

UDK 619

ISSN 1820-9955

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”
Novi Sad

Arhiv veterinarske medicine

Arh. vet. med.	vol. 4	br. 2	str. 1-80	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

TERAPIJSKA PRIMENA FLUOROHINOLONA U ŽIVINARSTVU I UTICAJ NA BEZBEDNOST MESA – REZIDUE U JESTIVIM TKIVIMA ŽIVINE

Jelena Petrović¹, Marcela Šeperanda², S. Stefanović³,
M.Ž. Baltić⁴, R. Ratajac¹, Jelena Apić¹

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

²Poljoprivredni fakultet, Osijek, Hrvatska

³Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

⁴Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Kratki sadržaj

Danas su u nauci o bezbednosti hrane definisane dve glavne opasnosti koje nastaju kao direktna posledica primene anitmikrobnih lekova: rezidue u jestivim tkivima i razvijanje rezistencije zoonotskih patogena. Enrofloksacin i flumekvin su antimikrobni lekovi iz grupe fluorohinolona, u Srbiji su registrovani za upotrebu kod živine. Eliminisanje rizika za zdravlje potrošača se vrši na osnovu praćenja sadržaja rezidua fluorohinolona i njihovih glavnih metabolita u jestivim tkivima lečenih brojlera. Nakon propisanog aplikovanja oba leka sadržaj rezidua u jestivim tkivima opada do dozvoljenih količina (ispod MDK) (MDK - maksimalno dozvoljene količine) tokom propisanog perioda karence. Međutim, i nakon isteka karence rezidue nekih fluorohinolona, kao što je enrofloksacin, zadržavaju se u jestivim tkivima duži vremenski period. Rezidue enrofloksacina manje od MDK se mogu dokazati u mesu sve do devetog dana nakon prekida terapije, dok se u jetri zadržavaju mnogo duže. Tek 22. dana nakon prekida terapije nije potvrđeno prisustvo rezidua u jetri.

Ključne reči: bezbednost hrane, rezidue

¹E mail: jelenap@niv.ns.ac.rs

THERAPEUTICAL USAGE OF FLUOROQUINOLONES IN POULTRY PRODUCTION INFLUENCE ON MEAT SAFETY – RESIDUES IN EDIBLE TISSUES

**Jelena Petrović¹, Marcela Šeperanda², S. Stefanović³,
M.Ž. Baltić⁴, R. Ratajac¹, Jelena Apić¹**

¹Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad

²Faculty of Agriculture, Osijek, Croatia

³Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade

⁴Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade

Abstracts

Current most important side effects of antimicrobial drugs usage are veterinary drug residues in edible animal tissues and development of resistance in food borne pathogens. Enrofloxacin and flumequin are fluoroquinolone antimicrobials licensed in Serbia for use in poultry treatment. Elimination of health risk for consumers is usually made by examination of the target tissue residues of flumequin and enrofloxacin (with its main metabolite ciprofloxacin). After correct application of enrofloxacin and flumequin tissue residue levels decrease to permitted quantities (below MRL) (Maximum Residue Limit) in prescribed withdrawal period. But even after expiration of withdrawal period residues of enrofloxacin are still present in edible animal tissues. Residues of enrofloxacin below MRL can be detected in meat nine days after the end of treatment, however, residues in liver are present much longer. The residues were detected in liver until 22nd post treatment day.

Key words: food safety, residues

UVOD

Upotreba antimikrobnih lekova u humanoј medicini je počela tridesetih godina prošlog veka, nedugo zatim počelo se sa primenom ovih lekova u veterini u terapiji mastitisa. Od tada je upotreba antimikrobnih lekova tako učestala, da se smatra da današnja intenzivna stočarska proizvodnja bez njih ne bi bila moguća. Fluorohinoloni su jedini potpuno sintetički antimikrobni lekovi koji se, po učestalosti upotrebe, mogu takmičiti sa beta-laktamima. Za 25 godina, od kako su uvedeni u kliničku upotrebu, razvili su se, od relativno malo važne grupe lekova za terapiju urinarnih infekcija, u grupu koja se široko koristi u celom svetu (Appelbaum i Hunter, 2000). Oni se smatraju goto-

vo idealnim antimikrobnim lekovima, poseduju širok spektar antimikrobne aktivnosti, nisku toksičnost i odlične kliničke farmakokinetičke osobine, što predstavlja značajnu prednost u odnosu na ostale grupe antimikrobnih lekova. Fluorohinoloni (enrofloksacin, flumekvin, norfloksacin) su zakonom odobreni lekovi za lečenje živine u našoj zemlji (Jezdimirović, 2002). U živinarstvu se najčešće koriste u lečenju salmoneloze, kolibaciloze i pastereloze.

BEZBEDNOST HRANE

Bezbednost je osnovni prioritet u proizvodnji hrane u celom svetu. Bezbedna hrana je slobodna od rezidua, kontaminenata i patogenih mikroorganizama. Sagledavanje problema vezanih za namirnice otvara pitanje uticaja primarne proizvodnje na bezbednost hrane. Preterana upotreba antimikrobnih lekova u intenzivnom stočarstvu je realnost i samo je pitanje na koji način i u kojoj meri se odražava na ispravnost namirnica animalnog porekla. Danas su u nauci o bezbednosti hrane definisane dve glavne opasnosti koje nastaju kao direktna posledica primene anitmikrobnih lekova: rezidue u jestivim tkivima i razvijanje rezistencije zoonotskih patogena (Petrović i sar., 2008).

Kao posledica upotrebe veterinarskih lekova kod životinja u mesu se, kao i u ostalim namirnicama životinjskog porekla, mogu naći ostaci (rezidue) lekova i njihovih metabolita, koji namirnice čine higijenski neispravnim, jer mogu štetno delovati na zdravlje ljudi. Brojna istraživanja ukazuju na ovu mogućnost i pri tom ističu značaj antimikrobnih lekova. Konzumiranje mesa, kao i drugih namirnica sa reziduama ovih lekova, ne retko kod ljudi, može prouzrokovati nastajanje određenih neželjenih efekata. Promene u CNS-u i gastrointestinalnom traktu, fototoksičnost, hondrotoksičnost, zapaljenje i pucanje tetiva, disbalans u humanoj digestivnoj mikroflori su neželjeni efekti vezani za fluorohinolone (Kidd i sar., 2000; Ouédraogo i sar., 2000; Stahlman i sar., 2000; Nagai i sar., 2002; Stahlmann, 2002; Hsiao i sar., 2005; Owens i Ambrose, 2005; Iannini P.B., 2007). Posle terapijske primene ciprofloksacina u SAD je ustanovljeno više od 30 slučajeva alergijskih reakcija kod ljudi, dok je u Evropi ustanovljeno 15 slučajeva alergijskih reakcija na ofloksacin i moksifloksacin. Neki od ovih slučajeva su se javili i prilikom prve aplikacije leka (Ho i Song, 2003). Upravo zato se meso sa ostacima antimikrobnih lekova proglašava higijenski neispravnim, odnosno neupotrebljivim za ishranu ljudi. Zbog rizika od pojave rezidua lekova u tkivima, u svetu su danas propisane vrednosti za maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) (eng. maximum residue limit - MRL) fluorohinolona u tkivima životinja koja se koriste za ishranu ljudi.

FLUOROHINOLONI

Obzirom da su fluorohinoloni antimikrobni lekovi od velikog značaja za živinarstvo, ne mogu se eliminisati kao izvor opasnosti za pojavu rezidua. Procenom rizika tj. kvalitativnom i kvantitativnom analizom verovatnoće da će do rizika doći, dobija se polazna osnova za upravljanje rizikom i mogu se eliminisati ili smanjiti nepoželjni efekti upotrebe fluorohinolona.

Našim ispitivanjima (Petrović i sar., 2006; Petrović i sar., 2009) je ustanovljeno da su nakon pravilne terapijske upotrebe enrofloksacina rezidue prisutne u mesu i jetri živine u nedozvoljenim količinama do četvrtog dana karence a flumekvina do prvog dana karence (Tabela 1). Nedozvoljenje količine su koncentracije rezidua iznad MDK. MDK vrednosti su propisane za zbir enrofloksacina i ciprofloksacina i iznose 100 ng/g za meso i 200 ng/g za jetru a za flumekvin iznose 400 ng/g za meso i 800 ng/g za jetru (Council Regulation, 1990).

Tokom pet dana aplikovanja, koncentracija enrofloksacina u mesu i jetri je bila visoko iznad MRL vrednosti. Koncentracija je rasla u tkivima sve do prvog dana karence, a zatim je naglo počela da opada. Zbog intenzivnog metabolizma sadržaj rezidua je uvek viši u jetri nego u mesu (2-4 puta). Nakon isteka karence, enrofloksacin je bio prisutan u vrlo niskim koncentracijama. U mesu se mogao dokazati sve do devetog dana nakon prekida terapije dok se u jetri zadržao mnogo duže. Tek 22. dana nakon prekida terapije nije potvrđeno prisustvo u jetri (Petrović i sar., 2006).

Tokom aplikovanja flumekvina koncentracija rezidua u mesu i jetri je počev od trećeg dana primene leka bila visoko iznad MRL vrednosti i zadržala se do prvog dana karence. Već drugog dana karence koncentracija rezidua pada ispod MRL nivoa. Flumekvin nije izmeren u jestivim tkivima nakon isteka karence kako je to bio slučaj sa flumekvinom (Petrović i sar., 2009).

Tabela1: Sadržaj rezidua u mesu i jetri tokom terapije fluorohinolonima

Dan terapije		HPLC (ng/g)		
		Enrofloksacin	Ciprofloksacin	Flumekvuine
-1	M	0	0	0
	J	0	0	0
2 T	M	130	<10	220
	J	510	190	420
3 T	M	/	/	710
	J	/	/	840
1 PT	M	580	50	980
	J	1200	820	1760
2 PT	M	/	/	60
	J	/	/	100
6 PT	M	20	70	<10
	J	50	<10	<10
9 PT	M	20	<10	<10
	J	40	<10	<10

M- meso; J-jetra; -1- pre terapije; T- dan aplikovanja leka; PT- dan nakon završetka terapije, / nije ispitano

ZAKLJUČAK

Izloženost opasnosti, u ovom slučaju, reziduama je rezultat uključivanja mnogih faktora na putu hrane od farme do trpeze. Poštovanje profilaktičkih mera u objektima za držanje živine smanjuju pojavu oboljenja kod živine i potrebu za lečenjem fluorohinolonima. Ukoliko je terapija neophodna poštovanjem propisanog načina tretiranja živine se može kontrolisati rizik od pojave rezidua. U našoj zemlji upotreba antimikrobnih lekova je liberalna i zato se javljaju različiti vidovi nepravilne upotrebe: upotreba od strane nestručnih lica, kod oboljenja za koje nisu namenjeni, ili kod životinjskih vrsta za koje nisu namenjeni, predoziranje a naročito subdoziranje, neadekvatna dužina aplikovanja leka i najrašireniji vid zloupotrebe - upotreba antimikrobnih lekova kao prečice za rešavanje uzgojnih problema. Kod nepravilne upotrebe antimikrobnih lekova nemoguće je ispratiti period karence a samim tim povećava se rizik od pojave zdravstveno neispravnog mesa na tržištu.

Mere za redukciju opasnosti imaju primenu na svakom koraku, od proizvodnje životinja do konzumiranja hrane. Pravilna primena ovih mera može značajno umanjiti rizik. Na ovaj način se ističe pravi značaj primarne proizvodnje. Upravljanje rizikom počinje još na farmi, gde se primenjuje pravilno držanje životinja i rukovanje antimikrobnim lekovima i time se obezbeđuje, ne samo dobro zdravlje životinja, već se smanjuje rizik od pojave rezidua. Da bi se očuvala efikasnost fluorohinolona u humanoj i veterinarskoj medicini, a da bi se minimalizovao rizik po zdravlje ljudi, upotreba fluorohinolona mora biti pod nadzorom. Prema Van den Bogaard i Stobberingh (2000), fluorohinoloni u veterinarskoj medicini ne bi trebalo da budu antimikrobni lekovi prvog već trećeg izbora. Posledično, oni bi trebalo da budu prepisani životinjama za proizvodnju hrane samo od strane veterinara i to posle laboratorijske potvrde dijagnoze i antibiograma. Ako je indikovana grupna terapija, fluorohinoloni bi se smeli koristiti samo ako je uzročnik prema njima vrlo osetljiv. Na osnovu izvršenih ispitivanja može se predložiti da primena fluorohinolona bude ograničena samo uz recept veterinara, čime bi se sprečili svi nepravilni oblici upotrebe leka i bilo bi moguće ispoštovati period karence.

LITERATURA

1. Appelbaum P., Hunter P.: The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J of Antimicrob agents*, 16, 5-15, 2000.
2. Council Regulation (EEC) No 2377/90: Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, *Official J of the EU*, 224, 1-110, 1990.
3. Ho D., Song J., Wang C.: Anaphylactoid reaction to ciprofloxacin. *Ann Pharmacother*, 37, 7, 1018-1023, 2003.
4. Hsiao S.H., Chang C.M., Tsao C.J., Lee Y.Y., Hsu M.Y., Wu T.J.: **Acute Rhabdomyolysis Associated with Ofloxacin/ Levofloxacin Therapy.** *Ann. Pharmacother.* 39, 1, 146 – 149, 2005.
5. Iannini P.B.: The safety profile of moxifloxacin and other fluoroquinolones in special patient populations. *Curr Med Res Opin* 23, 6, 1403–1413, 2007.
6. Jezdimirović M.: Hinoloni (Kvinoloni), U: Jezdimirović MB, urednik, Osnovi farmakoterapije i gotovo lekovi ad us. vet., Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 197-199, 2002.
7. Kidd S., Meunier J.R., Traynor N., Marrot L., Agapakis-Causse C., Gibbs N.: The phototumorigenic fluoroquinolone, lomefloxacin, photosensitises p53 accumulation and transcriptional activity in human skin cells. *J Photochem and Photobiol B: Biology* 58, 1, 26-31, 2000.

8. Ouédraogo G., Morlière P., Santus R., Miranda M. A., Castell J. V.: Damage to mitochondria of cultured human skin fibroblasts photosensitized by fluoroquinolones. *J of Photochem and Photobiol B: Biology* 58, 1, 20-25, 2000.
9. Owens R.C., Ambrose P.G.: Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 41, Suppl 2, 144–157, 2005.
10. Petrović J., Baltić M., Čupić V., Stefanović S., Stojanović D.: Residues of enrofloxacin and its main metabolite ciprofloxacin in broiler chickens. *Acta veterinaria*, 56, 5-6, 497-506, 2006.
11. Petrović J., Milanov D., Ratajac R.: Savremeni trendovi u bezbednosti hrane: Rezistencija zoonotskih patogena prema antimikrobnim lekovima (Contemporary food safety trends: antimicrobial resistance in zoonotic pathogens). *Veterinarski glasnik* 62 (5-6): 257-406, 2008.
12. Petrović J., Baltić M., Stefanović S., Milanov D., Ratajac R.: Determination of flumequine residues in broiler chickens with HPLC and screening method (Ispitivanje rezidua flumekvina kod brojlera HPLC i skrining metodom). *Acta Veterinaria*, 56 (5-6):547-555, 2009.
13. Stahlman R., Kuhner S., Shakibaei M.: Chondrotoxicity of ciprofloxacin in immature beagle dogs: Immunohistochemistry, electron microscopy and drug plasma concentrations. *Arch Toxicol*, 73, 10-11, 564-572, 2000.
14. Van den Bogaard A., Stobberingh E.: Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *Int J of Antim Agents* 14, 4, 327-335, 2000.

Primljeno: 25.11.2011.

Odobreno: 20.12.2011.

SALMONELLA CONTROL IN POULTRY PRODUCTION AND RESISTANCE MONITORING IN SERBIA¹

Maja Velhner², Dubravka Potkonjak¹, Stojanov I.¹, Dragica
Stojanović¹, Jelena Petrović¹ and Gordana Kozoderović²

¹Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad, Serbia

²Institute of Public Health of Vojvodina, Novi Sad, Serbia

Abstracts

A new regulation on *Salmonella* control in Serbia has been implemented recently. The main goal is to eliminate two most common serovars, *Salmonella* Enteritidis (SE) and *Salmonella* Typhimurium (ST) from the poultry farms and to keep the infections caused by these bacteria under control. Experimental work conducted in the past decade in our Institute provided evidence that *Salmonella* is transmitted easily in a flock and is hard to be eliminated from the farms and hatcheries. This is in good agreement with the published research work by other authors. It is also evident that good management practice and vaccination strategy must be implemented in poultry production. Therefore a simple questionnaire for poultry producers and hatchery experts to provide a quick overview of the management practice was designed in order to find out shortcomings. Salmonella monitoring must be conducted by applying bacteriological examination while serology control is efficient more during exploitation and less during rearing. However, it was found out that bacteriology and serology can be successfully combined in order to estimate the infection status. Although regular bacteriological screening for salmonella is compulsory, some farmers in the country do not pursue this type of analysis at the recommended frequency. Subsequently, those who send the samples for bacteriological examination more often seem to have more salmonella related problems. The most frequent finding of salmonella was in the chickens that died during transportation and the first three days of life and from paper pads. Extremely rare finding of salmonella was in breeding eggs and even rarer in table eggs. If environmental samples from commercial layers are positive, sero-

¹Rad je saopšten na skupu : Jubilejnata naučna sesija po slučaj 110 godini NDNIVMI, Sofija, Buigarska

²E- mail: maja@niv.ns.ac.rs

logy testing is recommended. *Salmonella* isolated from chickens and farm premises in Serbia were susceptible to most antimicrobials tested. Multiple resistances was quite seldom but approximately 20% of the isolates were quinolone resistant. The resistance to fluoroquinolones was not detected. However, *Salmonella* highly resistant to nalidixic acid with MIC (minimal inhibitory concentration) to NAL ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$ were less susceptible to ciprofloxacin, although MICs to CIP were still below the CLSI recommended breakpoint ($R \geq 4$ $\mu\text{g/ml}$). Similar reports were obtained in investigation of salmonella isolated from human stool and the research indicates that the most frequent serovar in the country in humans, food and poultry include *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Infantis.

KONTROLA INFEKCIJA UZROKOVANIH SALMONELAMA U ŽIVINARSTVU U SRBIJI I MONITORING NA REZISTENCIJU

Maja Velhner¹, Dubravka Potkonjak¹, Stojanov I.¹, Dragica Stojanović¹, Jelena Petrović¹ and Gordana Kozoderović²

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

²Institute of Public Health of Vojvodina, Novi Sad, Serbia

Kratka sadržaj

U Srbiji je nedavno usvojen novi zakon o kontroli salmonela. Glavni cilj je da se sa farmi živine eliminišu dva najučestalija serovara: *Salmonella* Enteritidis (SE) i *Salmonella* Typhimurium (ST) kako bi infekcije prouzrokovane ovim bakterijama bile pod kontrolom. Eksperimentalni rad koji je poslednje dve decenije sproveden u našem Institutu ukazuje na to da se salmonela lako prenosi kroz jata i da se teško eliminiše sa farmi i iz inkubatora. Ovo je u skladu sa objavljenim radovima drugih autora. Takođe je evidentno da se dobra proizvođačka praksa i strategija vakcinisanja moraju uvesti u proizvodnju živine. Zbog toga je osmišljen jednostavni upitnik za proizvođače i stručnjake iz oblasti živinarstva, kako bi se stekao uvid u praksu upravljanja i da bi se uočili nedostaci. Praćenje salmonele se mora sprovesti primenom bakterioloških ispitivanja, dok je serološka kontrola uspešnija tokom eksploatacije, a manje tokom uzgoja. Međutim, uočeno je da bakteriološka i serološka ispitivanja mogu uspešno da se kombinuju, kako bi se odredio infektivni status. Iako je vršenje redovnog bakteriološkog pregleda obavezno, neki farmeri u našoj zemlji ne rade ove analize onoliko

¹E- mail: maja@niv.ns.ac.rs

često koliko je to preporučeno. Zbog toga se stiče utisak da proizvođači koji šalju uzorke na bakteriološko ispitivanje češće imaju više problema u vezi sa salmonelama. Najčešće se salmonela nalazi kod pilića uginulih tokom transporta u prva tri dana života, kao i u pelenama. Salmonela se veoma retko otkriva u oplođenim jajima, a još ređe u konzumnim jajima. Ako su uzorci briseva pozitivni, preporučuje se primena seroloških ispitivanja. Salmonele koje su izolovane iz pilića i sa farmi u Srbiji su uglavnom osetljive na većinu ispitivanih antibiotika. Višestruka rezistencija se javljala veoma retko, ali otprilike 20% izolata je bilo rezistentno na hinolone. Rezistencija na fluorohinolone nije otkrivena. Međutim, salmonela koja je veoma rezistentna na nalidiksičnu kiselinu sa MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) na NAL ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$ bila je manje osetljiva na ciprofloksacin, iako je MIC na CIP još uvek bio ispod CLSI preporučene granične vrednosti ($R \geq 4$ $\mu\text{g/ml}$). Slični izveštaji su dobijeni i prilikom ispitivanja salmonele izolovane u stolici kod ljudi. Istraživanja ukazuju da su najčešći serovari u zemlji kod ljudi, u hrani i kod živine *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Infantis.

INTRODUCTION

Salmonella related problems in livestock production are attributed to food borne infections in humans. Accordingly veterinary and medical sectors are engaged in eliminating *Salmonella* from the food chain. The most common serovars in Serbian poultry industry are *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Infantis. Subsequently they are also most frequently found in stool. In the past decade a research was conducted at the Veterinary Institute in Novi Sad and is briefly presented here. We were trying to answer the following questions:

- Is the low level of infection with salmonella organisms detrimental to the sentinel chickens?
- Could we discover recent salmonella infection in poultry flocks?
- What is the best way to monitor its presence?
- What is the infection level in chickens?

The research was conducted in the experimental unit of the Institute on commercial broilers. *Salmonella* control was performed in routine examinations of different samples. The results are discussed in the face of the current legislative and available diagnostic accessories.

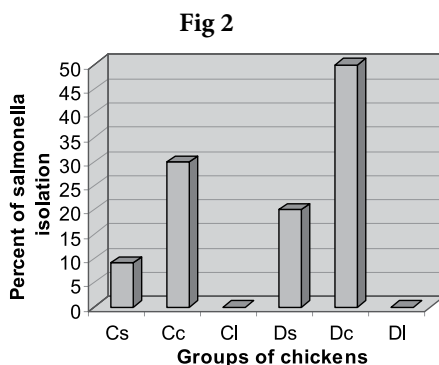
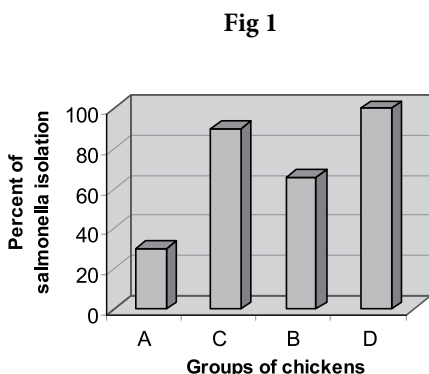
Salmonella invasiveness

The experiment was conducted on a day old commercial broiler chickens purchased from a local hatchery. Prior to the challenge, the chickens were swabbed and marked as negative to salmonella. Ten one day old chickens were infected with 10^2 cfu/0.1 ml of the *Salmonella* Enteritidis (SE) isolate (group A). Subsequently 10 sentinel (uninfected) chickens were held in the same room with infected one (group C). The second experiment was done with three weeks old commercial broiler chickens (a 10 day old chickens were delivered to the Institute and held in separate room until 3 weeks of age). These chickens were infected with 10^4 cfu/0.1 ml (group B) and ten sentinel birds (group D) were added in the same room. The infection was done by oral route. Ten control uninfected chickens were held in the separate room through the experiment (6 weeks).

Body weight was measured at 5, 7, 14 and 21 days post infection (dpi). Cloacal swabs were taken individually from the infected birds and sentinels, every day during 14 days (dpi). Control birds were swabbed at day 1 and at the termination of the experiment. At the end of the experiment (week 6) the chickens were sacrificed and from those infected by contact (group C and D) the cloacal swabs were collected and the liver and ceca were taken for *Salmonella* isolation.

At 14 and 21 dpi body weight of the chickens from group A and C was significantly lower comparing to the control group ($p < 0.05$). In group B the body weight was significantly lower 14 dpi comparing to the control.

Salmonella Enteritidis could be isolated from sentinel birds and the percent of salmonella isolation was higher comparing to the challenge birds (Fig 1).



Rate of *Salmonella* Enteritidis isolation from the cloacal swabs (Cs and Ds), ceca (Cc and Dc) and liver (Cl and Dl) is shown in Fig 2. It is evident that

the cecum was the organ of choice for SE detection in circumstances when the chickens were infected with low doses.

No antibodies were found by using ELISA test in the experimental groups of chickens (A,B,C and D) at the termination of the experiment. It was concluded that the best way to monitor *Salmonella* infection in broilers is bacteriology control and that it has to be performed in breeders and layers according to legislative (Velhner et al., 2005c).

ELISA serology

In Table 1 the results of serology test in three flocks of commercial layers is presented. The flock A was imported from the EU and *Salmonella* was isolated at one occasion during the production. However, this flock was not indicative to *Salmonella* infection after serology examination. The bacteriology finding was most likely accidental and did not resemble the true situation concerning SE infection. However, flocks B and C were tested negative upon bacteriology examination and yet ELISA titer was high showing that infection with *Salmonella* is significant. We concluded that, if infected during rearing, layer flocks will have high antibody titer to *Salmonella* later during production and then the estimation of the level of infection would be possible applying ELISA (Velhner et al., 2004).

Table 1: Antibody titer (Ab) determined by ELISA of individual sera on SE in flocks A, B and C

Flock A				Flock B				Flock C			
No	Ab. Titre	No	Ab. Titre	No	Ab. Titre	No	Ab. Titre	No	Ab. Titre	No	Ab. Titre
1	0	11	0	1	805	11	10069	1	20097	11	0
2	0	12	1196	2	1025	12	0	2	0	12	0
3	0	13	0	3	15381	13	0	3	0	13	27118
4	571	14	0	4	555	14	12416	4	6713	14	17522
5	0	15	0	5	12416	15	1835	5	1992	15	5121
6	0	16	0	6	21627	16	0	6	0	16	522
7	0	17	5901	7	890	17	2360	7	0	17	0
8	638	18	605	8	0	18	1264	8	1887	18	0
9	0	19	0	9	1316	19	3104	9	0	19	0
10	0	20	0	10	1539	20	0	10	5704	20	407

Results presented in Table 2 implicate that in Southern Backa and Srem region, the most frequent Salmonella is found in chickens that died during transportation or at day old. Chicken carcasses were also occasionally positive as well as unhatched eggs. This means that breeder farms are contaminated and hatcheries are sometimes a source of the infection (Velhner et al., 2005a; Potkonjak et al., 2006).

Table 2: Incidence of Salmonella isolation from poultry flocks in Southern Backa and Srem region

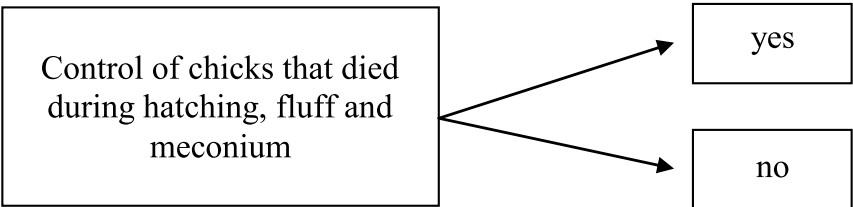
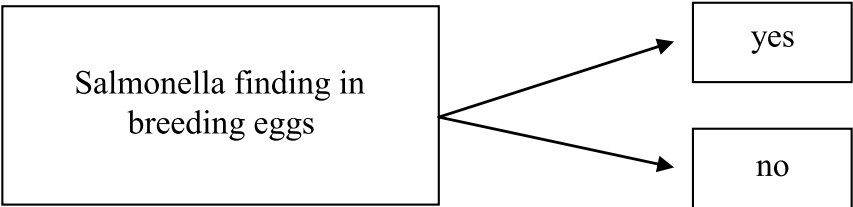
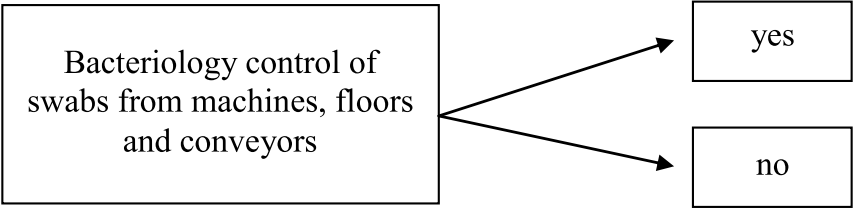
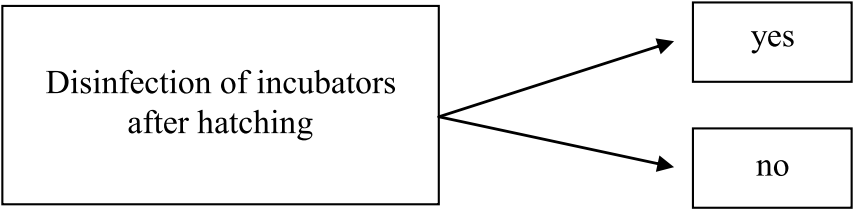
Farm	Number of samples	Number of positive samples	Type of sample	Percent of positive
A	5	1	Chicken carcasses	20
B	4	0	Chicken carcasses	0
C	7	1	Unhatched eggs	14.2
D	36	8	Chicks that died during transportation	22.2
E	10	0	Chicken carcasses	0
F	42	2	Chicks that died at day old	
G	4	1	Chicken carcasses	9.5
H	19	1	Chicken carcasses	25
I	5	0	Chicks that died during transportation	10.5
J	7	1	Chicken carcasses	0
		1	Chicks that died at day one	
		1	Chicken carcasses	28.5

We designed simple questioners to evaluate management on poultry farms and hatcheries (Fig 3 and 4). The idea was to challenge farmers to monitor basic critical control points and evaluate hygiene and bacteriology control during the production cycles. According to published data the most important is to purchase chickens from salmonella free parent flocks, to feed them with pelleted feed, to perform disinfection and rodent control on farms and to disinfect trucks on regular basis. The employed staff should keep the vehicles away from the changing rooms (Velhner et al., 2005b; Plavša et al., 2008).

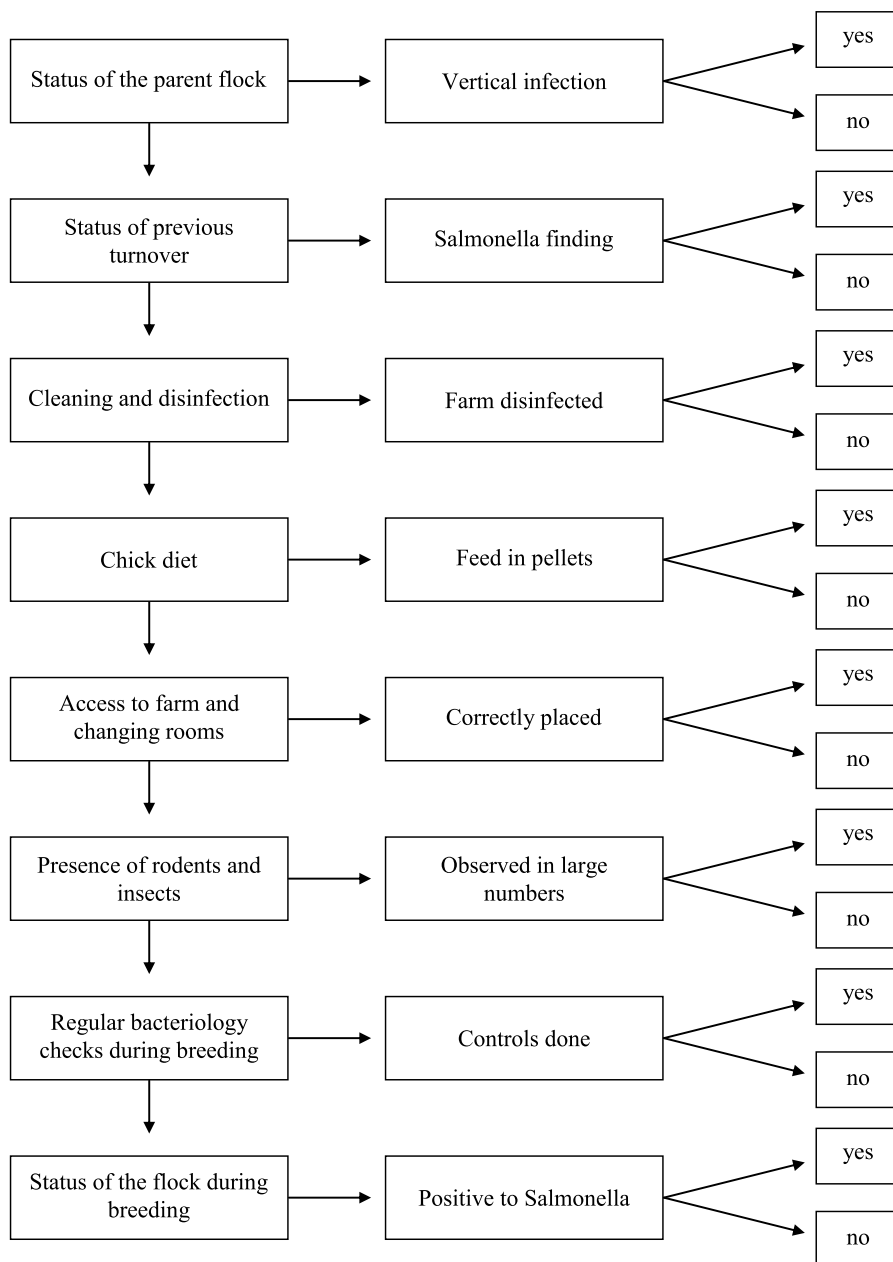
There are different approaches to combat salmonella's infection. In some countries vaccination is compulsory or is introduced voluntarily, while in other countries it is forbidden. Vaccination against paratyphoid salmonella was introduced in Serbia a decade ago, but has been regularly performed only in breeders. Most frequently inactivated vaccines containing SE and/or ST

have been used, while attenuated vaccines have not been exploited yet. Serology and bacteriology monitoring in breeder flocks provided results that stimulate producers to continue immunization practice (Potkonjak et al., 2007; Potkonjak et al., 2010). Only in few cases some deviations were noticed in relation to poor antibody response to prime vaccination, which was attributed to technical issues of vaccination procedure (unpublished data). However, the overall benefits of immunoprophylaxis are evident according to our recent epizootiological data that indicate some improvements of salmonella status on breeder level. This confirms that good management practice and vaccination in synergy lower the risk of introducing and spreading salmonella on farm and beyond (Orlić et al., 2006; Orlić et al., 2006b; Potkonjak et al., 2010). Immunization against salmonella in commercial layer flocks is strongly recommended, however it is not obligatory and only few farmers have implemented it in their vaccination programs. This is the major critical point, having in mind that table eggs are frequently implicated as a source of infection in cases of food poisoning in humans. Since the use of antibiotics is prohibited in production and in general not recommended to combat salmonella infections, the vaccination is highly desirable, particularly for the early protection of hens. From our experience and relevant literature, combination of live and inactivated vaccines would give the best protection possible. In the scope of current epizootiological situation, in recent future we may be faced with even more difficulties. The occurrence of other serovars in poultry flocks that also represent a risk for public health is quite possible, also having in mind the latest reports in countries of the European Union and worldwide. The provision of serology diagnostic tests with (somatic) antigens other than serogroup D and B could contribute to epizootiological investigations on the target salmonella. The origin, biological properties and possible control measures against the increasing number of *Salmonella* Infantis isolates, mostly from broilers call for further investigations (Stojanov et al., 2011).

Critical control points in hatcheries



Critical control points in chicken farming



Antimicrobial resistance monitoring

Since the year 2011, resistance monitoring to antimicrobial agents has been compulsory in Serbia. We however performed resistotyping in a collection of 60 SE isolated from stool, food and poultry. Following antimicrobials were included in the antibiogram: ampicillin (AMP) – 10 µg; amoxicillin/clavulanic acid (AMC) – 20/10 µg; cephalothin (CF) – 30 µg; ceftazidime (CAZ) – 30 µg; ceftriaxone (CRO) – 30 µg; gentamicin (GM) – 120 µg; amikacin (AK) – 30 µg; chloramphenicol (C) – 30 µg; ciprofloxacin (CIP) – 5 µg; nalidixic acid (NAL) – 30 µg; neomycin (NEO) – 30 µg; tetracycline (TET) – 30 µg; enrofloxacin (ENR) – 5 µg; fluorphenicol (FFC) – 30 µg; colistin (CL) – 10 µg; cefquinome (CEQ) – 10 µg; trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) – 1.25/23.75 µg; doxycycline (DOX) – 30 µg. Discs were Rosco Denmark and Bio-Rad France while as a control *Escherichia coli* ATCC 25922 was used. Only nine isolates were resistant to NAL and among those three isolates were multiple resistant. Two isolates from stool were resistant to AMP TET, SXT and AMP TET SXT and NEO. One poultry isolate was multiple resistant to AMP CF NAL and TET. In Table 3 the MIC for NAL and CIP is shown in NAL resistant and NAL susceptible isolates (Kozoderović et al., 2011).

Table 3: Distribution of combined MICs to NAL and CIP among NAL^S CIP^S isolates (30) and among NAL^R CIP^S isolates (9)

	MIC (µg/ml)		Number of isolates		MIC (µg/ml)		Number of isolates
	NAL	CIP			NAL	CIP	
NAL ^S CIP ^S	2	0.016	1	NAL ^R CIP ^S	128	0.256	1
	4	0.016	7		256	0.256	5
	4	0.032	20		256	0.512	2
	4	0.064	1		512	0.512	1
	8	0.032	1				
<i>E. coli</i>	1	0.016					
ATCC 25922							

CONCLUSION

Salmonella control in Serbia has to be more intensive and performed on regular basis on all farms and hatcheries, since the farmers who perform control more frequently, seem to have more *Salmonella* related problems. Such result does not resemble the real situation on the field. The control must be

as comprehensive as possible and as objective as possible. *Salmonella* spreads easily and is impossible to eliminate it once the flock is contaminated. This makes the eradication difficult and demanding. The pyramidal principle of *Salmonella* elimination from the top to the bottom (breeders-hatcheries-broilers or commercial layers) would be the best option to cope with this type of infection. Next is to improve food processing, transportation, storage and preparation. Consumers education on safe food handling is also necessary. If recent infection in the flock has to be elucidated, ELISA testing could be helpful, if preferable test kit is used. Even then interpretative criteria could be difficult. If the level of *Salmonella* infection needs to be estimated, combining bacteriology and serology, will be more informative. Until now the resistance to antimicrobial agents is fairly good. Monitoring needs to be in continuity and CLSI standards must be followed when interpreting obtained MIC results.

Acknowledgment

This work is supported by a grant from the Ministry of Research and Technological Development Republic of Serbia, Project number TR31071. The paper was presented at the meeting in Sofia, November 7-10th, 2011 as a part of the Research Symposium dedicated to the celebration of 110 year of the National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute "Professor Dr G. Pavlov".

LITERATURE

1. Kozoderović G., Velhner M., Jelesić Z., Stojanov I., Petrović T., Stojanović D., Golić N.: Molecular typing and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry, food and humans in Serbia. *Folia Microbiologica*, 56, 66-71, 2011.
2. Orlić D., Kapetanov M., Velhner M., Potkonjak D.: Primena sistema kritičnih tačaka kontrole (CCP) u farmskom gajenju živine. *Savremena poljoprivreda* 55, 1/2, 200-205, 2006.
3. Orlić D., Kapetanov M., Velhner M., Potkonjak D., Stojanović D., Živkov-Baloš M.: Biosafety estimation on broiler farms using critical control points. *Lucrari stiintifice Medicina veterinara* 39, 186-189, 2006b.
4. Potkonjak D., Velhner M., Kapetanov M., Stojanov I., Orlić D.: Presence of salmonella spp. on broiler farms in southern Backa region of Serbia. *Lucrari stiintifice Medicina veterinara* 39, 202-205, 2006.
5. Potkonjak D., Velhner M., Orlić D., Kapetanov M., Živkov-Baloš M., Stojanović D.: Serological control on salmonella in some poultry flocks in Vojvodina region. *Lucrari stiintifice* 40, 40-744, 2007.

6. Potkonjak D., Velhner M., Kapetanov M., Stojanović D., Orlić D.: Značaj biosigurnosti i vakcinacije za prevenciju i kontrolu infekcija salmonelama paratifus grupe u jatima živine. U: Zbornik kratkih sadržaja, Simpozijum Stočarstvo, veterinarska medicina i ekonomika u ruralnom razvoju i proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane sa međunarodnim učešćem, Divčibare, 20-27 jun, 2010, urednik Blagoje Stančić, Novi Sad: Poljoprivredni fakultet, str. 33, 2010.
7. Plavša N., Maljković M., Potkonjak D., Orlić D.: Najčešće zoonoze u Republici Srbiji i uloga DDD mera u njihovom suzbijanju. U: Zbornik radova, XXIX savetovanje Dezinfekcija, dezinsekcija, deratizacija u zaštiti zdravlja ljudi i životinja sa međunarodnim učešćem, Prolom Banja, 2 maj - 1.jun 2008, urednik Branka Radenković-Damnjanović, Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 9-14, 2008.
8. Stojanov I., Potkonjak D., Kapetanov M., Ratajac R., Maljković M., Pušić I., Jovičin M.: Promene prisustva pojedinih serotipova salmonela u materijalima poreklom od živine, Prvi internacionalni epizootiološki dani, 6-9. april 2011.godine, Sijarinska banja, Lebane, Beograd: SVD, Sekcija za zoonoze, 86-87, 2011.
9. Velhner M., Orlić D., Potkonjak D., Kapetanov M., Lazić S. : Utvrđivanje specifičnih antitela na *Salmonella enteritidis* ELISA tehnikom u nekoliko odabranih jata kokoši nosilja. *Veterinarski glasnik*, 58, 3-4, 319-326, 2004.
10. Velhner M., Potkonjak D., Kapetanov M., Orlić D.: Bakteriološko ispitivanje pilića iz južnobačkog i sremskog okruga na prisustvo salmonela. *Veterinarski glasnik*, 59, 1-2, str. 297-303, 2005.
11. Velhner M., Plavša N., Rackov O., Orlić D.: Analiza opasnosti i faktora rizika od infekcije izazvane salmonelama i determinacija kritičnih kontrolnih tačaka u lancu proizvodnje u industrijskom živinarstvu. *Veterinarski glasnik*, 59, 3-4, 453-461, 2005.
12. Velhner M., Stojanov I., Potkonjak D., Kapetanov M., Orlić D., Rašić Z.: Salmonella Enteritidis isolation from broiler chickens infected with low doses. *Acta Veterinaria*, 55, 2-3, 183-191, 2005.

Primljeno: 15.12.2011.

Odobreno: 20.12.2011.

Originalni naučni rad

UDK 619: 616.988:636.2(497.113)

SEROPREVALENCA GOVEĐEG RESPIRATORNOG SINCICIJALNOG VIRUSA (BRSV) U VOJVODINI

Dejan Bugarski¹, Tamaš Petrović, Dubravka Milanov, Sava Lazić
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

Kratak sadržaj

U radu su prikazani rezultati serološkog ispitivanja infekcija goveđim respiratornim sincicijalnim virusom (BRSV) na farmama muznih goveda i tovilištima junadi u Vojvodini. Na svim ispitivanim farmama utvrđene su seropozitivne životinje, a seroprevalenca se razlikovala zavisno od starosti ispitivanih životinja, odnosno od proizvodnih grupa. Na farmama muznih goveda seroprevalenca je najniža kod teladi starosti oko 3,5 meseca, a kod životinja starijih od 1 godine seroprevalenca iznosi 100%. Kod teladi uzrasta između 30 i 70 dana, kada se najčešća javlja bronhopneumonija, nije utvrđena serokonverzija. U tovilištima, po prijemu teladi seroprevalenca je iznosila 22,89%. Broj seropozitivnih tokom tova se povećava tako da je po preboljenju kliničke bronhopneumonije seropozitivno 90% životinja, a na kraju tova 96,43%. Ispitivanjem je utvrđena raširenost BRSV i njegov značaj u etiologiji bronhopneumonija, naročito u tovilištima.

Ključne reči: seroprevalenca, BRSV, goveda

SEROPREVALENCE OF BOVINE RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (BRSV) IN VOJVODINA

Dejan Bugarski*, Tamaš Petrović, Dubravka Milanov, Sava Lazić
Scientific Veterinary Institute “Novi Sad“, Novi Sad

Abstracts

This paper presents the results of serological examination of respiratory infection with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) on dairy farms and cattle feedlots in Vojvodina. Seropositive animals were detected on

¹E-mail: dejan@niv.ns.ac.rs

U radu su navedena istraživanja sprovedena u okviru projekta TR 31084 finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

all examined farms. The seroprevalence differed depending on the age of examined animals, i.e. of animal production group. For dairy cattle seroprevalence was the lowest in calves aged about 3.5 months, and in animals older than 1 year it was 100%. In the calves between 30 and 70 days of age, when pneumonia was frequent, seroconversion was not detected. Upon the arrival of new calves in feedlots seroprevalence was 22.89%. The number of seropositive animals during the fattening period increased, so after reconvalescence of clinical pneumonia, 90% of animals were seropositive, and 96.43% at the end of fattening period. This investigation detected prevalence of BRSV and its importance in the etiology of pneumonia, especially in feedlots.

Key words: seroprevalence, BRSV, cattle

UVOD

Govedi respiratorni sincicijalni virus (BRSV) je značajan patogen goveda jer samostalno ili u sadejstvu sa drugim mikroorganizmima dovodi do razvoja zapaljenja pluća sa posledičnim promenama u vidu hroničnog bronhiolitisa sa atelektazama (Philipuo i sar., 2000) i emfizematoznih bula (Gershwin, 2008). Velikog je ekonomskog značaja i smatra se da uzrokuje 60-70% epizootija pneumonija kod mlečnih i tovnih goveda sa različitim mortalitetom (Gershwin, 2008). BRSV se smatra endemskim u Evropi, a njegov značaj u etiologiji pneumonija goveda utvrđen je na farmama mlečnih goveda i tovilištima junadi i u Srbiji (Petrović i sar., 2009; Bugarski i sar., 2010).

MATERIJAL I METODI RADA

Serološki su ispitane životinje na farmama krava i u tovilištima junadi. Na svim ispitivanim farmama prisutne su infekcije disajnih organa u različitom obimu i ispitivanja su delom vršena kao deo dijagnostičkog postupka, a delom radi epizootioloških ispitivanja. U ispitivanim zapahtima nije vršena imunizacija protiv BRSV.

Određivanje titra specifičnih antitela protiv BRSV u krvi je vršeno virus neutralizacionim testom. Virus neutralizacioni test je izvođen po standardnoj proceduri opisanoj u *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Office International Des Epizooties* (2008). Za izvođenje testa je upotrebljen soj BRSV A5198 (ATCC USA). Pod serokonverzijom se podrazumevalo četverostruko povećanje titra specifičnih antitela u krvnom serumu životinja u uzorcima uzetim u razmaku od 21 dana.

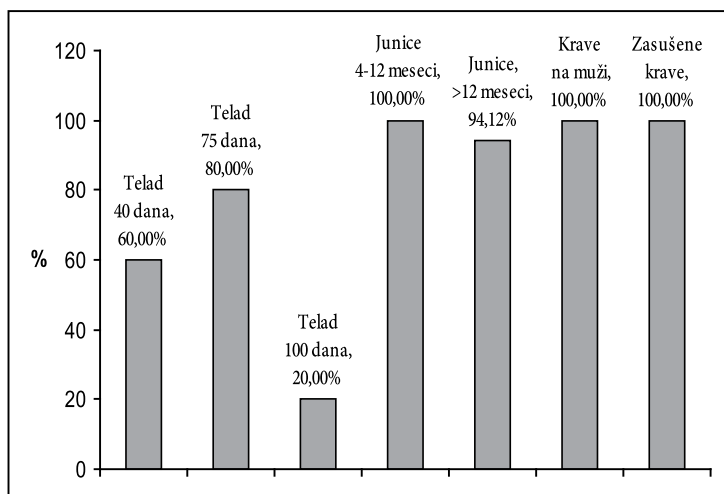
REZULTATI ISPITIVANJA

Serološka ispitivanja su izvršena na 6 farmi muznih krava odakle je ukupno ispitano 180 uzoraka krvnih seruma i u 16 tovilišta odakle su ispitana 223 uzorka.

Na 4 farme muznih krava serološki su ispitana telad starosti od 45 do 100 dana (ukupno 70 uzoraka), na jednoj farmi su ispitivana telad, junice i krave (92 uzorka) i na jednoj farmi ispitivanje je vršeno na uzorku krava u laktaciji (18 uzoraka). Seropozitivne životinje su utvrđene na svim ispitivanim farmama muznih krava. Ispitivanjem različitih uzrasnih i proizvodnih grupa na farmi muznih krava utvrđeno je da se seroprevalenca razlikuje po ispitanim grupama (Grafikon 1). Na farmi gde su ispitane životinje različitih uzrasnih grupa broj seropozitivnih životinja raste od četvrtog meseca starosti. Na drugoj farmi krava na kojoj je ispitan uzorak krava u laktaciji utvrđeno je 100% seropozitivnih životinja.

Na 4 farme telad su ispitivana sa ciljem određivanja serokonverzije u uzrastu od 30 do 70 dana, tj. kod teladi u uzrastu kada su infekcije donjih disajnih puteva teladi predstavljale značajan zdravstveni problem. Ni na jednoj ispitivanoj farmi nije utvrđena serokonverzija antitela protiv BRSV kod ispitivane teladi nakon enzootije pneumonije. Na jednoj od ove 4 farme u toku jedne godine ispitivanja serokonverzije, titar specifičnih antitela nije utvrđen ni kod jednog teleta u tri ispitivanja izvršena unutar 45 dana. Međutim, i na ovoj farmi su kasnije ustanovljena seropozitivna telad, čemu je prethodio unos većeg broja kupljenih steonih junica u zapat.

Grafikon 1. Seroprevalenca BRSV na farmi krava po različitim kategorijama goveda



Od ukupno ispitano 223 krvnih seruma iz tovišta 60,09% je sadržavalo specifična antitela protiv BRSV. Seroprevalenca je različita zavisno od faze tova. U Grafikonu 2 je dat zbiran rezultat broja seropozitivnih životinja iz svih tovišta u različitim fazama tova: neposredno po prijemu u tovište, u toku tova na početku pojave respiratornih simptoma, nakon preboljenja i na kraju tova. U Tabeli 1 je prikazan primer serokonverzije antitela protiv BRSV u jednom tovištu tokom enzootije bronhopneumonije.

Grafikon 2. Seroprevalenca BRSV kod teladi u tovištima

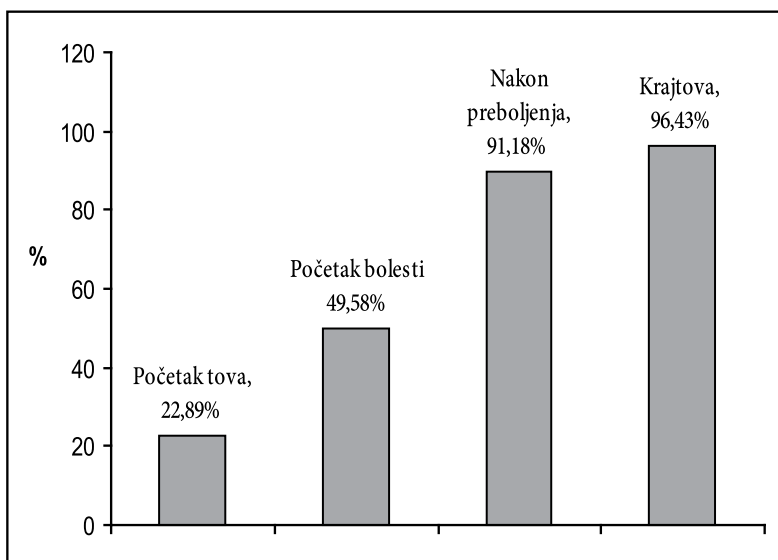


Tabela 1. Primer serokonverzije titra specifičnih antitela protiv BRSV nakon enzootije pneumonije u jednom tovištu

Oznaka teleta	Titir antitela 1:	
	14. avgust	4. septembar
0895	< 1:2	32
3957	4	16
4570	8	< 1:2
7403	< 1:2	16
8706	< 1:2	32
8743	< 1:2	16

DISKUSIJA

Iako ovo ispitivanje nije obuhvatilo veći broj zapata niti jedinki, dobijeni rezultati ukazuju na raširenost BRSV u uzgoju goveda u Vojvodini. Infekcije sa BRSV na farmama krava se obično ispoljavaju na dva različita načina: akutnim oblikom kod mladih i starijih grla, ako su prvi put u dodiru sa virusom i kliničkim znacima uglavnom kod mladih jedinki, ako je virus endemičan u zapatu (Luzzago i sar., 2010). Ispitivana telad na farmama krava, s obzirom na starost, verovatno su još uvek nosioci maternalnih antitela. Ranija ispitivanja su utvrdila da maternalna antitela protiv BRSV ostaju u krvotoku do 4 meseca i da u petom mesecu života padaju ispod nivoa detekcije (Uttenthal i sar., 2000). Činjenica da kod ispitivane teladi na farmama krava nije utvrđena serokonverzija ne mora obavezno da ukazuje na odsustvo infekcije. Infekcija teladi koja još imaju maternalna antitela u krvi nema za posledicu jasan imuni odgovor (Kimman i sar., 1987) i zbog toga se smatra da određivanje serokonverzije u ovakvim slučajevima nije pouzdan dijagnostički metod (Uttenthal i sar., 2000). Ukoliko je pre infekcije prisutan titar neutralizirajućih antitela u niskom titru posle infekcije dolazi do rasta titra antitela što nije slučaj ukoliko je preinfektivni titar visok kada posle infekcije titar antitela pada (Tjørnehøj i sar., 2003). Osobenost infekcije sa BRSV kod vrlo mlade teladi je da ona može proći u vrlo blagom obliku jer proinflamatorni imuni odgovor još nije dovoljno snažan za razliku od starije teladi (Antonis i sar., 2010). Na farmama krava seroprevalenca se povećava sa starošću životinja te u starosti od 12 meseci antitela su prisutna kod svih grla što je zapažanje i drugih autora (Van der Poel i sar., 1993).

Seroprevalenca među tovnim grlima je najniža kod teladi koja tek ulaze u tovište. Ovo je sa epizootiološkog stanovišta nepovoljna činjenica jer potpuno neimuna telad dolaze u relativno blizak dodir sa životinjama među kojima je virus prisutan. Pitanje načina održavanja virusa u populaciji nije još nije potpuno razjašnjeno. Pretpostavka o postojanju perzistentno inficiranih jedinki koja su izvor virusa nije potvrđena (Van der Poel i sar., 1997). Odsustvo aktivnog imuniteta po prispeću u tovište ima za posledicu da se u našim tovištima najčešće sreće težak oblik infekcije BRSV koji može biti praćen mortalitetom različitog stepena (Bugarski i sar., 2010). Ipak, odsustvo titra antitela u krvi po prispeću u tovište omogućilo je dobijanje jasne serokonverzije u parnim uzorcima krvnog seruma u slučaju enzootije pneumonije tako da u ovim slučajevima serološka dijagnostika ima svoju vrednost.

Imajući u vidu raširenost BRSV u populaciji goveda i njegov zdravstveni značaj nužno je korišćenje svih mera koje se tiču biobezbednosti, dobrobiti životinja i dobre proizvođačke prakse naročito u tovištima.

LITERATURA

1. Antonis A.F., de Jong M.C., van der Poel W.H., van der Most R.G., Stockhofe-Zurwieden N., Kimman T., Schrijver R.S.: Age-dependent differences in the pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus infections related to the development of natural immunocompetence. *Journal of General Virology*, 91, 2497-2506, 2010.
2. Bugarski D., Petrović T., Milanov D., Lazić S.: Infekcija junadi u tovu goveđim respiratornim sincicijalnim virusom. Zbornik kratkih sažetaka, Simpozijum Stočarstvo, veterinarska medicina i ekonomika u ruralnom razvoju i proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane, Divčibare, 20-27. jun 2010, 21.
3. Gershwin J.L.: Bovine respiratory syncytial virus infection: immunopathogenic mechanisms. *Animal Health Research Reviews* 8, 2, 207-213, 2008.
4. Kimman T.G., Westenbrink F., Schreuder B.E., Straver P.J.: Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 25, 6, 1097-106, 1987.
5. Luzzago C., Bronzo V., Salvetti S., Frigerio M., Ferrari N.: Bovine respiratory syncytial seroprevalence and risk factors in endemic dairy cattle herds. *Veterinary Research Communications*, 34, 1, 19-24, 2010.
6. Petrović T., Vidanović D., Bugarski D., Tomić A., Polaček V., Lazić S.: Nalaz govedeg sincicijalnog virusa (BRSV) u zapatima goveda u Srbiji. Zbornik radova i kratkih sadržaja, Simpozijum XI epizootiološki dani, 1-4 april, Apatin, 2009, 230-231.
7. Philipou S., Otto P., Reinhold P., Elschner M., Streckert H.J.: Respiratory syncytial viru-induced chronic bronchiolitis in experimentally infected calves. *Virchows Arch*, 436, 617-621, 2000.
8. Tjørnehøj K., Uttenthal Å., Viuff B., Larsen L.E., Røntved C., Rønsholt L.: An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves. *Research in Veterinary Science* 74, 55-65, 2003.
9. Uttenthal Å., Larsen L.E., Philipsen J.S., Tjørnehøj K., Viuff B., Nielsen K.H., Nielsen T.K.: Antibody dynamics in BRSV-infected Danish dairy herds as determined by isotype-specific immunoglobulins. *Veterinary Microbiology*, 76, 329-341, 2000.
10. Van der Poel W.H., Kramps J.A., Middel W.G., Van Oirschot J.T., Brand A.: Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. *Archives of Virology* 133, 3-4, 309-321, 1993.

11. Van der Poel W.H., Langedijk J.P.M., Kramps J.A., Middel W.G., Brand A., Van Oirschot J.T.: Serological indication for persistence of bovine respiratory syncytial virus in cattle and attempts to detect the virus. *Archives of Virology* 142, 8, 1681-1696, 1997.

Primljeno: 25.10.2011.

Odobreno: 20.12.2011.

MOGUĆNOST PRIMENE RAZLIČITIH SKRINING METODA ZA KONTROLU REZIDUA ANTIBIOTIKA U MLEKU

Jelena Apić¹, Jelena Petrović, Olga Rackov, Dubravka Milanov

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

Kratak sadržaj

Rezidue antibiotika u mleku mogu štetno delovati i na zdravlje ljudi i na mlecarsku tehnologiju. Da bi se sprečili nepoželjni efekti rezidua danas se koriste različite skrining metode za kвалитativno ispitivanje rezidua antibiotika u mleku. Cilj rada je da se primenom različitih skrining metoda uporedno ispita prisustvo rezidua antibiotika u uzorcima mleka iz različitih faza proizvodnog lanca (od sirovine do gotovog proizvoda). Izabrane su tri skrining metode koje se najčešće koriste u praksi: Delvo SP test, difuzionna metoda sa *B. stearothermophilus* i Penzim S test. Ukupno je ispitano 60 uzoraka mleka uzorkovanog iz različitih faza proizvodnje mleka od farme do gotovog proizvoda. Ispitivanjima je ustanovljena visoka međusobna podudarnost testova. Razlike koje se javljaju prilikom ispitivanja istog uzorka različitim metodama proističu iz različite osetljivosti ovih metoda. Delvo SP test je osetljiv prema antibioticima, sulfonamidima, dezinficijensima i inhibitornim materijama iz mleka (laktoferin, lizocim, laktoperoksidaza). Difuzionna metoda je osetljiva prema antibioticima, dok je Penzim S test osetljiv samo prema β -laktamskim antibioticima. Visoka podudarnost Penzim S testa sa ostala dva testa potvrđuje da su β -laktamski antibiotici najčešća vrsta rezidua koja se može naći u mleku. Razlike u rezultatima takođe mogu nastati i zbog razlika u pragu detekcije prema istim antibioticima. Na osnovu izvršenih ispitivanja ustanovljen je visok procenat uzoraka mleka koje sadrži rezidue antibiotika 30% u tanku na farmi, 20% u cisterni u mlekari i 20% u pasteizovanom i sterilizovanom mleku u prometu. Na osnovu uporednih ispitivanja difuzione metode, Delvo SP testa i Penzim S testa zaključujemo da su sve tri metode u visokoj međusobnoj saglasnosti i time ispunjavaju jedan od kriterijuma za uključivanje u sistematsku kontrolu mleka na prisustvo rezidua antibiotika.

Ključne reči: mleko, rezidue, difuzionna metoda, Delvo SP test, Penzim S test

¹E-mail: laskov2@neobee.net

CONTROL OF ANTIBIOTIC RESIDUE IN MILK FROM FARM TO TABLE

Jelena Apić, Jelena Petrović, Olga Rackov, Dubravka Milanov

Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Rumenački put 20 Novi Sad

Abstracts

Antibiotic residue in milk may have harmful consequences for humans and milk technology. In order to prevent adverse effects of residue, nowadays different screening methods are used for qualitative examination of antibiotic residue in milk. The aim of the work was to investigate the presence of antibiotic residue in the samples of milk from different phases of production chain (from raw material to final product) by using different screening methods. Three screening methods, that are most often used, were chosen. Microbiological inhibitory methods: Delvo SP test and diffusion method with *B. stearothermophilus* and enzyme method Penzyme S test. A total of 60 samples were examined. The samples were collected from whole milk production chain from farm to final product. The investigation determined high compatibility of tests. The differences that occur in examining the same sample using three different methods are a consequence of different sensitivity of the methods. Delvo SP test is sensitive to antibiotics, sulphonamides, disinfectants and inhibitory substances in milk (lactoferin, lactoperoxidase). Diffusion method is sensitive to antibiotics, while Penzyme S is sensitive only to β -lactam antibiotics. High coincidence of Penzyme S test with two other tests prove that β -lactam antibiotics are the most often residua that can be found in milk. The differences in results may also be a consequence of difference of detection limit for the same antibiotics. On the basis of performed investigation, it was detected that there is a high percent of milk sample that contain antibiotic residues 30% in bulk tanks on farms, 20% in cistern in diary and 20% in pasteurized and sterilized milk on the market. On the bases of parallel investigation of diffusion method, Delvo SP test and Penzyme S test, we can conclude that all three methods are extremely in agreement and thus they fulfill one of the criteria for introducing them in systematic milk control on presence of antibiotic residue.

Key words: milk, residue, diffusion method, Delvo SP test, Penzyme S test

UVOD

Rezidue veterinarskih lekova obuhvataju izvorni lek i/ili njegove metabolite u bilo kom jestivom delu animalnog proizvoda [1]. Prisustvo rezidua u mleku i proizvodima od mleka je posledica nepoštovanja karence, predoziranja, nestručne primene lekova, odsustva ili neadekvatne kontrole. Rezidue antibiotika u mleku mogu štetno uticati na zdravlje ljudi [2, 3, 4] i tehnološke procese pri preradi mleka [5]. Da bi se sprečili nepoželjni efekti rezidua u svetu se primenjuju različiti postupci kontrole, počev od kontrole proizvodnje, distribucije i upotrebe lekova, preko određivanja nivoa rezidua koji utiče na zdravlje ljudi do razvijanja metoda za otkrivanje te količine.

Ako se na farmi ne sprovodi pravilna kontrola rezidua antibiotika i ne preduzimaju odgovarajuće mere, mleko tretiranih krava u kome se nalazi nedozvoljena količina antibiotika, dospeva u tank sa zbirnim mlekom i kontaminira mleko slobodno od rezidua.

Sistematsko ispitivanje mleka na prisustvo rezidua antibiotika ima za cilj da otkrije sirovo mleko koje sadrži rezidue antibiotika i isključi ga iz dalje proizvodnje. Težište ovakve vrste kontrole se nalazi u mlekari obzirom da se jedino u mlekari mogu pregledati svi uzorci sirovog mleka i efikasno sprečiti ulazak neispravnog mleka u proizvodnju.

U sistematskoj kontroli antibiotika za ispitivanje i selekciju velikog broja uzoraka koriste se skrining metode. Uzorci koji su pozitivni ili sumnjivi na prisustvo antibiotika dalje se ispituju nekom od metoda za identifikaciju i kvantifikaciju rezidua. Ovakva ispitivanja nije moguće izvršiti u mlekari, već se pozitivni i sumnjivi uzorci šalju u ovlašćenu laboratoriju. U laboratoriji se za identifikaciju mogu koristiti imunološki, enzimski, receptor-vezujući ili modifikovani mikrobiološki testovi inhibicije. Za kvantifikaciju rezidua se koriste hromatografske metode.

Kriterijumi za izbor skrining metoda koje bi bile uključene u sistematsku kontrolu rezidua su senzitivnost, specifičnost, brzina dobijanja rezultata, jednostavnost postupka i međusobna saglasnost dobijenih rezultata. Cilj rada je da se primenom različitih skrining metoda uporedno ispita prisustvo rezidua antibiotika u uzorcima mleka iz različitih faza proizvodnog lanca (od sirovine do gotovog proizvoda). Izabrane su tri skrining metode koje se najčešće koriste u praksi. Mikrobiološke inhibitorne metode: Delvo SP test i difuziona metoda sa *B. stearothermophilus* (difuziona metoda) i enzimska metoda Penzim S test.

MATERIJAL I METODE RADA

Materijal. Ispitano je 20 uzoraka mleka iz sabirnih tankova sa farme, 20 uzoraka mleka sa linija (mleko iz transportnih cisterni sa linija dovoza) u mle-

kari, 10 uzoraka pasterizovanog mleka i 10 uzoraka sterilizovanog mleka iz prometa.

Metode. Dokazivanje rezidua antibiotika difuzionom metodom rađeno je postupkom po Galeslootu i Hassingu [6]. Metoda je modifikovana u smislu povećanja temperature inkubacije sa 55°C na 63°C. Delvo SP test i Penzim S test su izvođeni prema proizvođačkoj specifikaciji. Proizvođač Delvo SP testa je Gist-Brocades N.V. Delft, Holandija, a Penzim S testa je UCB-Bioproducts S.A., Belgija.

Statističke metode. Saglasnost testova je poređena pomoću kappa vrednosti [7]. Kappa vrednost se kreće u intervalu od 0 (podudarnost je jednaka onoj koja bi se očekivala pri slučajnoj podudarnosti testova) do 1 (potpuna podudarnost). Uobičajeno se uzima da je idealna ako je vrednost kappa > 0,81, skoro idealna podudarnost 0,61 – 0,80, prilična podudarnost 0,41 – 0,60, srednja podudarnost 0,21 – 0,40, beznačajna podudarnost 0,00 – 0,20 i nema podudarnosti 0,00.

REZULTATI I DISKUSIJA

Uporednim ispitivanjima uzoraka mleka ustanovljena je visoka međusobna podudarnost među testovima (tabele 1, 2 i 3).

Tabela 1: Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka sirovog mleka iz tanka sa farme Delvo SP testom, Penzim S testom i difuzionom metodom

Naziv testa		Difuziona metoda		Penzim S test	
		Pozit.	Negat.	Pozit.	Negat.
Delvo SP test	Pozit.	5	1	5	1
	Negat.	1	13	1	13
Penzim S test	Pozit.	5	1	/	/
	Negat.	1	13	/	/

U sirovom mleku iz tanka sa farme, izvršenim ispitivanjima je ustanovljeno 30% pozitivnih uzoraka na svakom od testova. Sva tri testa u međusobnoj saglasnosti imaju kappa vrednost od 0,76 (interval skoro idealne podudarnosti). Visoku međusobnu podudarnost ova tri testa prilikom ispitivanja mleka iz tanka sa farme su ustanovili i drugi autori [8].

Tabela 2: Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka sirovog mleka sa linija Delvo SP testom, Penzim S testom i difuzionom metodom

Naziv testa		Difuzionna metoda		Penzim S test	
		Pozit.	Negat.	Pozit.	Negat.
Delvo SP test	Pozit.	3	0	3	0
	Negat.	1	16	0	17
Penzim S test	Pozit.	3	0	/	/
	Negat.	1	16	/	/

Ispitivanjem sirovog mleka iz transportnih cisterni sa linija dovoza u mlekari ustanovljeno je Delvo SP testom i Penzim S testom 15% pozitivnih uzoraka, dok je difuzionom metodom ustanovljeno 20% pozitivnih uzoraka. Penzim S i Delvo SP test imaju istu kappa vrednost pema difuzionoj metodi, ova vrednost iznosi 0,83 (interval idealne podudarnosti). Kappa vrednost sa-glasnosti Penzim S testa i Delvo SP testa je takođe idealna (kappa je 1,00).

Tabela 3: Rezultati uporednog ispitivanja uzoraka pasterizovanog i sterilizovanog mleka Delvo SP testom, Penzim S testom i difuzionim testom

Naziv testa		Difuzionna metoda		Penzim S test	
		Pozit.	Negat.	Pozit.	Negat.
Delvo SP test	Pozit.	3	1	3	1
	Negat.	0	16	1	15
Penzim S test	Pozit.	3	1	/	/
	Negat.	0	16	/	/

Ispitivanjem pasterizovanog i sterilizovanog mleka ustanovljeno je 20% pozitivnih uzoraka Penzim S testom i difuzionom metodom, dok je Delvo SP testom ustanovljeno 25% pozitivnih uzoraka. Difuzionna metoda se prema oba testa nalazi u intervalu idealne podudarnosti (kappa je 0,83), dok se Delvo SP test sa Penzim S testom nalazi u intervalu skoro idealne podudarnosti (kappa je 0,69).

Razlike koje se javljaju prilikom ispitivanja istog uzorka različitim metoda nastaju zbog različite osetljivosti ovih metoda. Delvo SP test je osetljiv prema antibioticima, sulfonamidima, dezinficijensima i abnormalnom mleku

(mleku u kom se nalaze laktoferin, laktoperoksidaza i lizocim). Difuziona metoda je osetljiva prema antibioticima dok je Penzim S test osetljiv samo prema beta laktamskim antibioticima. Visoka podudarnost Penzim S testa sa ostala dva testa ide u prilog navodima drugih autora [9, 10] po kojima su beta laktamski antibiotici najčešća vrsta rezidua koja se može naći u mleku. Razlike u rezultatima takođe mogu nastati i zbog razlika u pragu detekcije prema istim antibioticima, tako je prema ceftiofuru najosetljiviji Delvo SP test jer detektuje količine od 50 µg/kg, difuzioni test 75 µg/kg, a Penzim S test 80 µg/kg [11].

Visok procenat gotovih proizvoda (pasterizovano i sterilizovano mleko) koji sadrže rezidue antibiotika, nameće potrebu za poboljšanjem kontrole rezidua antibiotika. Sistematska kontrola podrazumeva uzorkovanje mleka iz svakog tanka na farmi prilikom redovnog postupka prikupljanja. Za sistematska ispitivanja dobro je koristiti Delvo SP test jer je osetljiv i prema različitim grupama antibiotika i prema sulfonamidima. Ukoliko se želi utvrditi vrsta rezidua koja je prisutna u mleku mogu se ponoviti ispitivanja Penzim S testom, zato što je velika verovatnoća da su prisutne rezidue beta laktamskih antibiotika koje ovaj test može dokazati. Ukoliko bi se u sistematskoj kontroli rezidua koristio samo Penzim S test bilo bi moguće ispitati veliki broj uzoraka u kratkom vremenskom intervalu svega za 25 minuta, međutim postoji verovatnoća da u su u mleku prisutne rezidue drugih antibiotika ne samo beta laktamskih tako da bi ovim testom bio dobijen lažno negativan rezultat. Sistematskim ispitivanjem uzoraka mleka koji su ušli u sastav jedne linije otkupa može se doći do konkretne farme koja je dovela do kontaminiranja mleka sa cele linije otkupa. Mleko koje je pozitivno na bilo kom od skrining testova mora biti isključeno iz proizvodnje i neškodljivo uklonjeno.

Ispitivanje mleka iz prometa se vrši u ovlašćenim laboratorijama. Za ova ispitivanja najbolje je koristiti difuzioni test ili Delvo SP test jer mogu da detektuju široki spektar rezidua [12]. Svi uzorci mleka u kojima je skrining testom ustanovljeno prisustvo rezidua mogu se poslati u ovlašćenu laboratoriju za potvrdu rezultata gde bi se daljim testovima za identifikaciju i kvantifikaciju verifikovalo prisustvo (vrsta i količina) rezidua. Na taj način se pouzdano dokazuje prisustvo rezidue i mogu se argumentovano preduzeti odgovarajuće mere za neodgovorne proizvođače i prerađivače mleka.

ZAKLJUČAK

Uporednim ispitivanjima difuzione metode, Delvo SP testa i Penzim S testa ustanovljeno je da su sve tri metode u dobroj međusobnoj saglasnosti (kappa vrednost se kreće od skoro idealne do idealne podudarnosti) čime ispunjavaju jedan od kriterijuma za uključivanje u sistematsku kontrolu mleka na prisu-

stvo rezidua. Izvršenim ispitivanjima je ustanovljen visok procenat uzoraka mleka koje sadrži rezidue antibiotika (15-30%). Poboljšanjem kontrole mleka obezbedilo bi se mleko koje ne utiče na zdravlje potrošača i smanjile bi se štete koje nastaju pri preradi mleka u proizvode.

LITERATURA

1. Codex Alimentarius, Vol. three Food and Agriculture Organisation of the United Nations, WHO. Rome 1993.
2. Dewdney J.M., Maes L., Raynaud J.P., Blanc F., Scheid J.P., Jackson T., Lens S., Verschuere C, *Food Chem Toxicol* 1991, Jul; 29(7):477-83.
3. Corpet D.E., Lumeau S., Corpet F., *Antimicrob Agents Chemoter* 1989, Apr; 33(4): 535-40.
4. Corpet D.E., *Vet. Hum. Toxicol.* 1993; 35 Suppl 1: 37-46.
5. Mijačević Z., Bulajić S., Zbornik radova, Zlatibor, 78-85, 2000,
6. Miljković V., Šipka M.: Metode pregleda mleka i mlečnih proizvoda, Beograd: Naučna knjiga, 1975.
7. Valčić M., Opšta epizootiologija. Beogradu: Fakultet veterinarske medicine, 1998.
8. Seymour E.H., Jones G.M., McGilliard M.L. *J Dairy Sci* 1988, Feb; 71(2):539-44.
9. Heeschen W. I Suchren G. Proceedings from Symposium on residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. Kiel, Germany, 1995. 107-114.
10. Long T. Master of Science - thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Publikation no 98. Uppsala 1999.
11. FDA memorandum M-a-85, revision 1, September 1994.-12.
12. Petrović J., Magistarska teza. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2001.

Primljeno: 25.11.2011.

Odobreno: 20.12.2011.

Originalni rad

UDK 619:618.14:636.1

PRIMENA CITOLOŠKIH BRISEVA U DIJAGNOSTICI ENDOMETRITISA KOBILA

Miroslav Urošević¹, Dragica Stojanović², Aleksandar
Milovanović², Ivan Pušić², Nenad Stojanac³

¹Poljoprivredna škola sa domom učenika Futog, Futog

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

³Poljoprivredni Fakultet, Novi Sad

Kratak sadržaj

Dijagnostika oboljenja materice i kontrola plodnosti obuhvataju klinička, bakteriološka, citološka i patohistološka ispitivanja. Bakteriološka istraživanja bi trebalo pratiti i sa citološkim i patohistološkim ispitivanjima, zbog toga što je prisustvo zapaljenskog procesa najznačajnije za dijagnozu i prognozu. Iako za interpretaciju rezultata citološkog pregleda endometrija nema standardne metode, pregled citoloških briseva sa površine sluznice uterusa jednostavna i neinvazivna dopunska metoda u pregledu kobila, i preporučuje se i u rutinskoj veterinarskoj praksi u našoj zemlji, pre svega za dijagnostiku endometritisa.

Ključne reči: kobila, materica, bris, citologija

CYTOLOGY SWABS USED FOR THE DIAGNOSIS OF ENDOMETRITIS IN THE MARE

Miroslav Urošević^{2*1}, Dragica Stojanović², Aleksandar
Milovanović², Ivan Pušić², Nenad Stojanac³

¹*Agricultural School with students' dormitory, Futog*

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

³Faculty of Agriculture, Novi Sad

Summary

Diagnostics of the uterus and fertility control include clinical, bacteriological, cytological and histopathological examinations. Bacteriological studies should be accompanied by cytological and pathological

¹ E mail: uros_vet@yahoo.de

tests, because the presence of inflammatory processes is the most important for diagnosis and prognosis. Although, there is no standard method for the interpretation of cytological examination results for endometrium, the examination of cytologic swabs from the surface of the uterine mucosal surface is a simple and noninvasive method used as a supplementary examination in mares. In our country this method is recommended in veterinary practice, primarily for the diagnosis of endometritis.

Key words: mare, uterus, smear, cytology

UVOD

Endometritis

Plodnost kobila je uslovljena genetskim i paragenetski faktorima. Heritabilitet, odnosno udeo plodnosti koji se nasleđuje je nizak i iznosi 5-10%, a kod kasačkih kobila i do 20%. Relativno malu plodnost kobila uslovljava čitav niz faktora, kao što su greške u pripustu, dug estrus, razna patomorfološka stanja: hipofunkcija jajnika, endometritisi, tihi estrus, ovarijalne ciste, kao i nepridržavanje zoohigijenskih normativa: starost, slaba i deficitarna ishrana težak rad, greške u držanju, nedovoljna higijena, endoparazitoze i dr.

Oboljenja materične sluzokože - endometritisi su čest uzrok povraćanja i steriliteta. Više autora (Küst i Schätz, 1983; Petrujkić i sar., 1996) su saglasni da su hronični endometritisi, posle ovarijalnih cista i disfunkcija jajnika, najčešći uzroci neplodnosti, u 20-25% kobila. U SAD je endometritis jedan od tri najčešća medicinska problema u odraslih konja. Prema novijim istraživanjima (Aurich, 2009) zapaljenje materice kobila može se, u zavisnosti od etiologije i patogeneze, podeliti na:

- polno prenosiva oboljenja (obligatno patogeni uzročnici)
- hronični – infektivni endometritisi (uslovno patogeni uzročnici)
- perzistirajući endometritis nakon parenja, odnosno osemenjavanja (engl. *post breeding endometritis*).

Klinička slika endometritisa

Kliničke karakteristike ispoljavaju se u vidu: izrazito crvene zažarene i vlažne sluzokože; u prednjem delu vagine nađe se manja ili veća količina patološkog sekreta, zavisno od stepena i karaktera endometritisa. Cerviks je mlitav, sluzokoža je vlažna i upaljena i iz njega ponekad ističe mukopurulentan sekret. U velikom broju slučajeva radi se o hroničnom – perzistirajućem endometritisu koji se može dokazati citološkim pregledom razmaza iz cerviksa.

MATERIJAL I METODE

Dijagnostika endometritisa

Dijagnostika oboljenja materice i kontrola plodnosti obuhvataju klinička (ultrazvučna), bakteriološka, citološka i patohistološka ispitivanja. Bakteriološka istraživanja bi trebalo propratiti i sa citološkim i patohistološkim ispitivanjima, zbog toga što je prisustvo zapaljenskog procesa najznačajnije za dijagnozu i prognozu (Belz i Glatzel, 1995; Card, 2005). Pojedini kliničari smatraju da rezultati bakterioloških ispitivanja ne mogu pravilno da se tumače bez citoloških nalaza (Langoni i sar., 1997).

Negnojni, neeksudativni endometritis (*endometritis sicca*) je klinički neprimetan i često bakteriološki negativan, te ga je zbog toga teško dijagnostikovati. Ovaj oblik traje dugo, često je uzrok steriliteta i nađen je u 15% jalovih kobilica. Bakteriološkim pregledom sekreta materice mogu se izolovati: *Chlamydia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Candida spp.* i dr.

Citološki pregled endometrijuma

Citološki pregled razmaza napravljenih od briseva materice uveden je u veterinarsku praksu još 1980. godine kao tehnika koja će zajedno sa bakteriološkim pregledom upotpuniti dijagnostiku endometritisa kod kobilica na početku estrusa. Brook (1985), Wingfield Digby i Ricketts (1982) opisali su citološki pregled endometrijalnih razmaza kao brz, jednostavan i praktičan test za dokazivanje endometritisa.

Prva istraživanja pokazala su pozitivnu korelaciju između prisustva polimorfonuklearnih neutrofilnih granulocita (PMN) u citološkim uzorcima i izolacije bakterija, kada je za uzimanje uzoraka korišćen bris za uterus zaštićen u plastičnoj foliji. Postupak uzimanja briseva za citološke preglede je opisan u ogledu od strane Bourke i sar. (1997) upoređivanjem dve metode uzorkovanja: pomoću pamučnog brisa i četkice. Istakli su da je preduslov za dobijanje kvalitetnih citoloških rezultata sakupljanje dovoljnog broja dobro očuvanih ćelija sa što šire površine uterusa. Ogleđ je urađen na 13 kobilica, a uzorci su uzeti pomoću pamučnih briseva, a zatim i četkicama, koje su bile zaštićene pri ulasku u polne organe. Nakon uvođenja u cerviks, u oba slučaja su prvo iz folije izvučene „radne“ površine, a zatim okretanjem štapića, na njih „prilepljenje“ ćelije sluzokože uterusa, što je trajalo oko 15 sekundi. Sledilo je vraćanje briseva, odnosno četkica, u zaštitni omotač i izvlačenje iz reproduktivnih organa. Pamučni bris, odnosno četkica, je nakon toga pažljivo prevučen preko mikroskopske pločice u cilju pravljenja citološkog razmaza, zatim osušen, fiksiran i

obojen *Wrights* bojom. Razmazi su posmatrani pod uvećanjem od 100x i 600x. Autori su zaključili da je upotreba četkica bolja od pamučnih briseva, zato što se sakupi veći broj ćelija sa endometrijuma i one morfološki nisu promenjene.

Tumačenje citološkog nalaza

Dascanio i sar. (1997) su u svom istraživanju detaljno opisali postupak i tumačenje citološkog pregleda uterusa. Oni navode da neki praktičari ne upotrebljavaju citološki pregled uterusa u rutinskom radu, jer imaju poteškoća sa primenom metode i interpretacijom dobijenih rezultata. Prema ovim autorima, prvi korak u evaluaciji citološkog razmaza je odrediti opštu zastupljenost ćelija u uzorku pod malim uvećanjem (10x). Zastupljenost ćelija može se podeliti u 4 kategorije: loša, osrednja, dobra i odlična. Kada je prisutan mali broj ćelija u uzorku, može doći do smanjenja broja prisutnih neutrofila, ako se gleda pri velikom uvećanju (400x). To može, onog ko pregleda, da dovede u zabludu da nije prisutan zapaljenski proces, iako zapravo on postoji. Stepen zapaljenja kvantitativno se izražava brojanjem prisutnih ćelija na određenom broju vidnih polja pri uvećanju mikroskopa od 400x. U svakom slučaju, ako je broj ćelija u uzorku mali, to može dovesti do pogrešnog tumačenja rezultata (Slika 1), jer, u takvom uzorku bi trebalo da bude manje od 1 do 2 neutrofila na pet vidnih polja pod uvećanjem od 400x. Drugi istraživači su imali kriterijum sa više od pet neutrofila na 10 vidnih polja pri velikom uvećanju mikroskopa, da bi se takav nalaz svrstao u zapaljenski proces. Infekcije endometrijuma sa *Pseudomonas aeruginosa* bi mogle biti izuzetak u odnosu na spomenute kriterijume, jer su moguće i površinske infekcije sa malim brojem neutrofila. Ako je broj ćelija u uzorku manji od 10, trebalo bi sagledati i odnos različitih tipova ćelija. U odnosu na uzorak za koji se smatra da je iz zapaljenskog procesa, odnos ćelija endometrijuma prema neutrofilima trebalo bi da je manji od 40:1. Prisustvo limfocita, makrofaga ili plazmocita obično ukazuje na hroničan proces, mada se makrofagi mogu ponekad naći na završetku akutnog procesa.

Jednom kada se odrede tipovi ćelija i njihov relativan broj, treba proceniti stepen njihovog oštećenja. Obično se endometrijalne ćelije i neutrofilu dele na one u dobrom stanju („sveže”) i druge u procesu degeneracije (Slika 2). Degenerativne promene mogu da obuhvataju celu ćeliju ili njenje delove a ispoljavaju se u vidu promena u stanju ćelijske membrane, hipersegmentacije jedra, stvaranja vakuola, kapljica ili inkluzija, pojačanog bojenja citoplazme i bubrenja ćelije. Na kontaminiranim uzorcima obično se vide bakterije postavljene ekstracelularno sa malim brojem neutrofila.

U Tabeli 1 su navedeni tipovi ćelija, koji se mogu naći pri citološkoj analizi, njihovo poreklo i značaj. Konačno tumačenje citološkog nalaza endometrijuma se zasniva na evaluaciji spomenutih kriterijuma, sa uzorcima koji nalaz svr-

stavaju u jednu od dve kategorije: fiziološki ili zapaljenski. U fiziološke uzorke spadaju oni sa zdravim ćelijama endometrijuma i veoma retkim neutrofilima. U kategoriji zapaljenja broj neutrofila je definisan po sledećim kriterijumima.

Tabela 1: Tipovi ćelija i debrisa koje se mogu videti na citološkom pregledu uterusa

Tip ćelija	Poreklo	Značaj
ćelije endometrijuma	žlezde sluzokože ili lumena endometrijuma	Fiziološki
neutrofili	endometrijum	ukazuje na akutnu fazu zapaljenja
eozinofili	endometrijum	ukazuje na pneumometru (insuflaciju vazduha)
makrofagi	endometrijum	ukazuje na hronično zapaljenje ili regresiju akutnog zapaljenja
limfociti/plazmociti	endometrijum	ukazuje na hronično zapaljenje
eritrociti	endometrijum	uzorci iz postpartalnog perioda ili usled traume kod uzimanja uzoraka
skvamozne/pločaste epitelne ćelije	cerviks	prisutne kao rezultat greška pri uzimanju uzoraka
skvamozne ćelije	vagina	prisutne kao rezultat greška pri uzimanju uzoraka
siderofagi (makrofagi sa nakupljenim hemosiderinom)	endometrijum	postpartalni period ili moguće kod pneumometre
kristali urina	urin	moguće unos urina, kao rezultat grešaka pri uzimanju uzoraka

Grupa ćelija u zaplajenskom procesu se obično deli još na akutnu i hroničnu, u zavisnosti od tipova ćelija koji su prisutni. Ako su prisutne degenerativne ćelije, u većini slučajeva je prisutan hronični proces ili je akutni proces pri kraju. Treba uzeti u obzir i negativan bakteriološki nalaz, u sledećim slučajevima: u prisustvu endometritisa; kada su u uterusu prisutne antimikrobne supstance; usled iritacije neinfektivne prirode; zbog pogrešne tehnike izolacije ili rasta specifičnih mikroorganizama (kao što su, na primer, anaerobne bakterije).

Sa druge strane, pozitivan bakteriološki nalaz može da prati negativan citološki rezultat, posebno tokom estrusa kada bakterije iz vagine mogu povremeno da se izoluju i iz uterusa. U pojedinim slučajevima oba nalaza mogu

biti negativna (i mikrobiološki i citološki), posebno na početku infekcije. Tada se preporučuje ponavljanje citološkog razmaza nakon nekoliko dana, kako bi se ispitao uspeh terapije (kao odgovor na tretman). Uz to, citološki pregled omogućuje veterinaru da uvede terapiju pre nego što dobije rezultate mikrobiološkog ispitivanja, što u većini slučajeva traje najmanje 3 dana. Od posebnog značaja je korišćenje citološkog pregleda kod kobilica namenjenih za priplod. Za konačnu odluku da li je kobila spremna za priplod, trebalo bi uzeti u obzir negativan citološki pregled pre nego negativan mikrobiološki nalaz, pošto bakterije mogu biti prisutne i kod zdravih kobilica. Kobile koje su pre toga (1-2 dana) bile pripuštene ili oždrebljene (7-10 dana) mogu povremeno imati povećan broj neutrofila.

Riddle i sar. (2005) su sprovedi obimnu studiju u centralnom delu države Kentaki (Kentucky, SAD) kako bi ispitali odnos između procenta ždrebljenja i citološkog i bakteriološkog pregleda uterusa u uzgoju punokrvnih engleskih konja. Uopšte, u uzgoju punokrvnjaka u centralnom delu države Kentaki, propisi zahtevaju da sve juvenilne kobile i omice pre prve oplodnje (pripusta) imaju negativan bakteriološki nalaz brisa uterusa. U ovom istraživanju, citološki i bakteriološki uzorci brisevi sa uterusa uzeti su od 970 punokrvnih engleskih kobilica tokom sezona pripusta u periodu od 2001. do 2004. Na svakoj pločici je pregledano najmanje po 10 vidnih polja. Nalazi su analizirani na sledeći način: normalan citološki nalaz; prisutne epitelne ćelije i nula do 1 neutrofil pri uveličanju 100x; blago izražena inflamacija, epitelne ćelije i 2 do 5 neutrofila pri uveličanju 100x; izražena inflamacija, epitelne ćelije i više od 5 neutrofila pri uveličanju 100x; i hipocelularni uzorak, bez epitelnih ćelija na pločici. Od 2123 pregledanih parnih uzoraka za citološki i bakterioloških pregled 1537 (72,4%) je bilo normalno (0 do 2 neutrofila ili bez izolovanih bakterija). Utvrđeno je da 79 uzoraka nema dovoljan broj ćelija za pregled i nisu uključeni u definitivnu analizu rezultata istraživanja. Blaga do izražena inflamacija konstatovana je na 423 citološka nalaza, pri čemu su iz 231 uzoraka brisa uterusa izolovane bakterije. U ovoj retrospektivnoj studiji za dijagnostiku su korišćeni rezultati kako citološkog, tako i bakteriološkog pregleda uterusa, zato što je procenat ždrebnosti smanjen u kobilica koje su imale zapaljenje materice.

Autori su konstatovali da je skoro dvostruko više kobilica (1,8 puta) sa patološkim poremećajima dijagnostikovano citološkim pregledom nego bakteriološkim metodama. Zaključili su da se citološkim pregledom uterusa mnogo brže identifikuju kobile sa endometritisom nego bakteriološkim pregledom zato što se uzorci obrađuju i analiziraju istog dana kada su i uzeti od strane zaposlenih u laboratoriji ili u veterinarskim ambulancama.

Da je za dijagnozu endometritisa potrebno uraditi bakteriološka i citološka ispitivanja potvrđuju u novijim izveštajima i autori iz Kanade (Brito i Barth, 2003). Oni navode da dijagnoza endometritisa mora biti bazirana na prisustvu

zapaljenja. Objašnjavaju da se endometritis može javiti i u odsustvu infekcije uterusa i da izolacija bakterija iz uterusa ne mora da znači i prisustvo endometritisa. Međutim, ako se ne izoluju bakterije, ne isključuje se dijagnoza endometritisa. Treba uzeti u obzir i anamnestičke podatke odnosno istoriju bolesti i predisponirajuće faktore: starost i broj ždrebljenja. Autori ukazuju da citološki pregled predstavlja jednostavnu, brzu i neinvazivnu metodu za utvrđivanje zdravstvenog statusa endometrijuma. Brisevi se nanose na mikroskopske pločice, razmazi se osuše, a zatim fiksiraju metanolom i oboje hematološkim bojama (Giemsa). U razmazu briseva iz uterusa prisustvo neutrofila je znak zapaljenja, što je ujedno i definitivna potvrda endometritisa. Svakako, uz više praktičnog iskustva moguće je razlikovati fiziološki od patološkog razmaza iz uterusa i bez brojanja svih ćelija. Od pomoći može biti bojenje po Gram-u kako bi odredili kojoj grupi bakterija pripada (Gram + ili Gram -) i time izabrali antibiotsku terapiju pre dobijanja rezultata bakteriološkog pregleda. I drugi istraživači su ukazali na značaj citološkog pregleda briseva materice.

I u našoj zemlji su rađena ispitivanja cervikalnih briseva endometrijuma od strane Urošević i sar. (2010). Oni su u ogledu na 51 priplodnih kobila koristili specijalne dvostruko zaštićene biseve - „čerkice“ za citološka ispitivanja („MINITUBE GmbH“, Tiefenbach, Nemačka). Uzimanje uzoraka sa sluznice materice urađeno je je tako što je zaštićen bris je pomoću sterilnog spekulum ili digitalno uveden kroz cerviks u unutrašnjost (lumen) uterusa. Bris je otkriven u unutrašnjosti materice kako bi onemogućili kontaminaciju uzoraka. Kad je izvučen iz polnih organa kobile, napravljen je razmaz endometrijuma za citološki pregled (Slika 3).

Na kraju, važno je naglasiti da za interpretaciju rezultata citološkog pregleda endometrijuma nema standardne metode. Ipak, može se zaključiti da je pregled citoloških briseva sa površine sluznice uterusa jednostavna i neinvazivna dopunska metoda u pregledu kobila, i trebalo bi da se primenjuje i u rutinskoj veterinarskoj praksi u našoj zemlji, u cilju procene zapaljenskih procesa na endometrijumu.

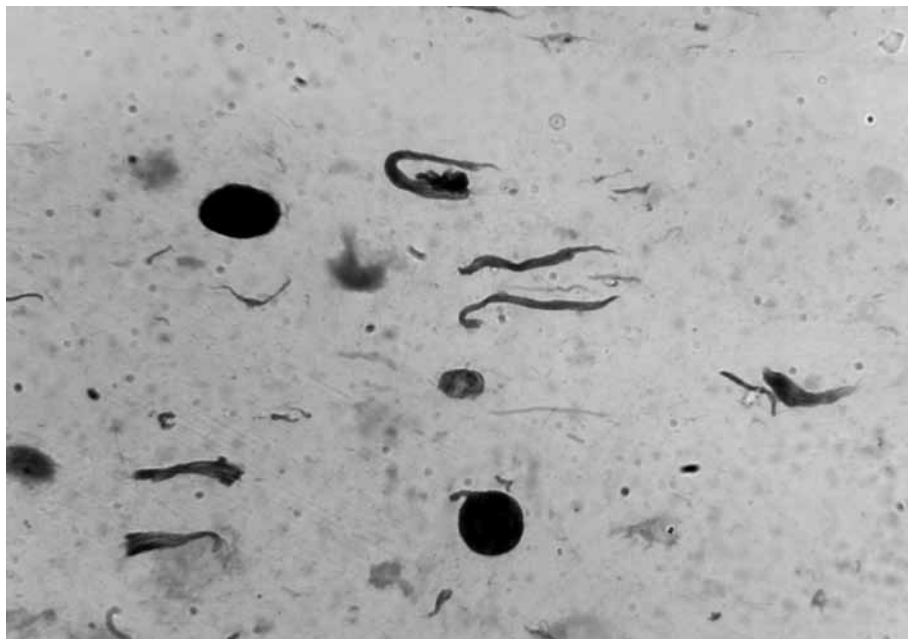
LITERATURA

1. Aurich Ch.: Reproduktionsmedizin beim Pferd. Gynäkologie – Andrologie – Geburtshilfe. Stuttgart: Parey Verlag, 2009.
2. Bourke M., Mills J.N., Barnes A.L.: Collection of endometrial cells in the mare. *Aust. Vet. J.*, 75, 10, 755 - 758, 1997.
3. Belz J.P., Glatzel P.S.: Fertility in mares after a disturbed as well as an undisturbed puerperium. Significance of histological and cytological examinations of the uterus. *Tierärztl. Prax.*, 23, 267 - 272, 1995.

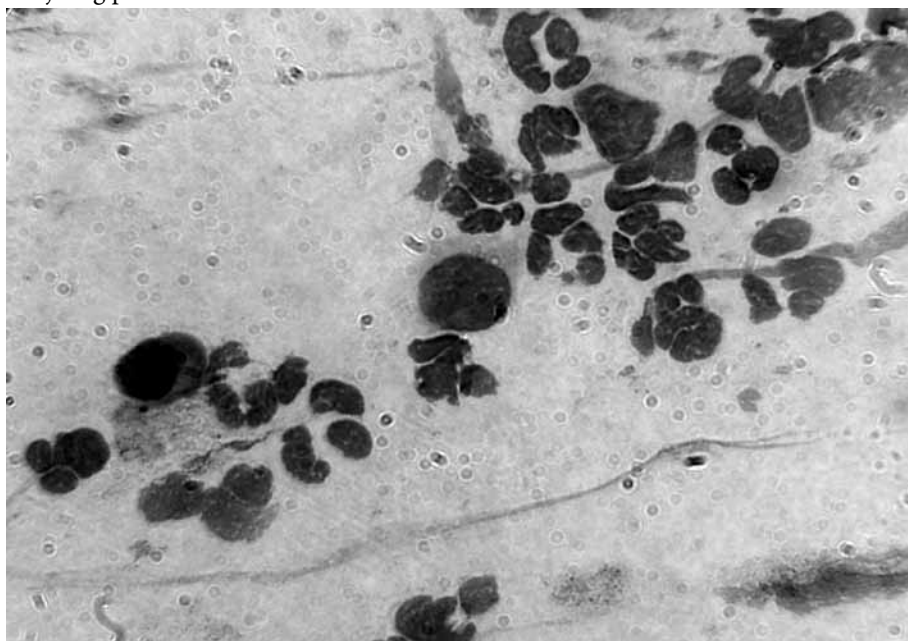
4. Brito L.F.C., Barth A.D.: Endometritis in Mares, *Large Animal Veterinary Rounds*, 9, 3, 2003.
5. Brook D.: Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium. *Equine Vet. Sci.*, 5, 16-22, 1985.
6. Card C.: Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares, *Theriogenology*, **64**, 580-588, 2005.
7. Dascanio J., Ley B., Bowen J. M.: How to Perform and Interpret Uterine Cytology, *AAEP Proceedings*, 43, 182 - 186, 1997.
8. Küst D., Schätz F.: Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren, Jena 1971.
9. Knudsen O.: Partial dilatation of the uterus as a cause of sterility in the mare. *Cornell Vet.*, 54, 423 - 438, 1964.
10. Laing I. A.: Fertility and Infertility the Domestic Animals. Sec. edition, London, 1970.
11. Langoni H., Alvarenga M.A., Papa A.F.O., Sakamoto S., Baldini S., Listoni F.J.P.: Aerobic, microaerobic and anaerobic bacteria in equine endometritis. *Pferdeheilkunde*, 13, 548, 1997.
12. Petrujkić, T., Miljković, V., Mrvošić, G., Vuković, D., Veselinović, S., Trivicki, G., Bojkovski, J., Popović, N., Ivkov, V., Radojčić, S.: Stanje reprodukcije konja u Jugoslaviji i utvrđivanje priplodne sposobnosti. U: Program razvoja konjarstva Jugoslavije, SPITJ, Zobnatica, 1996.
13. Ulgen M., Seyrek-Intas K., Misirliogly D., Seyrek-Intas D., Kocabiyik A.L., Sevimli A.: Importance of reproductive management on fertility of Mares in Turkey. *Revue Med. Vet.*, 154, 5, 345 - 350, 2003.
14. Wingfield Digby N.J., Ricketts S.W.: Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 32, 181 - 185, 1982.
15. Riddle W.T., Leblanc M.M., Pierce S.W., Stromberg A.T. (2005): Relationships between pregnancy rates, uterine cytology, and culture results in a thoroughbred practice in Central Kentucky. *Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 51-54.
16. 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

Primljeno: 15.11.2011.
Odobreno: 20.12.2011.

Prilozi:



Slika 1. Primer citološkog razmaza endometrijuma bez ćelija sa površine materice, obojenog po *Giems*-i



Slika 2. Primer polimorfonuklearnih neutrofilnih granulocita (PMN) na citološkom razmazu ćelija sa površine materice, obojenog po *Giems*-i



Slika 3. Pravljenje citološkog razmaza na pločici sa četkice iz uzetog cervikalnog brisa

UTICAJ IZGLEDA ORIFICUM PAPILLAE NA DEBLJINU STRATUM CORNEUM-A DUCTUS PAPILLARIS-A VIMENA KRAVA

Ivana Davidov¹, Miodrag Radinović¹, Dragica Stojanović², Mihajlo Erdeljan¹

¹Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

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

Kratak sadržaj

Izgled i očuvanost završetka papile - *ostium seu orificum papillae*, tj. otvora sisnog kanala, je važan faktor u sprečavanju prodora uzročnika mastitisa u unutrašnjost vimena krava. Oboljenja vimena su kompleksne prirode i ubrajaju se među najskuplje bolesti mlečnih krava. Od krava holštajn-frizijske rase koje su iz različitih etioloških razloga isključene iz proizvodnje, posle klanja uzimali smo vimena u cilju praćenja promena na otvoru sisnog kanala i u stratum corneum-u sisnog kanala vimena krava. Nakon makroskopskog pregleda vimena, uzeti su vrhovi papila radi dobijanja podataka o debljini stratum corneum-a sisnog kanala. Radi dobijanja rezultata, urađena je histološka analiza uzoraka. Debljina stratum corneum-a u 104 pregledana sisna kanala je varirala od 90 do 370 µm, a od 104 pregledana otvora sisnog kanala vimena krava, 73 je imalo nepoželjan oblik. Takođe smo uočili da kod nepoželjnih oblika otvora sisnog kanala dolazi do pojave tankog sloja stratum corneum-a sisnog kanala. Ovi rezultati ukazuju da očuvanost otvora sisnog kanala vimena krava ima veliki uticaj na stratum corneum sisnog kanala.

Ključne reči: orificum papillae, ductus papillaris, vime, krava

¹E-mail: ivanadav@polj.uns.ac.rs

Rad je rezultat istraživanja na projektu finansiran od Ministarstva prosvete i nauke RS, TR 31071.

RELATIONSHIP BETWEEN ORIFICUM PAPILLAE AND STRATUM CORNEUM OF DUCTUS PAPILLARIS IN COWS UDDER

Ivana Davidov¹, Miodrag Radinović¹, Dragica Stojanović², Mihajlo Eredljan¹

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

²Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad

Abstract

The appearance and preservation of the teat end - *ostium seu orificum papillae*, is an important factor in preventing the penetration of mastitis agents into the udders of cow. The diseases of cow udder are of complex nature and are among the most expensive diseases in dairy cows. We took the udder of holstein-friesian cows that were excluded from production for different etiologic reasons, in order to monitor changes in the orificum papillae and stratum corneum ductus papillaris. After macroscopic examination of the udder, the teat end of papillae were examined to obtain information on the thickness of stratum corneum ductus papillaris. A histological analysis was conducted and the results were obtained. The thickness of the stratum corneum ductus papillaris in 104 samples varied from 90 to 370 microns, and of 104 examined orificum papillae, 73 had an undesirable shape. It was also observed that in the undesirable forms of orificum papillae a thin layer of stratum corneum ductus papillaris was formed. These results indicate that preservation of orificum papillae of cow udder has a large impact on the stratum corneum ductus papillaris.

Key words: orificum papillae, ductus papillaris, udder, cow

UVOD

Sisni kanal je vrlo snažna, važna i primarna barijera koja sprečava prodor uzročnika mastitisa u unutrašnjost vimena. U pauzi između dve muže, glatki kružni mišić - *musculus sphincter*, koji obmotava sisni kanal, polako se kontrahuje, pri čemu približava stratum corneum jedne i druge strane i tako onemogućava prodor bakterijama u lumen kanala (Paulrud, 2005, Davidov i sar., 2011). Izgled, a samim tim i očuvanost završetka papile - *ostium seu orificum papillae*, tj. otvora sisnog kanala, je važan faktor u sprečavanju prodora uzročnika mastitisa u unutrašnjost vimena krava. Promenom izgleda sisnog kanala, a pogotovo njegovog stratum corneum-a, dolazi do slabljenja prve linije odbrane i do prodora mikroorganizama u parenhim vimena krava (Davidov i sar., 2011,

Davidov, 2010, Paulrud, 2005, Boboš i Vidić, 2005). Promene u sisnom kanalu nastaju već posle treće laktacije (Boboš i Vidić, 2005) i dovode do promene i u debljini keratinskog sloja sisnog kanala tj. stratum corneum-a (Davidov i sar., 2011, Davidov, 2010, Paulrud, 2005). Takođe na izgled i funkciju sisnog kanala utiče otvor sisnog kanala (Avdić i sar., 2008). Lezije koje se mogu javiti na otvoru sisnog kanala predstavljaju potencijalni izvor infekcije, čak i za dublje partije vimena (Neijenhuis i sar., 2000). Seykora i McDaniel (1985) su ukazali da na broj somatskih ćelija mleka krava utiču lezije otvora sisnog kanala, koje ujedno uslovljavaju i promenu izgleda otvora sisnog kanala vimena. Takođe, Farnsworth (1995) je uočio da otvor sisnog kanala na kome su prisutne erozije, povećava incidencu intramamarnih infekcija. Usled povezanosti između izgleda orificum papillae i zdravlja vimena krava, izgled vrha papile uvršten je među ključne faktore odbrane vimena krava od prodora uzročnika mastitisa (Neijenhuis i sar., 2000). Nepravilna muža, neadekvatni aparati za mužu i drugi mnogobrojni faktori koji utiču direktno na izgled otvora sisnog kanala, uslovljavaju promenu i na stratum corneum-u sisnog kanala. Uklanjanjem keratina tj. stratum corneum-a iz sisnog kanala, lako dolazi do pojave patomorfoloških promena u parenhimu vimena krava. Miller i sar. (1992) su ispitivali da li se komponente keratina razlikuju između mlečnih žlezda sa i bez infekcije. Takođe su poredili i količinu keratina prisutnu u vimenima sa kliničkim i subkliničkim mastitisom i u neinficiranim mlečnim žlezdama. Zaključili su da ne postoji razlika u komponentama keratina između subkliničkih mastitisa i neinficiranih mlečnih žlezda, i da je količina ketarina neznatno bila manja kod subkliničkih mastitisa u odnosu na neinficirane mlečne žlezde.

Ako mikroorganizmi prođu prvu liniju odbrane - sisni kanal, 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).

Istraživanje je imalo za cilj da utvrdi, uticaj izgleda otvor sisnog kanala na debljinu stratum corneum-a sisnog kanala vimena krava.

MATERIJAL I METOD

Od 26 krava holštajn-frizijske rase koje su iz različitih etioloških razloga isključene iz proizvodnje, uzeta su vimena u cilju praćenja promena na otvoru sisnog kanala i stratum corneum-u sisnog kanala vimena krava. Posle klanja sa

trupa krava su oštrim mesarskim nožem odstranjena vimena, koja su pakovana u sterilne plastične vreće i zatim su transportovana u laboratoriju za patologiju na dalja ispitivanja. Nakon makroskopskog pregleda vimena, uzeti su vrhovi papila radi dobijanja podataka o debljini stratum corneuma-a sisnog kanala, 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 bojani 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

Otvor sisnog kanala kao prva prepreka prodoru mikroorganizama u unutrašnjost vimena, treba da bude gladak i ravan, i tada se smatra da je to njegov poželjan oblik (Slika 1). Hiperkeratoza (Slika 2), lezije (Slika 3) ili erozije na orificum papillae, su nepoželjne pojave.

Nakon makroskopskog pregleda 104 otvora sisnog kanala, ustanovljeno je da je samo 31 (29,81%) otvor sisnog kanala imao poželjan oblik, a da je 44 (42,31%) papilla imalo na otvoru sisnog kanala hiperkeratične promene (Tabela 1).

Tabela 1. Rezultati izgleda otvora sisnog kanala vimena krava

otvor sisnog kanala	bez promena	hyperkeratosis	lesiae	UKUPNO
broj	31	44	29	104
%	29,81	42,31	27,88	100



Slika 1. Poželjan oblik otvora sisnog kanala vimena krave.



Slika 2. Hyperkeratosis na otvoru sisnog kanala vimena krave.



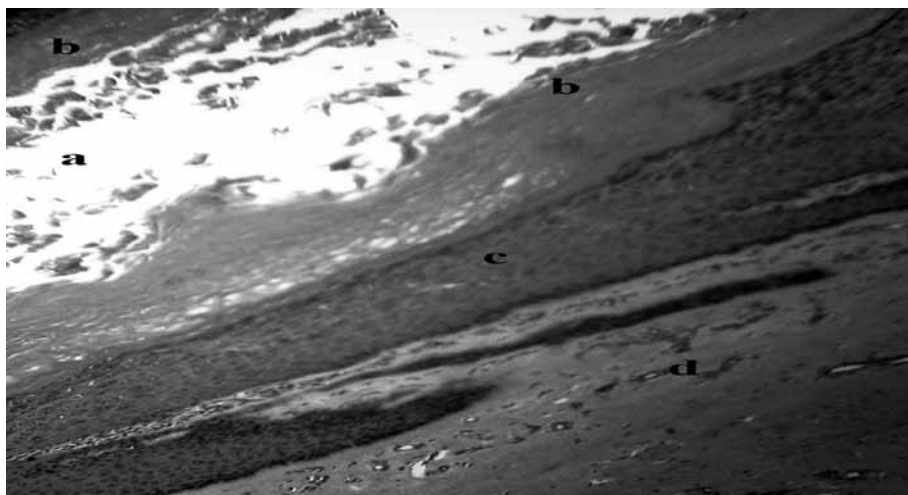
Slika 3. Lezije na otvoru sisnog kanala vimena krave.

Ustanovljena debljina stratum corneum-a u 104 pregledana ductus papillaris-a varirala je od 90 do 370 μm , što odogovara nalazima i drugih autora (Davidov i sar., 2011, 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 2, Slika 2).

Tabela 2. Rezultati merenje debljine stratum corneum-a u sisnog kanala vimena krava

debljina stratum corneum-a	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
UKUPNO	104	100



Slika 2. Sisni kanal: a) lumen kanala, b) stratum corneum, c) stratum epithelialis, d) stratum muscularis

Debljina stratum corneum-a sisnog kanala od 0 do 100 μm uslovljava pojavu patohistoloških promena u parenhimu vimena krava (Davidov i sar., 2011, Davidov, 2010, Paulrud, 2005, Neijenhuis i sar., 2000).

Zbog moguće veze između izgleda otvora sisnog kanala i zdravlja vimena krava, izgled vrha papile predstavlja jedan od ključnih faktora odbrane vimena krava od prodora uzročnika mastitsa (Neijenhuis i sar., 2000), što je zapaženo i tokom ovog istraživanja.

ZAKLJUČAK

Dobijeni rezultati ukazuju da postoje variranja u debljini stratum corneum-a ductus papillaris-a i da je na ta variranja imao uticaj izgled orificum papillae vimena krava. Što je stratum corneum ductus papillaris-a bio tanji, to su bile veće hiperkeratoze, lezije ili erozije na orificum papillae vimena krava. Na osnovu sprovedenog ispitivanja, može se zaključiti da postoji značajna povezanost, kao anatomska tako i funkcionalna između stratum corneum-a ductus papillaris-a i orificum papillae 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 institute za veterinarstvo, 2005.

3. Davidov I.: Značaj dužine i debljine ductus papillaris-a na pojavu patomorfoloških promena vimena krava. Magistarska teza, 2010.
4. Davidov I., Radinović M., Stojanović D.: Uticaj stratum corneum-a ductus papillaris-a na očuvanost parenhima vimena krava. *Arhiv veterinarske medicine*, Vol. 4 (1), 3-10, 2011.
5. Farnsworth R.J.: Observations on teat lesions. In: Minnesota Dairy Health Conf., University of Minnesota, Minneapolis, MN, 28-33, 1995.
6. 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* Vol. 75, 1436-1442, 1992.
7. Neijnhuis F., Barkema, H.W., Hogeveen H. and Noordhizent, J.P.T.M.: Classification and longitudinal examination of callused teat ends in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83, 2795-2804, 2000.
8. Paulrud C.O.: Basic Concept of the Teat Canal. *Veterinary Research Communication*, 29, 215-245, 2005.
9. Seykora, A.J. and McDaniel B.T.: Heribilities of teat traits and their relationships with milk yield, somatic cell count and two percent milk. *J. Dairy Sci.* 68, 2670-2683, 1985.
10. Shearer J. K. and Harris B.: Mastitis in dairy cow. *J. Anim. Sci.* 22, 1-6, 2003.

Primljeno: 25.10.2011.

Odobreno: 20.12.2011.

Pregledni rad

UDK 619:616-073:618.2-07

ULTRAZVUČNA DIJAGNOSTIKA GRAVIDITETA KOD GOVEDA

Mihajlo Erdeljan, Ivan Stančić, Ivana Davidov, Miodrag Radinović
Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad

Kratak sadržaj

Jedan od najvažnijih zadataka koji se postavlja pred svakog praktičara koji se bavi reprodukcijom je dijagnostika graviditeta. Cilj rada je da se ukaže na osnove ultrazvučne dijagnostike. Akcenat je dat na neke momente koji su bitni za dijagnostiku pre svega ranog graviditeta, čija dijagnostika je i najvažnija. Takođe u radu je ukazano na osnovne pokazatelje koje treba pratiti prilikom postavljanja dijagnoze i na moguće greške prilikom dijagnoze. Na kraju su date mogućnosti korišćenja ultrazvučnih aparata za neke nove postupke u reprodukciji krava.

Ključne reči: ultrazvuk, graviditet, goveda

ULTRASOUND DIAGNOSIS OF PREGNANCY IN CATTLE

Mihajlo Erdeljan, Ivan Stančić, Ivana Davidov, Miodrag Radinović
Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine, Novi Sad

Abstracts

One of the major tasks of every practitioner who deals with reproduction is the diagnosis of pregnancy. The aim of this paper is to present the basics of ultrasound diagnosis. The emphasis is given to some elements which are essential for the diagnosis of early pregnancy, whose diagnosis is most important. Also, in the paper are pointed out main indicators that are to be monitored in the diagnosis and possible errors. At the end, the possibilities of using an ultrasound for some new procedures in the reproduction of cows are given.

Key word: ultrasound, pregnancy, cattle

UVOD

Jedan od najvažnijih faktora koji utiču na uspešnost u animalnoj proizvodnji je reproduktivna efikasnost. Na samu reprodukciju utiču mnogobrojni faktori, kako genetski tako i paragenetski. Postoje mnogobrojni tehničko-tehnološki postupci koji se koriste u proizvodnji a utiču na reproduktivnu efikasnost u stadu.

Mera koja treba da utvrdi kakav je rezultat nastojanja da se dobije zdravo potomstvo je dijagnostika graviditeta, odnosno otkrivanje bremenitosti. Ovaj postupak predstavlja evaluaciju predhodnog rada i postavlja nove ciljeve pred praktičara, odnosno ukoliko je životinja gravidna, praktičar je dobro obavio svoj posao i imaće pozitivne rezultate, ali ako osemenjavanje nije bilo uspešno potrebno je životinju ponovo uvesti u reproduktivni ciklus. Ova mera se može smatrati jednom od najvažnijih jer može drastično smanjiti broj praznih hranidbenih dana. Postoji više kliničkih, odnosno laboratorijskih metoda koje se mogu koristiti za utvrđivanje uspešnosti uspostavljanja graviditeta. Da bi neki test bio adekvatan za primenu u dijagnostici graviditeta potrebno je da, pre svega, bude neškodljiv za majku i plod, da poseduje visoku tačnost, da bude jednostavan za upotrebu sa što manjim uticajem rukovaoca i da bude ekonomski opravdan. Dijagnoza se može postaviti pregledom i to spoljašnjim i unutrašnjim. Spoljašnji pregled može se obaviti adspekcijom i palpacijom, s tim što je mana ovih metoda relativna nepouzdanost i to što se mogu koristiti tek u kasnijem graviditetu, što je kod krava tek sa oko 6 meseci graviditeta. Unutrašnji pregled može biti rektalni i vaginalni. Rektalni pregled se smatra jednom od najpouzdanijih i najsigurnijih metoda u dijagnostici graviditeta, može se koristiti već od 45 dana steonosti, pouzdan je i jeftin. Vaginalni pregled ima manji značaj jer je manje pouzdan i zahteva sterilne instrumente.

Laboratorijski dijagnostički testovi najčešće zahtevaju specijalnu tehničku opremljenost, obuku rukovoca i obično je potrebno određeno vreme za isčitavanje rezultata, što svakako u svakodnevnom radu u farmskim uslovima može predstavljati veliki problem. Laboratorijski testovi koji se primenjuju predstavljaju ispitivanje polnih hormona u različitim uzorcima telesnih tečnosti a to se, pre svega, odnosi na određivanje koncentracije progesterona preko RIA ili ELISA metoda, odnosno glukoproteina povezanih sa graviditetom (Prvanović i sar., 2009). Zbog ovoga postoje pokušaji razvoja što bržih, jednostavnijih i pouzdanijih testova koji se mogu koristiti u farmskim uslovima.

Iako postoje mnogobrojne metode za dijagnostiku steonosti u našoj praksi uglavnom koristi samo jedna, a to je transrektalna manualna palpacija. Izvežbani praktičar može pouzdano odrediti da li je životinja gravidna sa 35 do 40 dana od osemenjavanja, ali se mnogi veterinari odlučuju da pregledaju krave

u kasnijoj fazi sa 50 do 60 dana posle osemenjavanja da bi bili što sigurniji u postavljanju dijagnoze.

Uvođenjem rutinskog pregleda ultrazvukom ostvaruje se cilj skraćivanja vreme čekanja od osemenjavanja do postavljanja pouzdane dijagnostike na steonost. Ukoliko se utvrdi da krava nije gravidna ultrazvučnim pregledmo se može i dijagnostikovati i određeno patološko stanje zbog kojeg nije došlo do uspostavljanja graviditeta kao što su ciste na jajnicima, endometritis cataralis itd. Skraćenje perioda koji je potreban da bi se dobio pouzdani rezultat kod krava koje nisu koncipirale znači i skraćenje međutelidbenog intervala koji je na našim farmama veoma visok. Na taj način pregled na steonost se smatra veoma značajnom za profitabilnost u govedarskoj proizvodnji (DesCôteaux i sar., 2002).

Cilj primene bilo kojeg od ovih testova je da se odredi da li je životinja gravidna ili ne i to što je tačnije moguće, odnosno potrebno je da taj test bude 100% tačan. Svaka greška u dijagnostici košta proizvođača bez obzira kakva je greška je napravljena, bilo da je gravidna životinja proglašena negravidnom ili obrnuto. Govedarska proizvodnja je kontinuirana tokom cele godine, sa blažim oscilacijama, zahvaljujući tome što je njihova polna aktivnost ciklična tokom cele godine. Iako krave nisu reproduktivno vezane za sezonu parenja potrebno je što više skratiti broj praznih dana i time povećati ekonomsku isplativost proizvodnje. Stoga se i nastoji da se što pre po osemenjavanju odredi reproduktivni status životinje, odnosno da se što pre odredi da li je životinja gravidna ili ne.

TEHNIČKI ASPEKTI DIJAGNOSTIKE

Počeci ultrazvučne dijagnostike su vezani za rane osamdesete godine dvadesetog veka i vezani su za dijagnostiku steonosti kod krava (Durocher i sar., 2002; Ginther, 1998; Pierson i Ginther, 1988; Sirois i Fortune, 1988). Ultrazvuk omogućava opisivanje struktura koje su veće od 1 mm u prečniku (Durocher i sar., 2002).

Prvi uređaji su davali samo zvučni signal, dok se danas koriste uređaji sa ekranom koji daju veliki broj mogućnosti za dijagnostiku i to ne samo za dijagnostiku organa reproduktivnog trakta. Sa ovakvim aparatima moguće je postaviti tačnu dijagnozu graviditeta kod krava sa oko 25 dana steonosti.

Važno je shvatiti da slika na ekranu ultrazvučnog aparata predstavlja presek dela organa i možemo reći da je to, u stvari, histološki rez na malom uvećanju. Sonda, dakle, simulira presek nožem. Ultrasonografija tako predstavlja spljoštenu dvodimenzionalnu sliku fino sečenog dela tkiva.

Ultrazvučne slike su brzo obnovljaju, kako se sonda kreće kroz tkivo. Brz pregled tkiva daje utisak da se strukture kreću kao u crtanom filmu. Da bi se mogla pravilno tumačiti dobijena slika neophodno je poznavanje topografske anatomije posmatranih organa.

Sonde predstavljaju najvažniju i najkrhkiju komponentu ultrazvučnog aparata. U veterinarskoj praksi se koriste sonde obično koje imaju frekvenciju od 3,5, 5,0 ili 7,5 MHz. Postoje dve vrste sondi: linearne i sektorske. Linearne sonde se koriste za transrektalni ultrazvučni pregled jajnika i materice. Ova sonda je skup reda kristala koji su elektronski izabrani tako da formiraju pravougaone slike. Linearne sonde pruža dobru rezoluciju za tkiva koja se nalaze u blizini sonde. Sektorske sonde imaju jedan ili više kristala čiji položaj proizvodi slike u obliku kriške pite. Prednost sektorske sonda je u tome što ne zahteva veliku površinu kontakta, i to što skenira veću ukupnu površinu. Nedostatak je to što su vidno polje i bočne rezolucija (to jest sposobnost sistema da napravi razliku između dva susedna objekta) vrlo ograničeni u blizini sonde. Detalji sadržani u slici ultrazvuka odnosno slike (rezolucija), kao i dubina tkiva koja se može posmatrati, zavise od frekvencije i fokusiranja zraka za skeniranje. Uz manju frekvenciju, penetracija tkiva će biti dublja, a rezolucija će biti niža. Veća učestalost (frekvencija) omogućava bolju rezoluciju, ali zrak neće prodrati u tkivo tako duboko.

U zavisnosti od svoje gustine različita tkiva i delovi tkiva daju karakteristični eho. S toga možemo reći da kosti daju najveći eho, odnosno na ekranu se predstavljaju belom bojom, a tečnosti su anehogene, jer zraci prolaze kroz tečnosti i ne vraćaju se u sondu tako da one na ekranu daju crnu boju.

TUMAČENJE ULTRAZVUČNE SLIKE

Postavljanje dijagnoze svodi se na posmatranje određenih znakova, odnosno na osnovu slike na ekranu. Ti znaci su svakako različiti u zavisnosti od faze graviditeta ali se svode na uočavanje samog ploda i plodovih voda. Ukoliko se neki od ovih znakova uoči, možemo sa sigurnošću reći da je životinja gravidna. Ultrazvučni pregled na graviditet kod krava može se uspešno izvesti od dvadesetpetog dana (Hanzen i Delsaux, 1987). Slika koja se može uočiti sa 25 je, u stvari, plod u obliku slova "C". Plod je tada još uvek veoma mali, dimenzija oko 2 mm pa treba biti oprezan u donošenju konačne dijagnoze. U tom periodu, pa do 30 dana, može biti teško lociranje embriona zbog male količine tečnosti oko embriona (Kastelic i sar., 1988). Takođe rani embrioni se mogu naći veoma blizu zida uterusu ili sakriveni u uterusnim kriptama pa ih je teško locirati.

Na slikama su prikazani gravidni uterusi sa plodovima različite starosti:



Slika 1. Graviditetni mešak sa 36 dana od osemenjavanja.



Slika 2. Graviditetni mešak sa 46 dana od osemenjavanja.



Slika 3. Graviditetni mešak sa 66 dana od osemenjavanja



Slika 4. Tri meseca graviditeta, uočava se placentom i jedna noga sa papcima

Prilikom dijagnostike ranog graviditeta može se uočiti u lumenu materice promjenljiva količina anehogene tečnost koja je nastala tokom razvitka embriona. Naravno, količina tečnosti zavisi od stadijumu graviditeta. Prilikom odlučivanja da li je životinja gravidna ili ne treba obratiti pažnju na to da je moguće da između 25. i 27. dana od osemenjavanja ima veoma malo nakupljene tečnosti u materici, pa se može dati pogrešna dijagnoza (DesCoteaux i sar., 2006). U svakom slučaju prilikom dijagnostike ranog graviditeta treba biti veoma pažljiv kako u davanju dijagnoze tako i u samom izvođenju dijagnostičkog postupka. Poznato je da je rani embrionalni mortalitet jako izražen, odnosno da je najveći broj uginuća upravo u embrionalnoj fazi graviditeta, a nešto je manji u periodu između dvadesetsedmog i devedesetog dana graviditeta i u tom periodu iznosi od 6-20% (Filteau i DesCoteaux, 1998). Stoga neki autori ne preporučuju ultrazvučnu dijagnostiku pre dvadesetsedmog dana (DesCoteaux i sar., 2006).

Kada prođe 30 dana od osemenjavanja može se sa većom sigurnošću uočiti plod kod steonih krava. Tada je količina tečnosti dovoljna da se može vizuelno razdvojiti embrion od nabora sluzokože materice jer se embrion pomera ka centru anehogene zone. U to vreme se može otkriti i ehogeni pojas oko embriona. Taj ehogeni pojas predstavlja, u stvari, amnion i najbolje se uočava između 30 i 60 dana graviditeta (Kastelic i sar., 1988). Počevši od četrdesetog dana, lako se mogu videti počeci razvoja prednjih i zadnjih ekstremiteta.

Prvi placentoni su veličine oko 0,5 cm i mogu se uočiti 35 dana od osemenjavanja a nalaze se blizu embriona. Kada je fetus star oko 60 dana, placentomi su veličine oko 2 cm i mogu se naći na velikoj površini u gravidnom materičnom rogu.

Kod savremenijih ultrazvučnih aparata moguće je izmeriti dužinu embrio-

na i na osnovu toga proceniti njegovu starosti, gde se najčešće koristi rastojanje između vrha glave i sapi ploda, tako na primer kod starosti od 30 do 35 dana dužina embriona je između 1 i 1,5 cm, kod 40 dana dužina je između 2 i 2,5 cm, sa 50 dana fetus je dug oko 4 cm i sa 60 dana fetus je dug oko 8 cm (DesCoteaux i sar., 2006).

Osim osnovne dijagnostike graviditeta primenom ultrazvuka u ovom smislu mogu se dijagnostikovati i drugi nalazi. Pre svega se misli na određivanje pola ploda, prisustva blizanačkog graviditeta i fetalnih anomalija.

ZAKLJUČAK

Primenom ultrazvuka u svakodnevnoj praksi veterinari koji su manje iskusni u transrektalnim pregledima mogu da poboljšaju svoje umeće i spretnost brže nego drugi, istovremeno nudeći tržištu preciznije i šire dijagnostičke usluge. Naravno, i za upotrebu ultrazvuka u svakodnevnoj praksi potrebna su određena znanja i veštine. Osim u reproduktivne svrhe ultrazvučni aparat se može koristiti i u druge dijagnostičke svrhe. Na kraju, upotreba ultrazvuka predstavlja finansijsku pogodnost u govedarskoj proizvodnji na velikim farmama isto kao i veterinarima u privatnoj praksi. Sa druge strane pojava ultrazvuka je omogućila ogroman naučni napredak u razumevanju osnovnih reproduktivnih procesa. Cilj ovog rada je da se ukaže na neke osnovne principe ultrasonografije i mogućnosti njenog korišćenja reprodukciji goveda.

LITERATURA

1. DesCôteaux L., Carrière P.D., Durocher J.: Évaluation échographique du tractus reproducteur bovin: Diagnostic précoce de gestation, géméllité, mortalité embryonnaire et anomalies de l'utérus. *Méd Vét du Québec*, 32, 123-127, 2002.
2. DesCoteaux L., Carriere P., Durocher J.: Ultrasonography of the reproductive system of the cow: basic principles, practical uses and economic aspects of this diagnostic tool in dairy production, In: World Buiatrics Congress, Nice, France, 2006.
3. Durocher J., DesCôteaux L., Carrière P.D.: Évaluation échographique du tractus reproducteur bovin : Détermination du sexe du foetus. *Méd Vét du Québec*, 32, 132-134, 2002.
4. Durocher J., Morin N., Blondin P.: Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology*, 65, 102-115, 2006.

5. Filteau V., DesCôteaux L.: Valeur prédictive de l'utilisation de l'appareil échographique pour le diagnostic précoce de la gestation chez la vache laitière. *Méd Vét Québec*, 28, 81-85, 1998
6. Ginther O.J.: Follicles. In: Ultrasonic imaging and animal reproduction: Cattle. Equiservices Publishing. Cross Plains, WI, USA, 29-58, 1998
7. Hanzen C, Delsaux B.: Use of transrectal B-mode ultrasound in early pregnancy in cattle. *Vet Rec*, 121, 201-202, 1987
8. Kastelic J.P., Curran S., Pierson R.A., Ginther O.J.: Ultrasonic evaluation of bovine conceptus. *Theriogenology*, 29, 39-54, 1988
9. Pierson R.A., Ginther O.J.: Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, 29, 21-37, 1988
10. Prvanović N., Tomašković A., Grizelj J., Kočila P., Samardžija M.: Monitoring of early pregnancy and early embryonic mortality by ultrasound and determination of pregnancy-associated glycoproteins and progesterone in cows. *Veterinarski Arhiv* 79, 3, 259-267, 2009.
11. Sirois J, Fortune J.: Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by realtime ultrasonography. *Biol Reprod*, 39, 308-317, 1988

Primljeno: 15.11.2011.

Odobreno: 20.12.2011.

Stručni rad

UDK 619:618.19-002(497.11Braničevski okrug)'2002'

UČEŠĆE DIJAGNOSTIKOVANIH MASTITISA KRAVA U HIGIJENSKOJ ISPRAVNOSTI MLEKA BRANIČEVSKOG OKRUGA TOKOM 2002. GODINE

Dragan Rogožarski, Gordana Dimitrijević, I. Dobrosavljević
Veterinarski specijalistički institut, Požarevac

Kratak sadržaj

Proizvodnju kvalitetnog mleka sa dobrim biološkim karakteristikama može da obezbedi mlečna žlezda koja je u dobrom zdravstvenom stanju. U radu su prikazani rezultati ispitivanja zdravstvenog stanja mlečne žlezde krava muzara u Braničevskom okrugu. U bakteriološkoj izolaciji i identifikaciji uzročnika mastitisa upotrebljene su standardne bakteriološke metode. Raširenost infekcije mlečne žlezde na ispitivanom području je 2,14%. Najčešći uzročnik mastitisa je *Staphylococcus aureus*. U cilju dobre prevanije i lečenja mastitisa potrebno je preduzeti higijenske mere u toku muže, obezbediti ispravne uređaje, dobru ishranu i efikasnu terapiju u slučajevima oboljenja vimena.

Ključne reči: mastitis, *Staphylococcus aureus*

PARTICIPATION OF DIAGNOSED MASTITIS IN COWS IN MILK HYGIENE OF BRANICEVO DISTRICT IN 2002

Dragan Rogožarski, Gordana Dimitrijević, I. Dobrosavljević
Veterinary Specialist Institute of Pozarevac

Abstracts

Production of good quality milk with proper biological characteristics is provided from milk udder in good health condition. This paper presents the results of examining the mammary glands of dairy cows in Branicevo district.

Standard bacteriological methods were used for bacteriological isolation and identification of mastitis pathogens. The prevalence of mammary infection in the area was 2.14%. The most common cause of mastitis was *Staphylococcus aureus*. For proper prevention and treatment of mastitis, good hygiene measures should be undertaken during milking, ensuring

proper equipment, good nutrition and effective treatment in the cases of udder diseases.

Key words: mastitis, *Staphylococcus aureus*

UVOD

Mleko i proizvodi od mleka predstavljaju veoma značajne namirnice u ishrani ljudi i njihov udeo u potrošnji zavisi od navika u ishrani, zdravstvenog i ekonomskog stanja potrošača, životnog doba i dr. Na mikrobiološku ispravnost i kvalitet mleka i proizvoda od mleka u velikoj meri utiče higijenska ispravnost sirovog mleka. Proizvodnju kvalitetnog mleka sa dobrim biološkim karakteristikama može da obezbedi mlečna žlezda koja je u dobrom zdravstvenom stanju. Mlečna žlezda zahvaćena zapaljenjskim procesima stvara mleko promenjenog sastava. Mastitis goveda je najučestalije oboljenje koje se javlja u konvencionalnom gajenju mlečnih rasa goveda. Upalne promene mlečne žlezde najčešće izazivaju mikroorganizmi. Infekciju mlečne žlezde mogu izazvati specifični mikroorganizmi, kao patogeni prvog reda, i nespecifični mikroorganizmi, kao patogeni drugog reda. Infekcija najčešće nastaje galaktogeno. Predisponirajući faktori su vrlo značajni za nastanak infekcije i oni su vezani za higijenu, ishranu, traume, nepravilnu mužu, deformitete i sl.

Visoka incidenca mastitisa je u direktnoj vezi sa povećanom proizvodnjom mleka, koja je prethodnih decenija jednostranim selekcijskim zahvatima maksimalno favorizovana. Neumeren selekcijski pritisak i intenzivan način gajenja neminovno su doveli do slabljenja konstitucije grla, a samim tim i do pada otpornosti što je dovelo do velikih ekonomskih gubitaka. Godišnji ekonomski gubici koji su prouzrokovani od mastitisa se u Americi procenjuju na 1,7 milijardi dolara, a u Nemačkoj na oko jednu milijardu eura (Boboš i Vidić, 1999). Kod nas su štete koje su izračunate u vrednosti jednog teleta po kravi. Sem velikih materijalnih šteta pojava mastitisa nosi velike zdravstvene probleme. Sa aspekta zdravlja ljudi posebno je značajan *Stafilococcus aureus* kao potencijalni uzročnik alimentarnih intoksikacija jer može da stvara termotabilne endotoksine i dovede do pojave respiratornih i kožnih infekcija. Nekritička primena antibiotika za lečenje mastitisa, iako protokolarno regulisana ne daje zadovoljavajuće rezultate. Upotreba antibiotika povećava prevalencu rezistentnih bakterija u organizmu i ambijentu. Tako, prouzrokovajući mastitis *Staphylococcus aureus* i druge bakterije razvijaju rezistentne sojeve koji su otporni na antibiotike, što znači da se oni više ne mogu koristiti u terapiji. Kod krava inficiranih sa *Staphylococcus aureus* po istraživanjima iz Amerike (Petrović, 2008) smatra se da je svega 15% primenjenih antibiotika efikasno u lečenju. Prisustvo rezidua antibiotika u animalnim proizvodima ugrožava humanu populaciju, ometa tehnologiju prerade, kao što je slučaj u proizvodnji sireva i mlečnokiselinskih proizvoda. Šire posmatrano čitav

ekosistem je ugrožen. Ovo ukazuje na štetnost kontrole mastitisa nekritičkom primenom antibiotika u rutinskoj kontroli mastitisa. Dijagnostički postupak utvrđivanja mastitisa sastoji se iz kliničkog i mikrobiološkog pregleda. Upalni procesi u mlečnoj žlezdi mogu se lako prepoznati kod izražene kliničke slike i oni su prepoznatljivi od strane vlasnika. Šteta koja nastaje je jasno vidljiva i u takvim slučajevima vlasnik poziva veterinara koji propisuje protokol lečenja. Kod pojave subkliničkog mastitisa ne postoje klinički znaci i postojeći upalni procesi pruzrokuju štetu koja nije očigledna. Ovaj oblik mastitisa je teško ustanoviti bez pomoćnih metoda zasnovanih na otkrivanju povećanog broja somatskih ćelija. Na predlog Ministarstva poljoprivrede, donet je program mera zdravstvene zaštite u Republici Srbiji, kojim je propisano dijagnostičko ispitivanje radi blagovremenog praćenja, otkrivanja, suzbijanja i iskorenjivanja zapaljenja mlečne žlezde krava (Program mera 2002. godina).

CILJ RADA

U našem radu postavili smo zadatak da prikažemo zdravstveno stanje mlečne žlezde krava muzara Braničevskog okruga do kojeg smo došli sprovođenjem programa sistematskog praćenja, otkrivanja, suzbijanja i iskorenjivanja subkliničkih infektivnih mastitisa koji su izazvani *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae*. U ovom radu obradili smo podatke iz 2002. godine u kojoj su Veterinarski specijalistički institut «Požarevac» i veterinarske stanice sa teritorije Braničevskog okruga izvršile kontrolu zdravstvenog stanja vimena i dostavljali zbirne uzorke mleka. Istovremeno je izvršena kontrola mleka i mlečnih proizvoda u proizvodnji i prometu u saradnji sa Republičkom veterinarskom inspekcijom.

MATERIJAL I METOD RADA

Posle kontrole uzoraka mleka dostavljenog sa terena Kalifornija mastitis testom, izvršen je bakteriološki pregled 14 554 uzoraka sirovog mleka dostavljenih sa terena Braničevskog okruga. Mleko je aseptično uzorkovano od svih krava u laktaciji. Uzorci su do analize čuvani u stiroporskim kutijama u frižideru.

U bakteriološkoj izolaciji, determinaciji i identifikaciji uzročnika mastitisa upotrebljene su standardne bakteriološke metode dijagnostike (Miljković, Katić 1985; Živkov-Baloš i sar., 2008). Korišćen je krvni agar, Baird-Parker agar koagulaza, i bacitracinski test, a pojedini uzorci su podvrgavani i biohemijskoj identifikaciji.

Posle izolacije, a u cilju sprovođenja pravovremene i adekvatne terapije, izvršeno je ispitivanje otpornosti mikroorganizama prema određenim antibioticima i hemioterapepticima. Korišćen je disk metod izrade antibiograma na Müller Hintonovom krvnom agaru (Petrović, Katić, 2003). Izvršena su ispitivanja na: amoksicilin, tetraciklin, ampicilin, penicilin, tilozin, gentamicin i trimetoprim sulfametaksazol (Tabela 4).

REZULTATI ISPITIVANJA

Rezultate dobijene ispitivanjem izvršenim u toku 2002. godine prikazali smo tabelarno.

Tabela 1. Broj ispitivanih krava na mastitis po naseljima i dvorištima

Opština	Pregledano krava		
	Naseljena mesta	Broj dvorišta	Broj krava
Požarevac	22	1273	2454
Petrovac	33	1036	3904
Kučevo	22	860	1211
Žagubica	13	591	1145
Žabari	15	645	1352
Golubac	24	703	955
V.Gradište	26	1320	2212
M.Crniće	19	1039	1321
	174	7467	14554

Tabela 2.Broj i procenat pozitivnih reagenata na mastitis po opštinama

Opština	Pozitivno			%
	Broj naselja	Dvorišta	Krava	
Požarevac	19	42	50	2,03
Petrovac	17	45	61	1,56
Kučevo	15	30	33	2,72
Žagubica	9	43	50	4,36
Žabari	7	20	24	1,77
Golubac	10	21	22	2,3
V.Gradište	17	43	44	1,98
M.Crniće	12	27	28	2,11
Σ	106	271	312	2,14

Na ispitanom području ustanovljeno je prisutvo mastitisa kod 312 grla od pregledanih 14 554 uzoraka mleka. Najviše zaraženih grla je procentualno u opštini Žagubica, a najmanje u opštini Petrovac. Kod utvrđeni mastitisa izrađen je antibiogram (Tabela 4), dalje mere je preduzimala veterinarska služba na terenu. Po završenom tretmanu dostavljani su uzorci na ponovnu kontrolu do izlečenja.

Tabela 3 – Najčešći uzročnici mastitisa

Procentualni odnos zastupljenosti mikroorganizama kod pozitivnih nalaza				
<i>Staphylococcus Aureus</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Micrococcus spp.</i>	<i>Corynebact.</i>
31,2%	20 %	17,6%	29,6%	1,6%

Staphylococcus aureus je izolovan u 31,2% slučajeva. Kod 20% uzoraka izolovan je *Staphylococcus spp.* Ovaj mikroorganizam je uslovno patogen, ubikvitatan može se naći normalno na koži čoveka i životinja. Optimalna temperatura razmnožavanja je 37° C, a raste na temperaturi od 7 do 48°C. Oko 10% koagulaza pozitivnih stafilokoka bovinog porekla ima sposobnost da stvara enterotoksine. Literaturni podaci pokazuju da je 0,2-17,6% četvrti vimena inficirano sa *S. aureus* koji predstavlja najznačajniji uzročnik oboljenja vimena krava (Milanov i sar., 2010). Kontaminacija sirovog mleka nastaje direktno iz vimena ili indirektno tokom muže sa ruku mužača, kože vimena, opreme za mužu i slično. Prilikom prodora u vime on se naseljava u dublje slojeve epitela, gde dovodi do stvaranja mikroapsces nekroze, fistula, apostematoznog i u najtežim slučajevima gangrenoznog mastitisa. Prisustvo u zapatu dovodi do smanjenja proizvodnje mleka za 15% (Boboš i Vidić, 1999).

Odluku o sprovođenju terapije donosi vlasnik na preporuku veterinara. Intramamarna aplikacija se obično sprovodi kod srednje teških subkliničkih mastitisa i to kao jedini način primene ili u kombinaciji sa parenteralnom primenom antibiotika. Ovi lekovi su za intramamarnu primenu pripremljeni posebno i imaju specifičnu farmakokinetiku. Mogu se koristiti za lečenje u zasušenju i laktaciji (Petrović i sar., 2008).

Izradom antibiograma kod izolovanih *S.aureus* ustanovili smo najefikasnije antibakterijske supstance *in vitro* (Tabela 4).

Tabela 4. Osetljivost *S. aureusa* na antibiotike i hemoterapeutike na braničevskom okrugu

Naziv antibiotika	Osetljiv ++	Osetljiv +++
	Broj	Broj
Oksacilin	37	1
Spektin.-Linkomicin	10	31
Enrocin	37	2
Gentamicin	5	37
Penicilin - Streptomycin	19	11

U toku 2002. godine pregledano je 585 uzoraka proizvoda od mleka od čega je 550 bilo iz industrijske, a samo 35 iz zanatske proizvodnje. Koagulaza pozitivne staflokoke ustanovljene su kod 0,36 % industrijskih proizvoda i 2,85 % zanatskih proizvoda. Industrijska proizvodnja poseduje redovnu eksternu kontrolu pored interne kontrole u svojim laboratorijama. U zanatskoj proizvodnji proizvodnja je mala, kontrola minimalna, iako je prisutan veliki broj proizvođača. To povećava rizik od konzumacije neispravnih proizvoda koji se spravljaju od termički neobrađenog mleka i prisustva rezidua u mleku (Petrović, Katić 2003).

ZAKLJUČAK

Raširenost infekcije mlečne žlezde krava je u prihvatljivim granicama i kreće se u proseku 2,14% na teritoriji Braničevskog okruga. U cilju unapređenja stanja kao i prevenciji mastitisa potrebno je:

- obavezno sprovođenje higijene u staji i higijene muže;
- posebnu pažnju posvetiti pravilnom postupku muže;
- primeniti dezinfekciju posle muže;
- redovno pratiti zdravstvenog stanja mlečne žlezde krava čije se mleko stavlja u promet;
- efikasno sprovesti terapiju dijagnostikovanog uzročnika mastitisa korišćenjem antibiograma;
- pregledom proizvoda zanatske proizvodnje u prometu značajno bi se povećala bezbednost stanovništva od kupovine zdravstveno neispravnih namirnica. Ovi pregledi se nedovoljno rade jer su troškovi pregleda veliki i sitni mnogobrojni prodavci ne mogu da ih finansiraju. Institut je predložio izvršnim odborima Opština Braničevskog okruga da finansira analize namirnica sa lokalnih pijaca čime bi se znatno povećala bezbednost stanovništva od korišćenja zdravstveno neispravnih namirnica.

LITERATURA

1. Bobos S., Vidic B., Orlic, D., Bugarski, D.: Aktuelna problematika u zaštiti zdravlja prezivara i njen ogranicavajući efekat na proizvodnju mesa i mleka. *Savremena poljoprivreda* 1-2, 175-178, 1999.
2. Marković B.: Bolesti vimena domaćih životinja, Beograd: Naučna knjiga, 1980.
3. Milanov D., Lazić S., Vidić B., Petrović J., Bugarski D., Šeguljev Z.: Slime Production and Biofilm Forming Ability by *Staphylococcus Aureus* Bovine Mastitis Isolates. *Acta Veterinaria*, 60, 2-3, 217-226, 2010.
4. Miljković V., Katić V.: Priručnik laboratorijskih analiza mleka i proizvoda od mleka. Beograd: Univerzitet, 1985.
5. Petrović J., Katić V.: Uporedno ispitivanje rezidua antibiotika u mleku enzimskom i mikrobiološkim metodama. *Veterinarski glasnik*, 57, 1-2, 43-49, 2003.
6. Petrović J., Milanov D., Ratajac R.: Savremeni trendovi u bezbednosti hrane: Rezistencija zoonotskih patogena prema antimikrobnim lekovima. *Veterinarski glasnik*, 62 5-6, 257-406. 2008.
7. Savić M., Jovanović S., Trailović R., Dimitrijević V.: Kontrola mastitisa u organskom uzgoju goveda. U: Zbornik radova, Vrnjačka Banja, Beograd: Srpsko veterinarsko društvo 2001.
8. Stojanović L., Katić V.: Higijena mleka, Beograd: Naučna knjiga Beograd, 1998.
9. Živkov-Baloš M., Mihaljev M., Kovačević M., Bugarski D.: Ekskrecija aflo-toksina mlekom: rizik za potrošače. *Arhiv veterinarske medicine*, 1,1, 65-68, 2008.

Primljeno: 25.11.2011.

Odobreno: 20.12.2011.

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