za aktivne supstance i ekscipijense

Najčešći nedostaci u priloženoj dokumentaciji:

- *neadekvatan način izražavanja sastava leka*
- *ne navodi se referenca za kvalitet aktivne supstance i ekscipijenasa.*

Deo dokumentacije koji se odnosi na pakovanje leka podrazumeva detaljan opis primarnog i sekundarnog pakovanja gotovog proizvoda.

Najčešći nedostaci u priloženoj dokumentaciji:

- *neadekvatan opis pakovanja gotovog proizvoda*
- *veličina pakovanja neodgovarajuća u odnosu na farmaceutski oblik (npr. ne-
uobičajeno veliki broj doza u pojedinačnom pakovanju).*

Registraciona dokumentacija treba da sadrži formulaciju leka korišćenu u okviru kliničkih ispitivanja.

Formulacija leka i planirani proizvodni proces zahtevaju primenu dobre proizvođačke prakse, primenu validiranih metoda za kontrolu gotovog proizvoda kako bi se osigurao kvalitet leka i usaglašenost sa zahtevima specifikacije gotovog proizvoda.

Registraciona dokumentacija treba da sadrži rezultate ispitivanja kompatibilnosti aktivne(ih) supstance(i) i ekscipijenas. U slučaju fiksne kombinacije aktivnih supstanci potrebno je priložiti rezultate ispitivanja njihove međusobne kompatibilnosti.

Granice prihvatljivosti za parametre koji mogu dovesti do promene u biološkoj raspoloživosti leka postavljaju se adekvatnom analizom serija gotovog proizvoda.

Registraciona dokumentacija treba da sadrži navedenu proizvodnu formulu za planiranu veličinu proizvodne serije.

Kvalitativni i kvantitativni sastav komponenata (aktivnih supstanci i pomoćnih komponenata) koje ulaze u proces proizvodnje potrebno je navesti, što podrazumeva i komponente koje nestaju tokom procesa proizvodnje (npr. rastvarači). Navode se supstance koje se koriste povremeno, u slučaju potrebe (npr. kiseline i baze za podešavanje pH vrednosti), kao i supstance koje se dodaju u višku.

Registraciona dokumentacija treba da sadrži detaljan opis procesa proizvodnje.

Potrebno je priložiti naziv i opis opreme koja se upotrebljava u toku procesa proizvodnje.

Opis procesa proizvodnje treba da sadrži:

- opis procesa proizvodnje i opreme,
- in-procesnu kontrolu i granice prihvatljivosti dobijene u toku validacije procesa,
- kontrola kvaliteta gotovog proizvoda po završetku procesa proizvodnje.

Ovakav opis procesa proizvodnje pokazuje verovatnoću da će svaka serija proizvedenog leka biti usklađena sa zahtevima specifikacije gotovog proizvoda.

Priložena dokumentacija treba da sadrži dijagram toka procesa proizvodnje, koji podrazumeva šematski prikazane sve korake proizvodnog procesa, uključujući jasno obeležene kritične tačke procesa.

Pojam "validacija" podrazumeva: sistemski dokumentovani program aktivnosti kojima se dokazuje, u skladu sa GMP principima, da neka procedura,

proces, oprema, metoda, materijal ili sistem na reproduktivan i dosledan način daju očekivane rezultate prema postavljenim kriterijumima prihvatljivosti.

Validacija procesa je dokumentovani dokaz kojim se u visokom stepenu osigurava da se nekim procesom stalno i dosledno dobija proizvod koji odgovara specifikaciji za kvalitet.

Validacione studije sprovode se da bi se identifikovale kritične tačke procesa proizvodnje.

Ukoliko se proces proizvodnje odvija na više proizvodnih mesta, potrebno je dostaviti validaciju procesa proizvodnje za svako navedeno mesto proizvodnje, sprovedenu na najmanje tri serije gotovog proizvoda. Potrebno je istaći da se validacija procesa proizvodnje sprovodi na najmanje 3 uzastopne proizvodne serije.

Najčešći nedostaci u priloženoj dokumentaciji:

- *u trenutku predaje dokumentacije nije dostavljena validacija procesa proizvodnje niti šema planiranog procesa validacije ili je dostavljena nepotpuna šema planiranog procesa validacije,*
- *dostavljena je nepotpuna validacija procesa proizvodnje.*
- Aktivne supstance su nosioci terapijskog dejstva gotovog proizvoda (leka).

Klasifikacija aktivnih supstanci na osnovu dužine postojanja na tržištu:

Nove aktivne supstance (prvi put upotrebljene u medicinskom proizvodu, za humanu primenu ili primenu na životinjama).

Postojeće aktivne supstance koje nisu opisane u Evropskoj farmakopeji (PhEur) ili u nacionalnoj farmakopeji države članice EU

Aktivne supstance opisane u Evropskoj farmakopeji (PhEur) ili u nacionalnoj farmakopeji države članice EU.

Kvalitet aktivne supstance korišćene u izradi gotovog proizvoda opravdava se prilaganjem:

Sertifikata o usklađenosti sa zahtevima Evropske farmakopeje

ASMF (Active Substance Master File) procedure

MA (Master Application) procedure

Najčešći nedostaci u priloženoj dokumentaciji:

- *nije priložen sertifikat analize za aktivnu supstancu izdat od strane proizvođača gotovog proizvoda*
- *kvalitet aktivne supstance nije u skladu sa kvalitetom propisanim u monografiji Evropske farmakopeje*

Registraciona dokumentacija treba da sadrži sertifikate analiza za ekscipijense koji ulaze u sastav gotovog proizvoda.

Registraciona dokumentacija treba da sadrži podatke o kvalitetu pakovnog materijala upotrebljenog kao primarni i/ili sekundarni kontejner.

Kvalitet pakovnog materijala opravdava se prilaganjem:

- specifikacije pakovnog materijala
- sertifikata analize za pakovni materijal
- specifikacije i sertifikata analize za priloženi dozator.

Najčešći nedostaci u priloženoj dokumentaciji:

- *nisu priloženi sertifikati analize za pakovni materijal.*

Podnosilac zahteva dužan je da u okviru registracionog dosijea dostavi izjavu da se u toku procesa proizvodnje aktivne supstance, ekscipijenas a i gotovog proizvoda ne koriste supstance životinjskog porekla, ili pak da dostavi sertifikat analize da eventualno korišćeni materijal vodi poreklo od zdravih životinja.

TSE/BSE sertifikat se prilaže u cilju prevencije prenošenja transmisione spongiformne encefalopatije.

Cilj prilaganja registracione dokumentacije u postupku izdavanja dozvole za stavljanje leka u promet je da potvrdi kvalitet proizvoda.

Registracionom dokumentacijom definišu se specifikacije, kvalitativne i kvantitativne karakteristike, opisuju se metode kontrole gotovog proizvoda, postavljaju limiti odstupanja parametara u predloženom roku upotrebe.

Specifikacija gotovog proizvoda prilikom puštanja serije leka u promet (*re-release* specifikacija) predstavlja trenutni status leka u pogledu kvaliteta i treba da sadrži prikaz sledećih parametara:

- izgled gotovog proizvoda (uopštene karakteristike farmaceutskog oblika, boja, miris, veličina čestica sa specificiranim granicama prihvatljivosti)
- identifikacija aktivne(ih) supstance(i)
- sadržaj aktivne(ih) supstance(i)
- identifikacija i određivanje sadržaja ekscipijen(a)sa:
- konzervansi (navode se granice prihvatljivosti)
- antioksidansi (navode se granice prihvatljivosti)
- identifikacija boja (ukoliko ulaze u sastav proizvoda)
- sadržaj nečistoća
- sadržaj rezidualnih rastvarača (ukoliko postoje)
- mikrobiološka kontaminacija
- farmaceutski testovi (npr. brzina oslobađanja lekovite supstance iz lekovitog oblika)

Najčešći nedostaci u priloženoj dokumentaciji:

- *specifikacija gotovog proizvoda nije u skladu sa zahtevima farmakopeje u pogledu zahteva za ispitivanje navedenog farmaceutskog oblika,*
- *nisu specificirane nečistoće u specifikaciji gotovog proizvoda,*
- *postavljene široke granice za sadržaj aktivne supstance i nečistoća.*

Kontrolne metode opisuju se u meri koja omogućava svakoj laboratoriji sprovođenje navedene metode.

Kontrolne metode moraju biti validirane na propisani način.

Rezultati validacije svake korišćene analitičke metode čine sastavni deo registracione dokumentacije.

Najčešći nedostaci u priloženoj dokumentaciji:

- nije priložen opis metoda za kontrolu gotovog proizvoda,
- priložen je nepotpun opis metoda za kontrolu gotovog proizvoda.

Registraciona dokumentacija treba da sadrži sertifikate analiza za uzastopne serije proizvedenog leka.

Sertifikati analize treba da su u pogledu zahteva usklađeni sa priloženom specifikacijom u trenutku puštanja serije leka u promet.

Najčešći nedostaci u priloženoj dokumentaciji:

- specifikacija gotovog proizvoda i sertifikat analize nisu usklađeni u pogledu zahteva ili opsega odstupanja.

Analitičke metode koje se primenjuju u kontroli gotovog proizvoda, kao i za evaluaciju rezultata dobijenih ispitivanjem stabilnosti, moraju biti validirane kako bismo bili sigurni u tačnost i pouzdanost rezultata.

Cilj validacije analitičke metode je potvrda pogodnosti upotrebljene metode.

Validacija analitičkih metoda prilaže se za:

- testove identifikacije
- testove kvantitativne determinacije sadržaja nečistoća
- utvrđivanje graničnih vrednosti za sadržaj nečistoća
- određivanje sadržaja aktivne supstance u gotovom proizvodu
- test ispitivanja brzine oslobađanja aktivne supstance iz lekovitog oblika (*dissolution test*)
- određivanje veličine čestica

Analitičke metode koje se koriste za ispitivanje stabilnosti aktivne supstance ili gotovog proizvoda moraju biti validirane prema važećim standardima.

Najčešći nedostaci u priloženoj dokumentaciji:

- nije priložena validacija analitičke metode,
- nedostaju hromatogrami,
- priložena je nepotpuna validacija analitičke metode.

U trenutku podnošenja zahteva za izdavanje dozvole za stavljanje leka u promet, podnosilac zahteva dužan je da priloži podatke dobijene ispitivanjem stabilnosti gotovog proizvoda:

- na najmanje dve pilot serije u slučaju da je stabilnost aktivne supstance detaljno prikazana
- na najmanje dve pilot serije i jednoj pilot seriji manje veličine, u slučaju da je aktivna supstanca nestabilna.

Nakon izdavanja dozvole za stavljanje leka u promet, proizvođač je dužan da na prve tri proizvedene serije gotovog proizvoda ispita stabilnost prema odobrenom protokolu i o dobijenim rezultatima izvesti regulatorne organe.

Najčešći nedostaci u priloženoj dokumentaciji:

- *nije dostavljena specifikacija gotovog proizvoda u roku upotrebe,*
- *dostavljena specifikacija u roku upotrebe nije u skladu sa specifikacijom gotovog proizvoda,*
- *dostavljene studije stabilnosti nisu sprovedene prema zahtevima smernica,*
- *postavljene široke granice za sadržaj degradacionih produkata u specifikaciji u roku upotrebe u odnosu na rezultate prikazane u okviru studija stabilnosti,*
- *nije definisan rok upotrebe i uslovi čuvanja,*
- *nije dostavljeno ispitivanje stabilnosti gotovog proizvoda posle otvaranja kontejnera,*
- *nije dostavljeno ispitivanje stabilnosti medicinirane hrane/vode.*

ZAKLJUČAK

Regulativa iz oblasti lekova predstavlja polje kontinuiranog usavršavanja, s obzirom na permanentan razvoj i unapređivanje znanja i opreme koja se koristi u farmaceutskoj industriji.

U tom smislu, postavljanje i implementacija regulatornih zahteva stoje u tesnoj povezanosti na putu ka bržem plasiranju kvalitetnih, bezbednih i efikasnih lekova na tržište.

LITERATURA

1. Guideline for an Assessor preparing assessment reports for veterinary medicines products, EMEA/CVMP/115769/2005
2. Note for guidance: Development pharmaceuticals for veterinary medicinal products, EMEA/CVMP/315/98
3. Guideline on Summary of requirements for active substances in the quality part of the dossier, EMEA/CVMP/1069/02
4. Note for guidance: Excipients in the dossier for application or marketing authorization for veterinary medicinal products, EMEA/CVMP/004/98
5. Manufacture of the finished dosage form, EMEA/CVMP/126/95
6. Specifications and control tests on the finished product, III/3324/89
7. Guideline on impurities in new veterinary medicinal products, EMEA/CVMP/VICH/838/99-Rev.1
8. Impurities: Residual solvents in new veterinary medicinal products, active substances and excipients, EMEA/VICH/502/99
9. Annexes to: CPMP/ICH/283/95 i CVMP/VICH/502/99
10. Note for guidance on inclusion of antioxidants and antimicrobial preservatives in medicinal products, CPMP/CVMP/QWP/115/95

11. Guideline on validation of analytical procedures: methodology, CVMP/VICH/591/98
12. Guideline on validation of analytical procedures: definition and terminology, CVMP/VICH/590/98
13. Stability testing for medicated premixes, CVMP/VICH/836/99
14. Additional quality requirements for products intended for incorporation into animal feeding stuffs (medicated pre-mixes), EMEA/CVMP/080/95
15. In-use stability testing of veterinary medicinal products (excluding immunological veterinary medicinal products), EMEA/CVMP/127/95
16. Quality aspects of pharmaceutical veterinary medicines for administration via drinking water, EMEA/CVMP/540/03
17. Note for guidance on Stability testing of existing active substances and related finished products, EMEA/CVMP/846/99

Primljeno: 25.08.2011.

Odobreno: 20.09.2011.

Tabela 1. Struktura fizičko-biološko-hemijske dokumentacije

2.A:	tSastav leka:			
	2.A.1	Sastavleka,		
	2.A.2	Pakovanje – kratak opis,		
	2.A.3	Formulacija za klinička ispitivanja,		
	2.A.4	Razvoj leka;		
2.B:	Opis procesa proizvodnje:			
	2.B.1	Proizvodna formula,		
	2.B.2	Proizvodni proces (sa dijagramom toka procesa i procesnom kontrolom),		
	2.B.3	Validacija proizvodnog procesa;		
2.C:	Kontrola polaznih supstanci i pakovnog materijala:			
	2.C.1	Aktivna supstanca		
		2.C.1.1	Specifikacije i rutinski testovi,	
			2.C 1.1.1	Aktivna supstanca opisana u farmakopeji,
			2.C.1.1.2	Aktivna supstanca koja nije opisana u farmakopeji,

		2.C.1.2	Naučni podaci,	
	2.C.2	Ekscipijensi		
		2.C.2.1	Specifikacije i rutinski testovi,	
			2.C.2.1.1	Ekscipijensi opisani u farmakopeji,
			2.C.2.1.1	Ekscipijensi koji nisu opisani u farmakopeji,
		2.C.2.2	Naučni podaci (u slučaju upotrebe novih ekscipijenasa),	
	2.C.3	Materijal za pakovanje – kontaktna ambalaža		
		2.C.3.1	Specifikacije i rutinski testovi,	
		2.C.3.2	Naučni podaci (izbor materijala i analitički rezultati);	
2.D: Posebne mere u cilju sprečavanja prenošenja transmisivnih spongiformnih encefalopatija životinja (TSE);				
2.E:	Kontrola međuproduzoda (ako postoji);			
2.F:	Kontrola gotovog proizvoda:			
	2.F.1	Specifikacija i rutinski testovi,		
		2.F.1.1	Zahtevi ispitivanja i kontrolni testovi,	
		2.F.1.2	Metode ispitivanja,	
	2.F.2	Naučni podaci,		
		2.F.2.1	Validacija analitičkih metoda,	
		2.F.2.2	Analize proizvodnih serija;	
2.G:	Stabilnost:			
	2.G.1	Testovi stabilnosti za aktivnu supstancu,		
		2.G.1	Testovi stabilnosti za gotov proizvod;	
2.H: Procena rizika po životnu sredinu za lekove koji sadrže genetski modifikovane organizme (GMO);				
2.Q:	Ostale podatke.			

UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RUKOPISA

ARHIV VETERINARSKJE 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 table.

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.

Scheme (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