

UDK 619

ISSN 1820-9955

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”
Novi Sad

Arhiv veterinarske medicine

Arh. vet. med.	vol. 3	br. 2	str. 1-72	Novi Sad, 2010.
----------------	--------	-------	-----------	-----------------

CIP – Каталогизација у публикацији
Библиотека Матице српске, Нови Сад

619

Arhiv veterinarske medicine / glavni i odgovorni urednik
Dragica Stojanović. – Vol. 3, br. 1 (2010) – . – Novi Sad :
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, 2008 –. – 25 cm

Dva puta godišnje.

ISBN 1820-9955

COBISS.SR-ID 235692807

MEHANIZMI POVEĆANE OTPORNOSTI BAKTERIJA U BIOFILMU NA ANTIBIOTIKE

Dubravka Milanov^{*1}, Nataša Čubrak², Jelena Petrović¹, Sava Lazić¹

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

²Veterinarska stanica “Av lave”, Kruševac

Kratak sadržaj

Jedna od glavnih prednosti života bakterija u biofilmu je povećana otpornost na biocide, uključujući i antibiotike i dezinficijense. Dok su biocidi 100% efikasni u destrukciji suspendovanih ćelija, oni nisu efektivni u uništavanju bakterijskih ćelija u biofilmu. Mehanizmi povećane rezistencije bakterija u biofilmu na antibiotike nisu razjašnjeni u potpunosti. Neki od sledećih faktora, sami ili u kombinaciji, razmatraju se kao odgovorni: smanjen prodor antibiotika u biofilm; smanjena brzina (vrednost) rasta bakterija u biofilmu; ekspresija mogućih gena rezistencije i povećana vrednost genetskog transfera. Standardni dilucionni test za određivanje minimalne baktericidne i minimalne inhibitorne koncentracije, nije aplikativan za biofilm rastuće bakterije. U novije vreme razvijene su različite aparature za određivanje minimalne biofilm eradikacione koncentracije (MBEC – *Minimal Biofilm Eradication Concentration*). Određivanje MBEC ima za cilj izbor efikasnih antibiotika za lečenje, identifikaciju meta u biofilmu za nove antibiotike i praćenje mogućeg budućeg razvoja rezistencije biofilma na antibiotike.

Ključne reči: biofilm, antibiotici, rezistencija.

MECHANISMS OF INCREASED RESISTANCE OF BACTERIA TO ANTIMICROBIALS IN BIOFILM

Dubravka Milanov, Nataša Čubrak, Jelena Petrović, Sava Lazić

Abstract

The most striking advantage of bacteria residing in biofilm is enhanced resistance to biocide including antibiotics and disinfectants. Biocides

^{*} E mail: dubravka@niv.ns.ac.rs

are 100% efficient in killing cells in suspension but there are not efficient in destroying bacteria from biofilm community. Mechanisms of increased resistance of bacteria in biofilm to antibiotics is not understood. Some factors alone or in combination are considered to be responsible such as restricted penetration of antibiotics into a biofilm, slow growth rate of biofilm cells, possible expression of certain resistance genes, increased rate of genetic transfer. The standard test for estimating the minimum bactericidal and minimum inhibitory concentration is not applicable for bacteria grown in biofilm. Nowadays, the apparatus for determination of Minimal Biofilm Eradication Concentration (MBEC) has been developed. Determining MBEC helps to select appropriate antibiotics for patient treatment, to identify new antimicrobials targeting biofilm and to track the possible future development of antibiotic resistance against biofilm drugs.

Key words: biofilm, antibiotics, resistance

Biofilm je strukturno i dinamički kompleksan biološki sistem koji prokariotski organizmi formiraju u prirodnom okruženju. U odnosu na planktonske ili slobodno suspendovane dvojnike, bakterije u biofilmu stiču niz prednosti. U biofilmovima su dostupne hranljive materije, a time se smanjuje potreba za pokretljivošću, štedi energija i produžava život bakterijama. Ekstracelularna polimerična supstancija (matriks, glikokaliks) usidrava za površinu vezane bakterije i kao trodimenzionalno polje okružuje bakterijske ćelije, sprečava isušivanje i obezbeđuje zaštitu stanovnika biofilma od pretnji kao što su biocidi, antibiotici, antitela, deterdženti, bakteriofagi ili predatori kao što su slobodno-živeće amebe i bela krvna zrnca. Kao integralni deo života prokariota, biofilm predstavlja i strategiju preživljavanja bakterija u organizmu ljudi i životinja. Sa stanovišta humane i veterinarske medicine, najvažnija prednost života u biofilmu je povećana otpornost bakterija na biocide, uključujući i antibiotike i dezinficijense. Bakterije u biofilmu pokazuju za 10-1000 puta veću rezistenciju na efekat antibiotika. Na primer, koncentracija vankomicina od 1 µg/ml je MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) za ćelije *S. aureus* u suspenziji, ali isti soj u biofilmu uspešno preživljava tretman sa 20 µg/ml vankomicina (Williams i sar., 1997). Ili, tretman biofilma *P. aeruginosa* sa imipenemom je bez efekta (MIC > 1024 µg/ml) dok su ćelije ove bakterije u tečnoj kulturi visoko osetljive na koncentraciju ovog leka od 1 µg/ml (Ceri i sar. 1999). Dok pencilin G, cloxacillin, ceftiofur i tetraciklin, baktericidno deluju u koncentraciji od 2 mg/mL na suspenziju *Arcanobacterium pyogenes*, minimalna biofilm eradikaciona koncentracija (MBEC) je viša od 1024 mg/mL (Olson i sar.,

2002). Pored toga, bakterije u biofilmu odlikuje izvanredna otpornost na komponente imunološkog sistema organizma domaćina, otpornost na baktericidni efekat dezinfekcionih sredstava i jona metala kao što su bakar i srebro (Mah i O'Toole, 2001; Donlan i Costerton, 2002).

Rezistencija se definiše kao sposobnost jednog mikroorganizma da raste u prisustvu povećanih koncentracija antimikrobnih sredstava. Prema ovom konvencionalnom kriterijumu, bakterijske ćelije u biofilmu ne pokazuju bezuslovno rezistenciju, tj. ne rastu bolje u odnosu na planktonske u prisustvu širokog spektra antimikrobnih sredstava. Većina eksperimenata o osetljivosti biofilma ispituje više efekat ubijanja, nego inhibiciju rasta. Tako saopštavana rezistencija u suštini opisuje jednu povećanu otpornost bakterija u biofilmu prema ubijanju ili povećanu sposobnost preživljavanja (Dunne, 2002). U radovima i revijama na temu rezistencije bakterijskih biofilмова moguće je naći listu faktora koji se razmatraju kao odgovorni (Costerton i sar., 1999; Lewis, 2001; Mah i O'Toole, 2001; Maira-Litran i sar., 2000). Oni uključuju smanjen prodor antimikrobnih sredstava u biofilm, smanjenu brzinu (vrednost) rasta bakterija u biofilmu, ekspresiju mogućih gena rezistencije i povećane vrednosti genetskog transfera. Sami ili u kombinaciji, ovi faktori su korisni u objašnjenju preživljavanja biofilma u jednom broju slučajeva.

Smanjen prodor antimikrobnih agenasa u biofilm: Ekstracelularna polimerična supstancija (matriks, glikokaliks) koja okružuje ćelije bakterija u biofilmu, redukuje prodor antibiotika i dezinficijensa do bakterija, fizički usporavajući njihovu difuziju ili stupajući u hemijsku reakciju sa njima. Matriks tako deluje u različitom stepenu kao difuziona barijera, molekularno sito ili adsorbent i veoma je efikasan u zaštiti biofilm ćelija od krupnih molekula kao što su komponente komplementa, lizocima ili ćelija kao što su leukociti. Međutim, za male molekule antimikrobnih sredstava, barijera biofilm matriksa može pre da odloži bakterijsku smrt, nego efikasno da je prevenira (Dunne, 2002). Usporena difuzija je korisna u sprezi sa drugim mehanizmima destrukcije antibiotika koji smanjuju njihovu koncentraciju u dubljim slojevima biofilma. Tako je matriks biofilma kao elektro-negativan veoma efektivan u zaštiti od pozitivno punjenih aminoglikozida, verovatno putem vezivanja. Takođe, usporena difuzija u kombinaciji sa degradacijom putem enzima, kao što su katalaza i β -lactamase, pruža efikasnu zaštitu biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* (Lewis, 2001). Konfokalnom skeniranjem laser mikroskopijom je dokazano da antibiotici mogu prodrati kroz matriks biofilma, ali teško dospevaju u prostor biofilm ćelija, zato što su one zbijene u grupe i mikrokolonije (Trachoo, 2003). Praktično, letalnim koncentracijama antibiotika izložene su samo bakterije u površinskim slojevima biofilma. Takođe je moguće da u dubljim slojevima biofilma deluju isti faktori koji nepovoljno utiču i na antimikrobnu aktivnost

in vitro. To se odnosi na pH vrednost, koncentraciju CO₂, O₂, dvovalentnih katjona, pirimidina i vode. U odnosu na slabiji prodor antibiotika, deficit kiseonika i slaba metabolička aktivnost bakterija u dubljim slojevima biofilma, u većoj meri utiču na toleranciju *P. aeruginosa* u biofilmu na ciprofloksacin i tobramicin (Walters i sar., 2003).

Smanjena vrednost rasta: Bakterije u biofilmu sporo rastu, slično suspendovanim bakterijama u stacionarnoj fazi. Prosečna stopa rasta *Klebsiella pneumoniae* u biofilmu je 0.032 h⁻¹, a u planktonskoj populaciji 0.59 h⁻¹ (Anderl i sar., 2003). Spor rast nesumnjivo doprinosi rezistenciji biofilma, kao što je spor rast planktonskih ćelija bakterija glavni faktor povećane otpornosti u stacionarnoj fazi rasta (Costerton, 1999). Visoka koncentracija ćelija u biofilmu indukuje proizvodnju rpoS proteina ili alternativno s-faktora, koji se uobičajeno javlja samo u stacionarnoj fazi rasta ćelija različitih mikroorganizama i koji kodira *rpoS* gen (Trachoo, 2003). To znači da smanjena vrednost rasta bakterija u biofilmu nije posledica oskudice u hranljivim materijama, već je to genetski regulisan proces i mehanizam adaptacije na život u biofilmu. Značaj usporenog rasta za fiziologiju biofilma dokazan je u studijama McLean i sar. (1997). Kod *Escherichia coli*, gubitak rpoS ima minimalni efekat na planktonsku populaciju, ali se biofilm populacija redukuje za 50-60% i oštećuje se struktura biofilma. Spor rast redukuje metaboličku aktivnost a time i osetljivost na antibiotike. U suštini, sva antimikrobna sredstva su efektivnija u ubijanju brzorastućih bakterija, a neki antibiotici (penicilin i ampicilin) imaju apsolutni zahtev da bakterija raste da bi mogli da je ubiju. Neki od naprednijih β-laktama, cefalosporina, aminoglikozida i fluorokvinolona mogu ubiti i nerastuće bakterije, ali su i oni efektivniji u ubijanju brzo-delećih bakterijskih ćelija.

Ekspresija za biofilm-specifičnih gena rezistencije: U suštini, ćelije bakterija u biofilmu nisu otpornije na inhibiciju rasta dejstvom antibiotika, tako da ne postoji realna potreba za dokazivanjem nekog specijalnog mehanizma rezistencije na lekove koji deluje samo u biofilmu (Lewis, 2001). *Multidrug resistance pumps* (MDR) igraju jednu ulogu u rezistenciji biofilma kod niskih koncentracija antibiotika i postoji razlog da se veruje da nepoznate MDR pumpe mogu da budu ispoljene u biofilmovima *P. aeruginosa* (Brooun i sar., 2000). Genetska ispitivanja ukazuju da je više gena ekspresionirano u biofilmu u odnosu na planktonsku populaciju i da ti *up*-regulisani geni uključuju *open reading frames* nepoznate funkcije (Pace i sar. 2006).

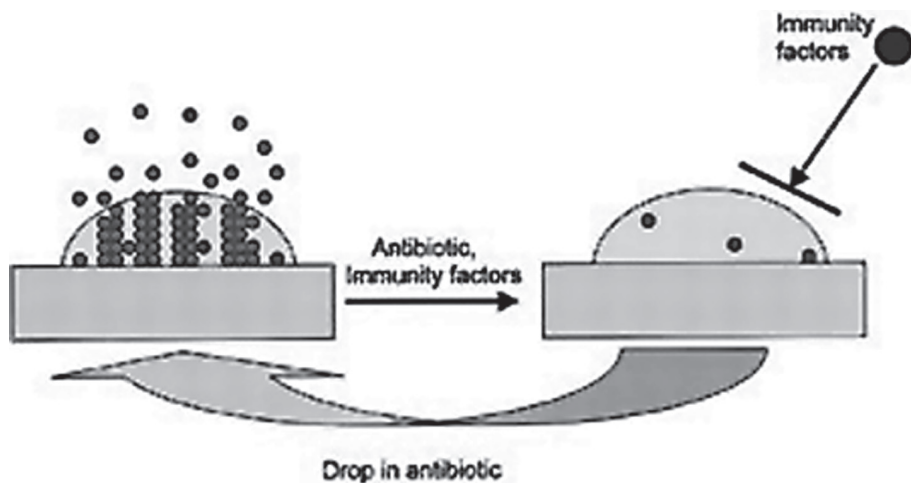
Povećane vrednosti genetskog transfera: Bakterije mogu steći rezistenciju na antibiotike mutacijama na nivou hromozoma ili horizontalnim transferom ekstrahromozomskih gena (plazmidi, transpozoni, integroni). Važna prednost života u biofilmu je ubrzana vrednost konjugacije koja je olakšana fizičkom blizinom ćelija (Hausner i Wuertz, 1999). Biofilm je perfektan milje za hori-

zontalni transfer genetskog materijala (transdukcija, transfekcija i konjugacija). Rezistencija na tetraciklin kodirana sa Tn916-like *elements* se brzo prenosi sa tetraciklin rezistentnih *Streptococcus* spp. na druge vrste *Streptococcus* spp. unutar modela oralnog biofilma (Roberts i sar., 2001).

Napred navedeni faktori ne objašnjavaju rezistenciju biofilмова na jednu važnu grupu antibiotika: fluorokvinolone. Dokazano je da fluorokvinoloni lako difunduju kroz matriks i veoma su efektivni u zaustavljanju rasta biofilma (Anderl i sar., 2000). Istraživanje efekta fluorokvinolona (ofloksacina i ciprofloksacina) na biofilm *P. aeruginosa* u zavisnosti od doze, pokazuje da se većina bakterija efikasno eliminiše primenom uobičajenih kliničkih koncentracija leka (Brooun, 2000). Međutim, posle početnog pada za 3-4 log, dalje povećanje koncentracije antibiotika nema cidni efekat. Povećanje koncentracije imipenema ili ciprofloksacina izaziva početno smanjenje broja ćelija *Escherichia coli*, ali preostala populacija je neosetljiva na dalje povećanje koncentracije. Slično je zapaženo u efektu amoksisilina na *Lactobacillus acidophilus* ili eritromicina i metronidazola na *Gardnerella vaginalis* (Lewis, 2001). Ovi eksperimenti pokazuju da je jedna mala populacija perzistera ultimativno odgovorna za visok nivo rezistencije biofilma. Bakterije koje prežive, održavaju se prisustvom antibiotika koji inhibira njihov rast, tj. paradoksalno, antibiotik pomaže perzistentnim bakterijama da istraju.

Perzisteri se smatraju specijalizovanim ćelijama odgovornim za toleranciju biofilma na antimikrobne agense i moguće je da biofilmovi omogućavaju više bakterija perzistera od planktonske populacije. Poznato je da planktonska populacija bakterija u ranoj fazi rasta ne sadrži perzistere i da se njihov broj povećava kako populacija ulazi u stacionarnu fazu rasta. Formiranje perzistera dakle zavisi od faze rasta, a jedan formiran, zreo biofilm, je gusto naseljena zona u kojoj je teško zamisliti bakterijsku deobu. U takvim uslovima prostorne prinude, nulta populacija rasta razmatra se kao norma (Watnik i Kolter 2000). Iako se ove bakterije ne dele, one su vijabilne i mogu se uspešno kultivisati kada se oslobode biofilm okruženja (matriksa). Interesantno, kada se oslobode iz biofilma, ove bakterijske ćelije deobom opet produkuju populaciju bakterija osetljivu na antibiotike, iz čega je jasno da perzisteri nisu ćelije sa mutacijom gena. Međutim, ove činjenice nisu od glavnog značaja za preživljavanje ćelija u biofilmu in vivo. Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) leka je ona koncentracija koja rezultira smanjenjem broja živih bakterija 99,9% preko noći u okolnostima rasta i praktično je rezonovanje da je ubijanje većine patogena isto tako dobro kao i ubijanje svih. Preostale perzistere treba da eliminiše imunološki sistem. Perzistirajuće bakterije će postati problem in vivo samo u slučajevima kada imunološki sistem nije operativan. Perzisteri su u biofilmu potpuno zaštićeni fizičkom barijerom matriksa od efektoru imunološkog siste-

ma organizma domaćina, tj. ekstracelularna polimerična supstanca štiti bakterije u biofilmu od opsonizacije i fagocitoze (Costerton i sar., 1999). Kada se prekine terapija, perzisteri će ponovo formirati biofilm koji će proizvoditi nove planktonske ćelije, a one vratiti simptome bolesti (Slika 1). Kako je za obnovu biofilma tretiranog antibioticima dovoljno manje od 1% početne populacije bakterija, „žilavost“ biofilмова postaje jasnija. Zbog toga se infekcije izazvane biofilmom upoređuju sa infekcijama planktonskim ćelijama bakterija u odsustvu imunog odgovora (Lewis, 2001).



Slika 1. Model rezistencije biofilma na antibiotike baziran na preživljavanju perzistentnih ćelija. Inicijalni tretman sa antibioticima ubija planktonske ćelije i većinu bakterijskih ćelija u biofilmu. Imuni sistem ubija planktonske perzistere, ali ne i perzistere u biofilmu koji su zaštićeni ekstracelularnom polimeričnom supstancijom (matriksom). Kada se prekine tretman, perzisteri se umnožavaju, oslobađa se planktonska populacija i vraćaju simptomi bolesti (bacteriology.com/2008/05/26/biofilm/).

Standardni dilucionni metod za ispitivanje osetljivosti bakterija na antibiotike bazira se na izloženosti (ekspoziciji) planktonskih mikroorganizama antibioticima, što nije slučaj kod bakterija koje rastu u biofilmu (Donlan i Costerton, 2002). Jasno je da vrednosti za MIC dobijene standardnim dilucionim testom (NCCL standard) nisu aplikativne za biofilm rastuće ćelije, zbog čega se koriste različite tehnologije za utvrđivanje efekta antibiotika na biofilm rastuću populaciju bakterija, tj. određivanje MBEC vrednosti – *Minimal Biofilm Eradication Concentracion*. MBEC predstavlja koncentraciju antibiotika ili biocida koja efikasno uništava jedan biofilm i predstavlja ekvivalent MBC

koncentraciji za planktonsku populaciju. Određivanje MBEC omogućava izbor novih antibiotika koji efikasno deluju na biofilmove, identifikaciju meta u biofilmu za nove antibiotike, izbor više odgovarajućih antibiotika za lečenje i praćenje mogućeg budućeg razvoja rezistencije biofilma na antibiotike (Ceri i sar., 2006). Do danas su razvijene mnoge aparature koje treba da pruže korisne informacije o biofilm procesima i više takvih sistema se koristi za određivanje efikasnosti različitih antimikrobnih agenasa prema biofilm-vezanim mikroorganizmima (Tabela 1).

Tabela 1: Aparature koje se koriste za rast i ispitivanje osetljivosti bakterija u biofilmu na antibiotike

Aparatura	Testirani mikroorganizam	Dinamika tečnosti	Supstrat	Metod za uklanjanje i kvantifikaciju
Modifikovani Robbins uređaj	<i>P. pseudo-malei</i>	Batch/mešanje	<i>Silastic disk</i>	Način uklanjanja nije dat; brojanje vijabilnih ćelija
Calgary bio-film uređaj	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i>	Batch/mešanje	Plastični klin	Sonikacija, brojanje vijabilnih ćelija
Disk reaktor	Gram negativne bakterije	Batch/mešanje	Kupon teflona	Sonikacija, vorteks, homogenizacija, brojanje vijabilnih ćelija ili direktno brojanje
CDC biofilm reaktor	Gram negativne bakterije	Kontinuiran/otvoren sistem	Nepotreban priključak (plastika)	Sonikacija, vorteks, homogenizacija, brojanje vijabilnih ćelija ili direktno brojanje
Perfused biofilm fermentor	<i>Candida albicans</i>	Kontinuiran/otvoren sistem	Filter celuloza-acetat	Resuspendovanje u sterilnoj vodi i brojanje vijabilnih ćelija
Model mehura (bešike)	Gram negativne bakterije	Kontinuiran/otvoren sistem	Urinarni kateter	Direktno posmatranje SEM ili TEM ili hemijska analiza

Donlan i Costerton, 2002.

Konvencionalni metod ubijanja bakterija antibioticima i dezinfekcionim sredstvima, uobičajeno je neefektivan kod biofilm organizovanih bakterija. Visoke doze antimikrobnih agenasa koje su potrebne za uklanjanje biofilm vezanih bakterija iz okruženja su nepoželjne i nisu u saglasnosti sa propisima o zaštiti životne sredine, kao što su i medicinski neprihvatljive, jer bi primena doze potrebne za ubijanje bakterija u biofilmu bilo ubijanje pacijenta. Zbog toga se nove strategije borbe protiv bakterijskih biofilmova zasnivaju na boljem razumevanju vezivanja bakterija za žive i nežive supstrate, rasta i odvajanja od susprata i hitno su potrebne medicini, kao i većini industrijskih grana.

LITERATURA

1. Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S.: Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 7, 1818-1824, 2000.
2. Anderl J.N., Zahller J., Roe F., Stewart P.S.: Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 1251-1256, 2003.
3. Brooun A., Liu S., Lewis K.: A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 3, 640-646, 2000.
4. Brown C.M., Ellwood D.C., Hunter J.R.: Growth of bacteria at surfaces: influence of nutrient limitation, *FEMS Microbiology Letters*, 1, 163-166, 1977.
5. Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret A.: The Calgary Biofilm Device: a new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms, *J Clin Microbiol*, 37, 1771-1776, 1999.
6. Ceri H., Olson M.E., Morck D.W., Storey D.G.: Minimal Biofilm Eradication Concentration (MBEC) Assay: Susceptibility Testing for Biofilm, in *Biofilms, infection and antimicrobial therapy*, In: *Mechanisms of Biofilm resistance to antibiotics*, CRC Press Taylor & Francis Group, US, 257-269, 2006.
7. Costerton J.W., Stewart P.S.: Greenberg EP., Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, *Science*, 284, 1318-1322, 1999.
8. Donlan R.M., Costerton J.W.: Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2, 167-193, 2002.

9. Dunne Jr WM.: FOCUS, Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2, 155-166, 2002.
10. Hausner M., Wuertz S.: High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis, *Appl Environ Microbiol*, 65, 3710-3713, 1999.
11. Lewis K.: MINIREVIEW Riddle of Biofilm Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 4, 999-1007, 2001.
12. Mah T.F.C., O'Toole G.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *TRENDS in Microbiology*, 9, 1, 34-39, 2001.
13. Maira-Litran T., Allison D.G., Gilbert P.: An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multi-drug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms, *J Antimicrob Chemother*, 45, 789-795, 2000.
14. Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G., Read R.R.: Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, *Can J Vet Res*, 66, 86-92, 2002.
15. Pace J.L., Rupp M., Roger G.: Biofilms, infection and antimicrobial therapy, In: Mechanisms of Biofilm resistance to antibiotics, CRC Press Taylor & Francis Group, US, 9-19, 2006.
16. Roberts A.P., Cheah G., Ready D., Pratten J., Wilson M., Mullany P.: Transfer of Tn916-like elements in microcosm dental plaques, *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 2943-2946, 2001.
17. Trachoo N.: Biofilms and the food industry, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 25, 6, 807-815, 2003.
18. Walters M.C III, Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Stewart P.S.: Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin, *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 317-323, 2003.
19. Watnick P., Kolter R.: Biofilm, City of Microbes, *Journal of Bacteriology*, 182, 10, 2675-2679, 2000.
20. Williams I., Venables W.A., Lloyd D., Paul F., Critchley I.: The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*, *Microbiology*, 143, 2407-2413, 1997.

Primljeno: 15.12.2010.

Odobreno: 20.02.2011.

CONSEQUENCES OF ORAL INFECTION WITH CANDIDA ALBICANS ON THE HISTOARCHITECTONICS OF ORGANS IN MALE RATS

Diana Iacob-Obistioiu *, Romeo T. Cristina, Diana Brezovan, Ileana Nichita
Faculty of Veterinary Medicine Timisoara, 300645,
Calea Aradului No. 119, Timisoara, Romania

Abstract

Experiments were conducted to evaluate the immunosuppression's effect on the development of oral candidiasis in Wistar rats. Animals were submitted to immunosuppression in order to facilitate the establishment and persistence of *Candida albicans* infection. Treatment with drugs (dexamethasone and tetracycline) was initiated 7 days before *C. albicans* inoculation and lasted until the end of the experiments, day 9 post-inoculation, but at a higher dose for dexamethasone and at a lower dose for tetracycline. The infection was done twice at a 24 hours difference. Establishment of *C. albicans* infection was done by oral inoculation with 0.1 ml of saline suspension containing $3.108 \pm 1 \times 10^3$ viable cells of *C. albicans* strain ATCC 10231. Tissue injury was determined by the histological quantification of organs collected at days 3, 6 and respectively 9 of the experiment. Our results have shown that candidiasis affected organs in male rats in the following order: tongue, intestines, liver, spleen and kidney. There was a gradual evolution of the histological lesions severity in the tongue starting from the third day towards the end, but, in reverse, all the other organs affected started having regenerative healing processes at the end of the experiment.

Key words: oral, infection, *Candida albicans*, rats, histo-architectonics.

INTRODUCTION

Although a known issue, the presence of *Candida albicans* infections is still commonly reported and studied in animals and humans by many researchers (Chami N et al., 2004, 2005, Takakura N et al., 2003). Candidiasis remains a current topic, *Candida albicans* being structures able to show a strong and extensive action, expressed with specific morbid conditions (mycoses) whose

* E-mail: rtcrisrina@yahoo.com

evolution are, often, train / rebellious to treatment. Our approach, related to the development of candidiasis in animal studies was aimed as a preamble of a future study wished to confirm or refute the effectiveness of different regimens applied as part of the allopathic and the phytotherapeutical management of these diseases. The objectives of the present research were to identify with certainty the effects of *Candida albicans* infections, on target organs, occurring in immunosuppressed rats, consecutive oral infection and to evaluate the organs histo-cytological changes, as a basis for assessment of the consequences regarding invasive *Candida albicans* infections.

MATERIALS AND METHODS

The in vivo experiment was performed on young Wistar male rats, about the same weight (average weight of 190 +10 grams). For the experiment, immunosuppressed rats were used to highlight the *Candida albicans* infection progress. The animals were maintained on premises especially for this purpose, with temperature and light controlled (22 °C cycle for 12 hours starting at 8), and had free access to food and water ad libitum.

We have used a model of oral candidiasis in immunosuppressed rats that was reported by Martinez i sar., 2001. The rats were immunosuppressed with dexamethasone (Dex) (Corthametasone, Vetoquinol) and treated with tetracycline 4% soluble powder (Tc) (Laprophan) for one week before the experimental infection, rats were given drinking water with 0.5 mg / liter dexamethasone with tetracycline (0.1%). On the day of infection, the dexamethasone dose was raised at 1 mg / liter, while the tetracycline concentration was reduced to 0.01% and was maintained throughout the experiment. Rats were infected orally, twice, every 24 h (days 0 and 1) with 0.1 ml of saline suspension containing $3.108 \pm 1 \times 10^3$ viable cells of *C. albicans* strain ATCC 10231.

Experimental series were composed of nine groups each consisting of three individuals: - lots IS1 - IS3- male rats, immunosuppressed, euthanized at the same time with the treated groups. The batches of animals which were immunosuppressed but not infected were used as negative control groups. - lots infected with *Candida albicans* known as: ICA1, ICA2 ,ICA3 - established from immunosuppressed rats that were infected on day 0 and 1 of the experiment. Rats were euthanized after 3, 6 and 9 days post-infection and samples were taken for histo-cytological investigations.

The organs harvested for samples were: tongue, respiratory tract, intestine, liver, spleen, kidney and brain. Stain samples were collected and processed through the histological technique HE stain or hematoxylin and eosin stain

and microscopy was performed with the x100 and x400 objectives, and the images were processed with an Olympus CX 41 microscope with image capture and data interpretation software.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The main histological alterations were identified in: tongue, intestine, liver, spleen and kidney, respectively. For the trachea, lung and nervous system histological changes were not relevant for our study.

Most conspicuous changes were found in the immunosuppressed rat groups, infected with *Candida albicans*. Histologically, the changes regarding the tongue were recorded only for individuals within the immunosuppressed and infected groups; the tongue of subjects only immunosuppressed being without any histological changes.

We observed the progressive development of histological severity of injuries by the end of the third day, the main changes are: parakeratosis, acanthosis, dystrophy of the cells in the lingual epithelium with the discontinuity of the basement membrane. In the intestine of immunosuppressed rats main lesions were found in the first part of the immunosuppression (third day).

The main histological changes were: destruction of large areas of intestinal villi, discrete edema of the intestinal glands and discrete edema of villi axis, periglandular lymphohistiocytic infiltration. The regenerative capacity of the intestine caused the tissue architecture at the end to recover almost completely, situation which was the same also with the immunosuppressed and infected batches, specifying that the lesions in the first half of the experiment were more serious.

In the liver, in the third and sixth day degenerative processes of hepatocytes with balloon dystrophy were observed accompanied by karyolysis and kariopcnosis phenomena which have affected the liver function and the cellular integrity in immunosuppressed male (to a lesser extent) and especially in those immunosuppressed and infected.

In the samples collected on the ninth day normal liver tissue was found which confirms the regenerative healing, observation justified by the return to a normal state of the cytoplasmic and nuclear structure of hepatocytes and also the function restoration.

These observations, although not backed by laboratory tests, which are consider later, shows that although *Candida albicans* infections causes a major affect on the liver within the first six days, this organ has regenerative capacity, which in our case appeared after the ninth day. At a spleene level in both cases there is a dramatic reduction in the first phase of leucopoiesis areas, a pheno-

menon that affects decisively the leukopoietic function, erythropoiesis areas remaining unchanged with a trend towards the recovery of the lymphoid tissue.

In the case of the infected males, splenic lymphonodes are present only in the form of lymphocyte chords, the *Candida albicans* infection blocking in a first phase the development of the expected and accepted fungal diseases, that of the leukocyte reactivity and proliferation, but with the restoration of the lymphoid function and architecture at the end of the experimental period. At kidney level, after three days, in infected and immunosuppressed males, an extensive degenerative phenomena was found, manifested by granular dystrophy of the nephrocytes in the distal and proximal contort tubules, Bowman capsule destruction and loss of the uriniferous spaces. These changes affect seriously, in a first phase, the renal function, the phenomena stepping towards glomerulonephritis, but, with the increase of the exposure time until the ninth day, the new developments having a reversible tendency to restore the function in the renal corpuscles. In the case of the immunosuppressed males, these changes were much reduced in intensity and extension.

CONCLUSIONS

1. Candidiasis affected organs in male rats in the following order: tongue, intestines, liver, spleen and kidney in the experimental oral infection.
2. Oral candidiasis did not affect the lung's, trachea's and the nervous system's histo-architectonics, in the experimental oral infection in male rats.
3. In immunosuppressed and infected males there was a gradual evolution of the histological lesions severity in the tongue starting from the third day towards the end.
4. In the liver, in the third and sixth day after exposure degenerative processes of hepatocytes were observed, the analysis from the ninth day indicating the regenerative healing of the cytoplasmatic structure.
5. At spleen level, in both cases, is found, in the first phase, the reduction of the leucopoiesis areas process that affects the leukopoietic function, erythropoiesis areas remaining unchanged with tendency towards lymphoid tissue recovery.
6. In the kidney, after three days, was found, in the case of the infected and immunosuppressed males, the installation of degenerative phenomena, but, with the increase of the exposure time until the ninth day the new developments having a tendency towards restoring the renal corpuscles function.

LITERATURE

1. Chami N., Chami F., Bennis S., Trouillas J., Remmal A.: Antifungal Treatment with Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. *Braz. J. Infect. Dis.*, 8, 217- 226, 2004
2. Chami N., Bennis S., Chami F., Aboussekhra A., Remmal A.: Study of anti-candidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. *Oral Microbiology and Immunology*, 20,106–111, 2005
3. Martinez A., Ferrer S., Santos I., Jimenez E., Sparrow J., Regardera J., De Las Herras G., and Gargallo-Viola D.:Antifungal activities of two new Azasordarins, GW471552 and GW471558, in experimental models of Oral and Vulvovaginal Candidiasis in Immunosuppressed Rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3304-3309, 2001
4. Takakura N., Wakabayashi H., Ishibashi H.,Teraguchi S.,Tamura Y.,Yamaguchi H, Abe S.: Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 47, 8, 2619–2623, 2003

Primljeno: 15.02.2010.

Odobreno: 20.02.2011.

VERMINOZNA PNEUMONIJA DIVLJIH SVINJA

Jasna Prodanov-Radulović^{*1}, Radoslav Došen¹, Ivan Pušić¹,
Dušan Orlić¹, Igor Stojanov¹, Gojko Radulović²

¹ Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“

² Privatna veterinarska stanica „Titel D.O.O.“, Titel

Kratak sadržaj

U našoj zemlji određeni broj divljih svinja se kontrolisano odgaja u ograđenim lovištima dok je broj jedinki u slobodnim staništima uglavnom nepoznat. Zdravstvena kontrola populacije divljih svinja je veoma zahtevna i kompletna dijagnostička ispitivanja u svakom ispitivanom slučaju su teška za realizaciju i često neizvodljiva u celosti. Cilj rada je bio ispitivanje kliničkih manifestacija i patoloških promena u slučajevima sumnje na pojavu verminozne pneumonije divljih svinja. Materijal za ispitivanje je obuhvatao tri lovišta u Vojvodini, na kojima su klinički zapaženi poremećaji zdravstvenog statusa i uginuća mlađih kategorija divljih svinja. Metode ispitivanja su obuhvatale, epizootiološka i klinička ispitivanja, patomorfološki pregled uginulih divljih svinja, patohistološki pregled uzoraka plućnog tkiva i parazitološka ispitivanja. Kod svih ispitanih uginulih divljih svinja makropatološki su ustanovljene promene dominantno na respiratornom traktu. Patohistološkim i parazitološkim pregledom ustanovljeno je prisustvo plućnih vlašaca u lumenu traheje, bronhusa i u kaudoventralnom delovima dijafragmatskih lobusa (*Pneumonia verminosa*). Na osnovu postignutih rezultata, može se zaključiti je da je *Metastrongylus sp.* ekonomski značajna helmintoza divljih svinja u našim klimatskim uslovima. Ustanovljene parazitske infestacije kod ispitanih divljih svinja imaju ekonomski značaj zbog zaostajanja u rastu i prirastu, i mogu biti uzrok uginuća ili odbacivanja mesa životinja zbog kaheksije, hidremije.

Ključne reči: divlje svinje, verminozna pneumonija, *Metastrongylus sp.*

^{*} E mail: jasna@niv.ns.ac.rs

PNEUMONIA VERMINOSA OF WILD BOARS

Jasna Prodanov-Radulović¹, Radoslav Došen¹, Ivan Pušić¹,
Dušan Orlić¹, Igor Stojanov¹, Gojko Radulović²

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

² Private Veterinary Station D.O.O. „Titel“, Titel, Serbia

Abstract

In our country a certain number of wild boars is controlled and reared on enclosed hunting ground, while a number of free-ranging population is mainly unknown. The control of health status of wild boar population is quite demanding and it is not easy to achieve. Also, often is not possible entirely to perform a complete diagnostic examination in wild boars in each evaluated case. The aim of this research was to evaluate the clinical signs and pathomorphological changes in the suspicious cases on the occurrence of the verminous pneumonia in wild boars. The material for this research included three hunting grounds in Vojvodina, where clinical signs of health disorders and dead of young categories of wild boars were recorded. The following research methods were applied: epidemiological, clinical and pathological examination of dead wild boars, histological examination of the lung tissue samples and parasitological examination. In all examined cases, macropathological examination revealed changes dominantly in the respiratory tract. By pathohistological and parasitological examination the presence of lung worms in the trachea, bronchi and in posteroventral parts of the diaphragmatic lung lobes were detected (*Pneumonia verminosa*). In conclusion, the achieved results strongly suggest that *Metastrongylus sp.* represent economically important helminthosis of wild boars in our climatic conditions. Discovered parasitic infestations in the evaluated wild boars are economically significant because of retardation in the growth and weight gain, and may be the cause of death or discarding the meat in the case of cachexia, hydraemia.

Key words: wild swine, pneumonia verminosa, *Metastrongylus sp.*

UVOD

U našoj zemlji određeni broj divljih svinja se kontrolisano odgaja u ograđenim lovištima dok je broj jedinki u slobodnim staništima uglavnom nepoznat (Prodanov et al., 2009). U okviru petnaest država članica Evropske Unije (EU) brojnost populacije divljih svinja je procenjena između 800,000 i 1 milion

jedinki, pri čemu gustina populacije varira među različitim državama (Laddomada, 2000). Smatra se da uvećanje gustine populacije divljih svinja može biti zabrinjavajući faktor, sa aspekta dobrobiti životinja i zbog potencijalnog uticaja na porast prevalencije infektivnih i parazitskih oboljenja (Ruiz-Fons et al., 2008). Jedna od važnih karakteristika domaćih i divljih svinje jeste da imaju zajedničke patogene, uzročnike bolesti (Fritzemeier et al., 2000).

Kontrola populacije divljih svinja je veoma zahtevna i kompletna dijagnostička ispitivanja u svakom ispitivanom slučaju kod divljih svinja su teška za realizaciju i često neizvodljiva u celosti. U proteklom periodu 2001-2009. godine patomorfološkim pregledom uginulih divljih svinja poreklom iz lovišta u Vojvodini, ustanovljeno je da su zdravstveni problemi kod divljih svinja bili vezani uglavnom za parazitske infestacije i pneumonije bakterijske etiologije (Prodanov et al., 2009). Cilj rada je bio ispitivanje kliničkih manifestacija i patoloških promena u slučajevima sumnje na pojavu verminozne pneumonije divljih svinja.

MATERIJAL I METODE RADA

Materijal za ispitivanje je obuhvatao tri lovišta u Vojvodini, na kojima su klinički zapaženi poremećaji zdravstvenog statusa i uginuća mlađih kategorija divljih svinja. U okviru primenjenih metoda, obavljena su epizootiološka i klinička ispitivanja, patomorfološki pregled uginulih divljih svinja, patohistološki pregled uzoraka plućnog tkiva i parazitološko ispitivanje sadržaja iz pluća i uzoraka fecesa (izolacija, identifikacija i determinacija parazita).

REZULTATI I DISKUSIJA

Na osnovu anamnestičkih podataka, ustanovljeno je da u dva lovišta postoji zdravstveni problem vezan za sitniju prasad, koja uginu sa znakovima krajnje kaheksije, dehidracije i asfiksije. Kliničkim pregledom su ustanovljeni: otežano kretanje, brzo zamaranje, životinje ne mogu da beže, otežano dišu, lako se hvataju. Pored toga, ustanovljen je i proliv tamno zelene boje, iscedak iz nosnih otvora, konzistencije poput pavlake. Patomorfološkim pregledom deset leševa divljih svinja utvrđeno je postojanje patoloških promena dominantno na organima respiratornog trakta: nalaz opsežnih krvarenja na plućnom parenhimu, sluzokoži dušnika i velikim bronhusima. U lumenu bronhija i bronhiola utvrđeno je prisustvo penušavog sukričavog sadržaja i veliki broj plućnih vlašaca koji poput mukoidnih čepova ispunjavaju respiratorne puteve. Nevedeni mukoidni čepovi su uzrokovali okluziju sprovednih respiratornih puteva, atelektazu pluća i ugušenje. Po lokalizaciji, najintenzivnije patološke

promene su utvrđene na dijafragmatskim režnjevima pluća, gde je i ustanovljeno prisustvo velikog broja plućnih vlašaca. Parazitološkim ispitivanjem uzoraka sadržaja iz respiratornih puteva, utvrđeno je prisustvo plućnih vlašaca (*Metastrongylus sp.*). Takođe, pregledom uzoraka fecesa divljih nazimadi poreklom iz dva ispitivana lovišta ustanovljena je jaka infestacija sa *Metastrongylus sp.*, *Trichuris suis*, *Oesophagostomum sp.* i *Hyostrongylus sp.*

Smatra se da helmintsku faunu kod divljih svinja čini više od 20 vrsta, od kojih su 5-10 vrsta parazita naročito učestale i često koegzistiraju. Pri nalazu plućnih vlašaca često se ustanovljava prisustvo nekoliko vrsta zajedno, npr. *Metastrongylus elongatus*, *M. pudendotectus* i *M. salmi* (Nansen and Roepstorff, 1999). Ustanovljeno je da se dominantna vrsta plućnih vlašaca kod divljih svinja razlikuje i zavisno od države, npr. *M. pudendotectus* je utvrđen kao dominantna vrsta u Nemačkoj dok je *M. elongatus* najčešće ustanovljen na Floridi i u Iranu. (Morita et al., 2007). Jaja parazita se nalaze u zemljištu, dok je infektivna larva u kišnim glistama i može ostati viabilna nekoliko godina (Nansen and Roepstorff, 1999). Kada je u pitanju kontrola zdravstvenog statusa populacije divljih svinja, treba imati u vidu nekoliko faktora. Prvo, divlje životinje su po definiciji vrste koje žive slobodno, pristup njima je otežan u poređenju sa domaćim vrstama i znaci oboljenja se ne mogu lako oučiti. Isto tako, otežana je i procena zdravstvenog stanja populacije u celini. Pored toga što klinički znaci oboljenja kod divljih životinja često nisu jasno izraženi, opasnost predstavlja mogućnost prenošenja infekcija na populaciju domaćih svinja (Artois et al., 2001; Nansen and Roepstorff, 1999).

Najveći broj lekova koji su dostupni za primenu kod domaćih svinja mogu da se koriste za tretman i prevenciju infekcija divljih vrsta. Međutim, poseban problem predstavlja dostavljanje lekovitih substanci divljim životinjama u propisanoj dozi (Artois et al., 2001). Antihelmintike ne treba primenjivati bez kontrole, nekritički (ja bi ovo obrisala) već njihovu primenu treba integrisati u skladu (usaglasiti sa) sa proizvodnim sistemom u cilju postizanja optimalnog efekta i izbegavanja opasnosti od razvoja rezistencije na antihelmintike (Meng et al., 2009). Dokazano je da učestala i prekomerna primena antihelminitika postepeno može dovesti do se razvoja antihelmintske rezistencije (Nansen and Roepstorff, 1999).

U trećem ispitivanom lovištu zdravstveni problemi su ustanovljeni kod prasadi starih oko 3 meseca. Na osnovu anamnestičkih podataka i kliničkog pregleda utvrđeno je da se oboljenje manifestuje sa simptomima otežanog disanja, izraženo pumpanje pri disanju, gnojni iscedak iz nosa, slepljeni očni kapci, brzo zamaranje i životinje ne mogu da beže. Patomorfološkim pregledom uginulih divljih svinja (8 komada) ustanovljene se promene na plućima: intersticijalni edem, hepatizacija kranijalnih delova apikalnih i medijalnih re-

žnjeva pluća, otok medijastinalnih limfnih čvorova, na dijafragmatskih režnjema nalaz atelektatičnih polja. U najvećem broju ispitivanih uzoraka pluća ustanovljeno je postojanje marginalnog emfizema i konsolidacije. Na poprečnom preseku dijafragmatskih režnjeva i u respiratornim putevima (traheja, veliki i mali bronhusi) utvrđeno je prisustvo velike količine mukoidnog sadržaja pomešanog sa čepovima plućnih parazita. Parazitološkim ispitivanjem uzoraka sadržaja iz respiratornih puteva, utvrđeno je prisustvo plućnih vlašaca (*Metastrongylus sp.*).

Kod svih ispitanih uginulih divljih svinja makropatološkim i patohistološkim pregledom konstatovan je nalaz plućnih vlašaca u lumenu traheje, bronhusa i u kaudoventralnom delovima dijafragmatskih lobusa (*Pneumonia verminosa*).

Prirodne karakteristike habitata, uključujući tu postojanje prelaznih domaćina za helminte predstavljaju značajan faktor koji utiče na parazitske infestacije divljih svinja (Järvis et al., 2007). Sa druge strane, arteficialni menadžment populacije divljih svinja, kao što je (ovo bih izbacila) primena kontrolisanog uzgoja i ishrane u ograđenom području, dovodi do porasta gustine populacije i time do uvećanja rizika od prenošenja različitih uzročnika oboljenja (Ruiz-Fons et al., 2008). Naseljavanje tj. remont lovnih područja zahteva određene pripremne aktivnosti odnosno analizu zdravstvenog statusa divljih svinja i obezbeđenje da novo uvedene jedinke budu slobodne od parazita. Zadnje navedeno je od značaja imajući u vidu stres koji se javlja prilikom transporta i oslobađanja jedinki u nov habitat, tako da parazitske infestacije mogu imati negativni uticaj na preživljavanje novo uvedenih divljih svinja. (Fernandez-de-Mera et al., 2003). Ispitivanjem je utvrđeno da divlje svinje u različitim područjima Evrope imaju sličnu helmintofaunu. Značajno veći intenzitet infekcije helmintima je ustanovljen kod mladih jedinki (uzrast ispod 1 godine) u poređenju sa starijim životinjama (Järvis et al., 2007). Proučavanje prevalencije parazitskih oboljenja divljih svinja je značajno zbog njihove procene kao izvora infekcije - infestacije za domaće životinje i ljude (Morita et al., 2007). Kontrola zdravstvenog statusa populacije divljih svinja je kompleksna, i zahteva primenu specifičnog plana i strategije koji bi uzimao u obzir karakteristike oboljenja, etologiju divljih svinja, interakciju divljih svinja sa ekstenzivno uzgajanim domaćim svinjama i interferirajuće dejstvo (doprinos?) ljudskog faktora (Artois et al., 2001; Prodanov et al., 2009).

ZAKLJUČAK

Patomorfološkim pregledom divljih svinja je ustanovljeno da su kod uginulih jedinki zdravstveni problemi vezani za parazitske infestacije respirator-

nog trakta. U svim ispitanim slučajevima makropatološkim, patohistološkim i parazitološkim pregledom utvrđen je nalaz plućnih vlašaca u lumenu traheje, bronhusa i u kaudoventralnom delovima dijafragmatskih lobusa (*Pneumonia verminosa*). U slučajevima kada postoji sumnja da su plućni vlašci uzrok respiratornih oboljenja, pri patomorfološkom pregledu neophodno je napraviti poprečni rez duž kaudoventralnih ivica dijafragmatskih lobusa pluća, gde se mogu videti i istisnuti plućni vlašci.

S obzirom na učestalost ustanovljavanja (nalaza) plućnih vlašaca i patoloških promena u plućima, može se zaključiti da je *Metastrongylus sp.* ekonomski značajna helmintoza divljih svinja u našim klimatskim uslovima. Parazitske infestacije koje su ustanovljene kod ispitivanih divljih svinja imaju ekonomski značaj zbog zaostajanja u rastu i prirastu, i mogu biti uzrok uginuća ili odbacivanja mesa životinja zbog kaheksije, hidremije. Imajući u vidu postignute rezultate, svakako da bi ovakav vid kontrole u budućnosti trebalo intenzivirati u cilju sticanja kompletnog uvida u zdravstveno stanje divljih svinja.

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

LITERATURA

1. Artois M., Delahay R., Guberti V. and Cheeseman C.: Control of Infectious Diseases of Wildlife in Europe. *The Veterinary Journal*, 162, 141-152, 2001
2. Fernandez-de-Mera I. G., Gortazar C., Vicente J., Höfle U., Fierro Y. (): Wild boar helminths: risks in animal translocations. *Veterinary Parasitology*, 115, 335-341, 2003
3. Fritzermeier J., Teuffert J., Greiser-Wilke I., Staubach CH., Schlüter H., Moennig V.: Epidemiology of classical swine fever in Germany in the 1990s. *Vet Microbiol*, 77, 29-41, 2000.
4. Jarvis T., Kapel Ch., Moks E., Talvik H., Mägi E.: Helminths of wild boar in the isolated population close to the northern border of its habitat area. *Veterinary Parasitology*, 150, 366-369, 2007
5. Laddomada A.: Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Vet Microbiol*, 73, 121-130, 2000
6. Meng X. J., Lindsay D. S. and Sriranganathan N.: Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Phil. Trans. R. Soc.*, B 364, 2697-2707, 2009
7. Morita T., Haruta K., Shibata-Haruta A., Kanda E., Imai S. and Ike K.: Lung Worms of Wild Boars in the Western Region of Tokyo, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 69(4), 417-420, 2007

8. Nansen P., Roepstorff A.: Parasitic helminths of the pig: factors influencing transmission and infection levels. *International journal for Parasitology*, 29, 877-891, 1999
9. Prodanov J., Došen R., Pušić I., Petrović T., Orlić D., Maljković M., Lupulović D.: The control of classical swine fever virus presence in wild boars population. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 25, 5-6, 879-885, 2009
10. Ruiz-Fons F., Segalés J., Gortázar C.: A review of viral diseases of the European wild boar: Effects of population dynamics and reservoir role. *Vet J.*, 176, 158-169, 2008

Primljeno: 15.12.2010.

Odobreno: 20.02.2011.

UTICAJ UPOTREBE ANTIMIKROBNIH LEKOVA U ŽIVINARSTVU NA BEZBEDNOST MESA

Jelena Petrović *, Dubravka Milanov, Miloš Kapetanov¹

¹Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Rumenački put 20, Novi Sad

Kratki sadržaj

Sagledavanje problema vezanih za namirnice otvora 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 antimikrobnih lekova: rezidue u jestivim tkivima i razvijanje rezistencije bakterija. Nakon propisanog aplikovanja antimikrobnih lekova sadržaj rezidua u jestivim tkivima opada do dozvoljenih kolicina (ispod MDK) tokom propisanog perioda karence. Međutim i nakon isteka karence rezidue se zadržavaju u jestivim tkivima duži vremenski period. Rezidue enrofloksacina 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. Rezidue florfenikola trećeg dana karence padaju ispod MDK ali iz jetre u potpunosti nestaju sedam dana od prekida tretmana dok se u bubrezima još uvek može dokazati. Nakon isteka karence rezidue su još uvek prisutne ali u bezbednim koncentracijama. Kod nepravilne upotrebe antimikrobnih lekova nemoguće je ispoštovati period karence a samim tim povećava se rizik od pojave zdravstveno neispravnog mesa na tržištu.

Ključne reči: bezbednost, meso, veterinarski lekovi

* E mail: jelenap@niv.ns.ac.rs

INFLUENCE OF ANTIMICROBIAL DRUG USE IN POULTRY BREEDING ON MEAT SAFETY

Jelena Petrović, Dubravka Milanov, Miloš Kapetanov¹

¹Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Rumenački put 20 Novi Sad

Abstracts

Recognition of food safety problems brings into focus the importance of primary production. Overuse of antimicrobial drugs in animal breeding is reality it is only a question in what manner and extent it influences on food safety. Use of antimicrobials can cause residues and hereby influence safety of meat originating from treated animals. Besides residues, one of the most important and actual side effects is developing of resistance in food borne pathogens. After correct application of antimicrobial drugs tissue residue levels decrease to permitted quantities (below MRL) in prescribed withdrawal period. But even after expiration of withdrawal period residues are still present in edible animal tissues. Residues of enrofloxacin can be detected in meat nine days after the end of treatment, residues in liver are present much longer. Residues were detected in liver until 22. post treatment day. Residues of florfenicol decrease in meat below MRL on third withdrawal day but in liver residues completely expire on seventh post treatment day, while in kidneys they can be still detected. After expiration of withdrawal period residues of florfenicol are still present in edible animal tissues but in permitted quantities. In antimicrobial drug abuse or overuse it is impossible to apply correct withdrawal period this leads to high risk of appearance of dangerous meat on market.

Key words: safety, meat, veterinary drugs

UVOD

Zbog svog sastava, pre svega količine visoko vrednih proteina, meso živine ima važnu ulogu u ishrani stanovništva. Meso brojlera je lako svarljivo, ne utiče na povećanje telesne mase zbog male količine masti i često se preporučuje u dijetetskim načinima ishrane. Konzumiraju ga sve kategorije stanovništva počev od beba pa do starih osoba.

Upotreba veterinarskih lekova je neophodna u uzgoju živine. Lekovi se koriste za prevenciju i kontrolu infektivnih i ne-infektivnih oboljenja, olakšavaju stres pri promenama sredine, vakcinaciji, debikiranju itd. Upotreba antimikrobnih lekova povećava produktivnost u živinarstvu i time omogućuje

dostupnost kvalitetnog mesa po povoljnim cenama, širokom krugu potrošača. Ne manje značajno je poboljšanje zdravstvenog stanja i dobrobit same živine time što antimikrobni lekovi redukuju incidencu oboljenja (Weiss i sar., 2007).

Bezbednost je osnovni prioritet u proizvodnji hrane. Bezbedna hrana je slobodna od rezidua, kontaminenata i patogenih mikroorganizama. Savremeni potrošač je vrlo zainteresovan za bezbednost namirnica koje kupuje. Prema istraživanjima Resurreccion i Galvez (1999) 77% potrošača smatra da su rezidui veterinarskih lekova u mesu veoma opasne po zdravlje naspram 23% potrošača koji smatraju da rezidui ne predstavljaju problem.

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 antimikrobnih lekova: rezidui u jestivim tkivima i razvijanje rezistencije kod zoonotskih patogena.

Rezidui

Stalna i masivna upotreba veterinarskih lekova u intenzivnom uzgoju živine predstavlja rizik za direktnu kontaminaciju mesa (Endtz i sar., 1991, Kabir i sar., 2004 and Mitema i sar., 2001), upravo zbog mogućnosti nepotpunog praćenja propisanog perioda karence. U mesu lečenih životinja se mogu naći ostaci lekova koji namirnicu čine higijenski neispravnom, jer mogu štetno delovati na zdravlje potrošača. Rezidui penicilina u pilećem mesu su dovele do anafilaktičkih reakcija kod potrošača (Teh and Rigg, 1992). Kod ljudi osetljivih prema sulfonamidima nastale su alergijske promene na koži posle konzumiranja jaja sa reziduama sulfonamida (WHO, 1989). Upravo zato se meso sa ostacima antibiotika u većini zemalja u svetu 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) rezidua u jestivim tkivima životinja. Procena bezbednosti mesa se vrši na osnovu količine rezidua u tkivima i MDK vrednosti. MDK vrednost za fluorohinolone i florfenikol nisu propisane u našoj zemlji, zato se za procenu koriste MDK vrednosti propisane u Evropskoj Uniji.

Za lečenje živine u našoj zemlji se najviše koriste antimikrobni lekovi iz grupe fluorohinolona (Enrocin, Flumekvin), florfenikol (Floron), oksitettraciklini i beta laktami (penicilini).

Fluorohinoloni

Fluorohinoloni su potpuno sintetički antimikrobni lekovi, poseduju širok spektar antimikrobne aktivnosti, nisku toksičnost i odlične kliničke farmakokinetičke osobine, što predstavlja značajnu prednost u odnosu na ostale grupe antimikrobnih lekova. (Appelbaum i Hunter, 2000).

Fluorohinoloni se posle oralne primene brzo apsorbuju iz digestivnog trakta živine. Maksimalnu koncentraciju u plazmi dostižu posle tri sata, u zavisnosti od vrste i doze hinolona. Jedna oralna doza hinolona daje koncentraciju u plazmi od 1µg/ml, što je dovoljan MIK za većinu osetljivih mikroorganizama (Anadon i sar., 1990; Prescott i sar., 2000). Posle apsorpcije, fluorohinoloni se brzo i intenzivno distribuiraju u tkiva. Generalno, koncentracija hinolona u crevnom sadržaju, koži i kostima iznosi 35-100% koncentracije u serumu, dok je koncentracija u bronhijalnom sekretu čak dva do tri puta veća od koncentracije u plazmi. U cerebrospinalnoj tečnosti se obično nalazi oko 25% koncentracije u serumu. Određene varijacije postoje zavisno od vrste fluorohinolona. Dobra penetracija leka i visoka koncentracija leka u plazmi, u visini MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) za većinu bakterijskih patogena, preporučuju upotrebu hinolona u lečenju bakterijskih infekcija u živinarstvu (Anadon i sar., 1990; Soliman, 2000 ;Prescott i sar., 2000).

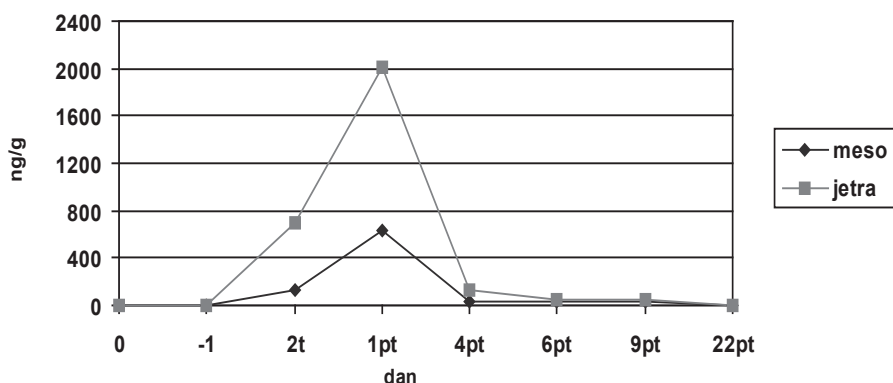
Fluorohinoloni se eliminišu hepatičnim metabolizmom i/ili renalnom ekskrecijom (enrofloksacin) ili putem oba ova mehanizma (Less i Aliabadi, 2002; Martinez i sar., 2005). Enrofloksacin se metaboliše u jetri i transformiše u glavni metabolit ciprofloksacin uz nekoliko manje važnih metabolita oksociprofloksacin, enrofloksacin amid, desetilen ciprofloksacin, dioksociprofloksacin, desetilen enrofloksacin, N-formil ciprofloksacin, oksoenrofloksacin i hidroksienrofloksacin. Radiometrijskim studijama je ustanovljeno da se više od polovine rezidua u tkivima živine nalazi u vidu enrofloksacina: 61-66% (bubreg), 51% (jetra), 53-62% (masno tkivo) i 85% (mišići) (EMEA, 1998).

Promene u CNS-u i gastrointestinalnom traktu, fototoksičnost, hondrotoksičnost, zapaljenje i pucanje tetiva, disbalans u humano digestivnoj mikroflori, alergije su neželjeni efekti vezani za fluorohinolone (Domagala, 1994; Klecak i sar.,1997; Tokura i sar., 1995; Kashida i Kato, 1997; Stahlman i sar., 2000; Stahlmann, 2002; Nagai i sar., 2002., Ho i Song, 2003).

Našim ispitivanjima (Petrović i sar. 2006) je ustanovljeno da su nakon pravilne terapijske upotrebe enrofloksacina rezidue prisutne u mesu i jetri živine u nedozvoljenim količinama do četvrtog dana karence (grafikon 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 (Consleg, 2002).

Tokom pet dana aplikovanja leka, 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).

Grafikon 1. Količina rezidua (ng/g) u mesu i jetri pilića tretiranih propisanim dozama enrofloksacina (rezidue su izražene kao suma enrofloksacina i ciprofloksacina) (Petrović i sar. 2006)



FLORFENIKOL

Florfenikol je sintetički antibakterijski lek širokog spektra koji je strukturno sličan sa D(-)treo hloramfenikolom ali se od njega razlikuje zbog prisustva p-metil sulfonil grupe umesto p-nitro grupe i prema prisustvu atoma fluora umesto hidroksi grupe. Florfenikol inhibira aktivnost peptidil transferaze posebno na 70 S ribozoma. Sojevi bakterija koji su visoko rezistentni prema hloramfenikolu i tiamfenikolu zbog produkcije acetiltransferaze su visoko senzitivni prema florfenikolu. (EMEA, 1999).

Toksični efekti florfenikola su vezani za hematološke parametre, atrofiju testisa, hepatomegaliju, poremećaje osifikacije takođe on može dovesti do naglog pada unosa vode i hrane, gubitka težine i razmekšavanja fecesa. Florfenikol nije geno-, embrio- i fetotoksičan. Obzirom da je florfenikol po svojoj strukturi sličan hloramfenikolu razmatrana je mogućnost pojave aplastične

anemije uzrokovane ovim lekom. Na osnovu epidemioloških podataka nije se moglo sa sigurnošću da se utvrdi da li je ovaj lek u potpunosti bezbedan i zato nije odobren za upotrebu u humanoj medicini. Ipak smatra se da je vrlo mala verovatnoća da će rezidue ovog leka nastale posle primene u veterini dovesti do ozbiljnih promena u koštanoj srži kod potrošača. (EMEA,1999).

Florfenikol se brzo absorbuje posle oralne aplikacije kod živine, dobro se distribuira u tkivima i najviše ga ima u jetri zatim bubrežima, koži i masnom tkivu, dok ga u mesu ima oko deset puta manje nego u jetri. Metaboliti florfenikola, florfenikol-amin i florfenikol-alkohol su sukcesivno 90 odnosno 30 puta manje mikrobiološki aktivni od florfenikola dok florfenikol-oksamidna kiselina nije u opšte aktivana. Glavni način eliminacije je urin. Florfenikol se iz organizma živine brzo izlučuje i 24 h od prekida terapije nestaje iz mesa, kože i masnog tkiva. Posle uobičajenog načina doziranja, trećeg dana karence pada ispod MDK. Iz jetre u potpunosti nestaje sedam dana od prekida tretmana dok se u bubrežima još uvek može dokazati (EMEA,1999).

MDK vrednosti se izražavaju za sumu florfenikola i njegovih metabolita izmerenih kao florfenikol-amin. MDK za živinsko mesu je 100 ng/g a za jetru 2500 ng/g dok je njegova upotreba zabranjena kod koka nosilja (EMEA, 1999).

U našoj zemlji upotreba antimikrobnih lekova je vrlo liberalna i zato se javljaju različiti vidovi nepravilne upotrebe: upotreba od strane nestručnih lica, kod oboljenja ili životinjskih vrsta za koje nisu namenjeni, a naročito subdoziranje, neadekvatna dužina aplikovanja leka, upotreba antimikrobnih lekova kao prečice za rešavanje uzgojnih problema. Tokom karence rezidue antimikrobnih lekova su prisutne u jestivim tkivima u nedozvoljenim količinama. Nakon isteka ovog perioda rezidue su još uvek prisutne ali u bezbednim koncentracijama. Kod nepravilne upotrebe antimikrobnih lekova nemoguće je ispoštovati period karence a samim tim javlja se rizik od plasmana higijenski neispravnog mesa na tržištu.

ZAKLJUČAK

Poštovanje profilaktičkih mera u objektima za držanje živine smanjuje pojavu oboljenja kod živine i potrebu za lečenjem. Ukoliko je terapija neophodna poštovanjem propisanog načina tretiranja živine može se kontrolisati rizik – rezidue antimikrobnih lekova u jestivim tkivima. Dobra proizvodna praksa ima primenu u svakom koraku, od proizvodnje životinja do konzumiranja hrane. Pravilna primena ovih mera može značajno umanjiti rizik. Na ovaj način ističe se veliki značaj primarne proizvodnje u lancu hrane. 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 i smanjuje rizik od pojave rezidua.

LITERATURA

1. Weiss C., A. Conte, C. Milandri, G. Scortichini, P. Semprini, R. Usberti, G. Migliorati: Veterinary drugs residue monitoring in Italian poultry: Current strategies and possible developments. *Food Control*, 18, 9, 1068-1076, 2007.
2. Endtz H.Ph., G.J. Ruijs, B. Van Klingeren, W.H. Jensen, T. Van der Reyden and R.P. Mouton: Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 27, pp. 199-208, 1991
3. Kabir J., V.J. Umoh, E. Audu-okoh, J.U. Umoh and J.K.P. Kwaga: Veterinary drug use in poultry farms and determination of antimicrobial drug residues in commercial eggs and slaughtered chicken in Kaduna State, *Nigeria Food Control* 15, pp. 99-105, 2004.
4. Mitema E.S., G.M. Kikuvu, H.C. Wegener and K. Stohr: An assessment of antimicrobial consumption in food producing animals in Kenya, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy* 24, pp. 385-390, 2001
5. Appelbaum P., Hunter P.: The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J of Antimicrob agents* 16, 5-15, 2000.
6. Anadon A., Martinez-Larranaga M., Diaz M., Velez C., Bringas P.: Pharmacokinetics and residue studies of quinolone compounds and olaquinoxid in poultry. *Ann Rech Vet, suppl 1*, 137-144, 1990.
7. Prescott J., Baggot J., Walker R.: Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Third Edition. Iowa State University Press/ Ames, 2000.
8. Soliman G.: Tissue distribution and disposition kinetics of enrofloxacin in healthy and E. coli infected broilers *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 107, 1, 23-27, 2000.
9. Less P., Aliabadi F.: Rational dosing of antimicrobial drugs: animal versus humans. *Int J of Antimicrobial Agents* 19, 269-284, 2002.
10. Martinez M., McDermott P., Walker R.: Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *The Vet Journal*, 25, 2, 53-62. 2005.
11. EMEA. Committee for veterinary medicinal products. Enrofloxacin. Summary report (2). *EMEA/MRL/388/98-FINAL, July, 1998*
12. EMEA. Committee for veterinary medicinal products. Florfenicol. Summary report (1). 1999. *EMEA/MRL/388/98-FINAL, July, 1998*
13. EMEA. Committee for veterinary medicinal products. Florfenicol. Summary report (3). *EMEA/MRL/388/98-FINAL, July, 1999*
14. Domagala J.: Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother* 33, 4, 685-706, 1994.

15. Klecak G., Urbach F., Urwyler H. Fluoroquinolone antibacterials enhance UVA-induced skin tumors. *J Photochem Photobiol B: Biology* 37, 174-181
16. Tokura K.: Quinolone photoallergy: Photosensitivity dermatitis induced by systematic administration of photohaptenic drugs. *J Dermatol Sci* 18,1-10, 1998.
17. Kashida Y., Kato M.: Toxic effects of quinolone antibacterial agents on the musculoskeletal system in juvenile rats. *Toxicol Pathol*, 25, 6, 635-643, 1997.
18. 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.
19. Stahlmann R.: Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. *Toxicol Lett*, 127, 1-3, 269-77, 2002.
20. Nagai A., Miyazaki M., Morita T., Furubo S., Kizawa K., Fukumoto H., Sanzen T., Hayakawa H., Kawamura Y.: Comparative articular toxicity of garenoxacin, a novel quinolone antimicrobial agent, in juvenile beagle dogs. *J Toxicol Sci*, 27,3, 219-28, 2002.
21. Ho D., Song J., Wang C.: Anaphylactoid reaction to ciprofloxacin. *Ann Pharmacother*. 37,7, 1018-1023, 2003.
22. Consleg system of the Office for Official Publications of the European Communities. *Consolidated text. Consleg* R1181-05/07, 2002.
23. Teh W.L. i Rigg A.S.: Possible penicillin allergy after eating chicken. *Lancet ii*, 1632, 1992.
24. WHO. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Thirty fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Technical Report Series*, No. 788, Geneva, 1989.
25. Petrović J., Baltić M., Stefanović S., Stojanović D. Residues of enrofloxacin and its main metabolite ciprofloxacin in broiler Chickens. *Acta Veterinaria*, str. 497-506, 2006
26. Resurreccion A.V.A., Galvez F.C.V.: Will consumers buy irradiated beef? *Food Technol*. 53:52-55, 1999.

Primljeno: 25.12.2010.
Odobreno: 20.02.2011.

Originalni naučni rad

UDK 619: 616.12-008:636.7

PROMENE KARDIOVASKULARNOG SISTEMA PASA USLOVLJENE STARENJEM

Spasojević-Kosić Ljubica¹ *, Trailović Dragiša R.²

¹Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Departman za veterinarsku medicinu,
Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad

²Fakultet veterinarske medicine, Bulevar oslobođenja 18, Beograd

Kratak sadržaj

Poznavanje karakteristika starenja i promena kardiovaskularnog sistema pasa, izazvanih starenjem, pomažu kliničarima u postavljanju dijagnoze, ali i odgajivačima u definisanju prioriteta za preduzimanje profilaktičkih mera. Proučavanje starenja pasa predstavlja paradigmu u biomedicinskim istraživanjima. Starenje dovodi do brojnih promena kardiovaskularnog sistema koje mogu da se sagledaju morfološki, funkcionalno, sa endokrinog, genetskog aspekta i kao biohemijske promene. Kompleksnost aspekata procesa starenja otvara brojne dijagnostičke mogućnosti njihovog registrovanja, terapijskih procedura, ali i preventivnih postupaka. U ovom radu je poseban akcenat stavljen na promene kardiovaskularnog sistema izazvane starenjem koje se klinički mogu registrovati ili na koje se može uticati terapijom ili profilaksom.

Ključne reči: starenje, kardiovaskularni sistem, psi

CHANGES UN CARDIOVASCULAR SYSTEM OF DOGS DUE TO AGEING

Spasojević Kosić Ljuica¹, Trailović Dragiša R.²

¹Agricultural faculty Novi Sad, Department for veterinary medicine, Novi Sad

²Faculty of veterinary medicine, Beograd

Abstract

The characteristics of aging and the changes of cardiovascular system with aging are important in clinical decision making and in designing preventive measures. Studies of aging in dogs represent paradigm in biomed-

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

cal researches. Aging leads to numerous changes of cardiovascular system, which could be looked from morphological, functional, endocrinological, genetic and biochemical points of view. These aspects of aging enable many diagnostic procedures, therapeutic procedures and preventive measures as well. In this paper special emphasis was put on changes of cardiovascular system, caused by aging, which are clinically free to registered or may be affected by therapy or prophylaxis.

Key words: aging, cardiovascular system, dogs

UVOD

Era poznavanja genoma pasa nameće populacionu statistiku zdravstvenog stanja i oboljenja kao krucijalni deo strategije gajenja i programa unapređenja zdravstvenog stanja rasa (Egenvall i sar., 2005; Bonnett i sar., 2005). Bez sumnje, gajenje određenih rasa pasa ima uticaj na opšte zdravlje celokupne populacije pasa i praćenje njihovih naslednih oboljenja (Ott, 1996). Sa druge strane, poboljšanje ukupnog zdravlja i dobrobiti u populaciji pasa zahteva da kvantifikujemo i pratimo bolesti i uzroke smrti među različitim rasama. Informacije koje se odnose na očekivanu dužinu života i postojanje rizika za određena oboljenja pojedinih rasa treba da su dostupna budućim vlasnicima. Donošenje odluka, koje se odnose na uvođenje i korišćenje visoko invazivnih i skupih veterinarskih procedura kod starijih pasa, treba da obuhvati razmatranje i verovatne dužine i kvaliteta života koji se mogu očekivati kod pojedinih rasa.

Osim toga, pas (*Canis familiaris*) je jedna od primarnih vrsta sisara koje se koriste za komparativna biomedicinska istraživanja (Patronek i sar., 1997). U tom smislu su psi kućni ljubimci naročito pogodni kao model za proučavanje starenja kod ljudi iz nekoliko razloga. Psi – kućni ljubimci žive u istoj životnoj sredini kao i ljudi. Obzirom na viši nivo veterinarskih usluga, koje se koriste kod pasa, na raspolaganju stoji obimna medicinska dokumentacija (klinička, biohemijska i patološka ispitivanja, imidžing dijagnostika). Na kraju, niz fenotipskih domena se može tačno proceniti kod pasa, od funkcije određenih organa, preko kvaliteta života i interakcije sa ljudima (Waters, 2011).

Starenje pasa

Znatan napredak u medicini i hirurgiji, ishrani i preventivnoj zdravstvenoj nezi tokom poslednjih nekoliko decenija produžio je životni vek kod pasa. Različite rase stare različitom brzinom, iako kod mnogih rasa mortalitet počinje da raste oko šeste, sedme godine života (Egenvall i sar., 2000; 2005). Ne postoji

prihvaćen nivo starosti prema kome psa svrstavamo u odraslu ili gerijatrijsku kategoriju. Nije pogodno smatrati da psi različitih rasa imaju istu biološku starost ili sličan rizik za bolesti uslovljene starošću, zbog neslaganja među različitim rasama u procentu mortaliteta u određenom životnom dobu.

Za razliku od drugih vrsta sisara, veličina tela kod pasa je obrnuto srazmerna njihovoj dužini života. U okviru kategorije pasa iste telesne mase, dužina života je veća kod pasa čistih rasa nego kod mešanaca. Među psima kao vrstom, mali psi imaju brži metabolizam i kraći period metaboličkog sazrevanja nego veliki psi. Predviđa se da bi laboratorijska istraživanja mogla da ispituju biološku osnovu razlike u dužini života među psima u vezi sa rasom i telesnom masom (Patronek i sar., 1997).

Uz postojanje razlike između rasa, smrtnost usled različitih uzroka varirira sa starošću i polom kod pasa (Egenvall i sar., 2005; Bonnett i sar., 2005). Nekoliko studija (Bonnett i sar., 1997; Bronzon, 1982; Michell, 1999) je pokazalo da su tumori najčešći uzrok smrti kod pasa. Prema studiji koja je izvedena na 9248 pasa (Eichelberg, Seine, 1996), srčana i cirkulatorna oboljenja su na drugom mestu kao uzrok smrti kod pasa, sa zastupljenošću od 16,3%. Što se tiče rizika od smrtnog ishoda čiji je uzrok izvesno srčano oboljenje, irski vučji hrt i nemačka doga imaju najveći rizik od 20 rasa koje su obuhvaćene ispitivanjem. Srčana oboljenja kod King Čarls španijela u preko 50% slučajeva predstavljaju uzrok smrti za pse ispod 10 godina starosti, što čini preko 1/4 smrtnog ishoda zbog srčanih problema u celokupnoj ispitivanoj populaciji od preko 350000 pasa (Egenvall i sar., 2005; Bonnett i sar., 2005). Rasa, starost i pol pasa utiču na mortalitet nastao zbog srčanog oboljenja. Oboljenje srca kao uzrok smrti kod pasa mlađih od 10 godina je najčešći prisutno kod pomenute tri rase: irski vučji hrt, King Čarls španijel, nemačka doga (Egenvall i sar., 2006). Drugo veliko ispitivanje, sprovedeno na 80306 pasa pripadnika 82 rase, je pokazalo da su oboljenja kardiovaskularnog sistema vodeći uzrok smrti kod bernskog planinskog psa, čivave, dobermana, foksterijera, malteškog i njufaundlandskog psa (Fleming i sar., 2011).

Strukturne i funkcionalne promene kardiovaskularnog sistema uslovljene starošću

Generalno uzevši, proces starenja je povezan sa strukturnim i funkcionalnim promenama kardiovaskularnog sistema, koje su lokalizovane na srčanom mišiću, valvulama, sprovodnom sistemu srca i velikim arterijama. Ovakve promene imaju za posledicu različite manifestacije bolesti kod gerijatrijskih pacijenata u odnosu na mlade pacijente. Da bi se postavila dijagnoza "ostarelog srca" kod starih pacijenata, suočeni smo sa teškoćama zbog atipičnih simptoma ili prihvatanja simptoma kao manifestacije starog životnog doba. Starenje

je, štaviše, često praćeno padom fizičke aktivnosti, što može da ima za posledicu "gubitak kondicije" kardiovaskularnog sistema (Cafagna, Ponte, 1997).

Starenje kod pasa se karakteriše promenama kardiovaskularne funkcije koje obuhvataju smanjenje krvotoka i brzine protoka krvi, smanjenje arterijske elastičnosti (komplijanse) i rastegljivosti (Miller i sar., 1976; Haidet, 1993a; Haidet i sar., 1996), kao i povećanje sistemskog vaskularnog otpora i smanjenje minutnog volumena srca (Haidet i sar., 1996). Smanjenje kontraktilnosti miokarda, povećanje sistolne i dijastolne krutosti leve komore i produženo trajanje kontrakcije zapaženo je kod biglova kao posledica starosti (Templeton i sar., 1976; 1979). Progresivni gubitak rezerve i adaptibilnosti organa, verovatno zbog funkcionalnih promena adrenergičkog nervnog sistema predstavlja, najverovatnije, početni mehanizam za nastanak kardiovaskularnih oboljenja kod starijih pasa (Strasser i sar., 1997). Smanjeni odgovor kardiovaskularnog sistema na stimulaciju α i β (alfa i beta) adrenergičkih receptora takođe je dokazana kod starih pasa (Yin i sar., 1979; Haidet 1993b). Starenje dovodi do smanjenja maksimuma frekvencije srca tokom fizičkog opterećenja. Smanjenje hronotropnog odgovora sa starošću nastaje zbog smanjene osetljivosti kardiovaskularnog sistema na stimulaciju β adrenergičkih receptora, a ne zbog smanjenog odgovora pejsmejker ćelija na direktnu električnu stimulaciju (Yin i sar., 1979).

Tačnu vezu između pomenutih negativnih modifikacija kardiovaskularne funkcije, koje se dešavaju sa starošću i razvoja specifičnih kardiovaskularnih oboljenja je teško potvrditi (Guglielmini, 2003). Sa starošću povezane promene u strukturi i funkciji srca mogu da smanje prag za pojavu kliničkih simptoma bolesti. Kod ljudi postoji kontinuiranost u ispoljavanju strukturnih i funkcionalnih promena na srcu, što se manifestuje povećanom učestalošću hipertrofije leve komore, srčane insuficijencije i atrijske fibrilacije sa starenjem (Lakatta i Levy D., 2003).

Iako je postojanje funkcionalnih modifikacija kardiovaskularnog sistema sa starenjem pokazano kod anesteziranih i neanesteziranih pasa pod eksperimentalnim uslovima (Miller i sar., 1976; Haidet i sar., 1993a; Haidet i sar., 1996; Templeton i sar., 1976; Templeton i sar., 1979; Strasser i sar., 1997), obimna klinička ispitivanja kod pasa nisu obavljena. Predispozicija pojedinih rasa za određena stečena srčana oboljenja nameće potrebu da se klinička ispitivanja sprovedu kod pasa koji pripadaju istoj rasi. Ispitivanje sprovedeno na zdravim nemačkim ovčarima različite starosti je pokazalo povećanje debljine zida leve komore koje je moglo da se registruje ehokardiografski (Spasojević-Kosić, 2008).

Nedavno sprovedeno ispitivanje ukupnog preovladavanja patoloških poremećaja na srcu kod biglova je pokazalo da je valvularna endokardioza najčešće primećena srčana lezija, a slede je različite alteracije koje se dešavaju sa nižom

frekvencijom, kao što su endokarditis, degeneraciju miokarda, hipertrofiju miokarda, dilataciju komora (srčanih šupljina), kalcifikaciju miokarda, fibrozu miokarda, nekrozu miokarda, primarne i sekundarne neoplazije (Van Vleet, 2001).

Kardiovaskularna oboljenja koja preovlađuju kod starijih pasa su hronično degenerativno oboljenje valvula (CDVD) ili valvularna endokardioza, sekundarna hipertrofija miokarda, dilataciona kardiomiopatija (DCM), neoplazije srca, amilodosis, valvularni endokarditis, lipofuscinosis, sindrom bolesnog sinusa i druge miokardijalne i vaskularne lezije (Guglielmini, 2003). Pored toga, kardiopulmonalne manifestacije često prate sistemske bolesti (Miller i sar., 1989).

Endokrini aspekt starenja

Hipertenzija i starenje imaju slične efekte na strukturu i funkciju krvnih sudova i srca. Oba procesa dovode do smanjenja vaskularne elastičnosti (komplijanse), disfunkcije endotela, hipertrofije i krutosti leve komore. Zbog toga se javila ideja da oba procesa mogu da imaju iste ili zajedničke uzroke (Booz, 2005). Ideja da je angiotenzin II (AII) veza između starenja i hipertenzije, sugerisana je kao posledica dokaza da inhibitori reninangiotenzin sistema (RAS), pored toga što su značajni u tretmanu kardiovaskularnih i renalnih oboljenja, štite kardiovaskularni sistem, bubrege i mozak od štetnih efekata starenja (Basso i sar., 2005). Prekomerna aktivacija RAS ubrzava starenje srca, proces koji se sastoji od hipertrofije ćelija miokarda, kapilarne rarefakcije, fibroze i ventrikularnog remodeliranja (Kim, Iwao, 2000).

Kao odgovor na povećanje pritiska i istezanje srčanih šupljina dolazi do sinteze natrijumuretičnih peptida (atrijalni – ANP, moždani – BNP). Atrijalni natrijumuretični peptid (ANP) se sintetiše u pretkomorama zdravih pasa. Natrijumuretični peptid A se u obliku prepro-ANP forme pojavljuje kod fetalnih komornih miocita, ali ne i kod odraslih, osim kada postoji hipertrofija i oštećenje srca. Kod pasa sa hipertrofijom srca i kardiomiopatijom, količina ANP i ANP-specifične mRNA je redukovana u pretkomorama, a povećana u komorama (Colbatzky i sar., 1993). Pod normalnim okolnostima, kod zdravih pasa srčani BNP, iRNK i BNP tkiva srca je atrijalnog porekla. U ranoj disfunkciji leve komore, BNP iRNK i tkivni BNP su značajno povećani u levoj pretkomori zajedno sa povećanjem cirkulirajućeg BNP, ali ostaje ispod granica ili pri granici detekcije u levoj komori. Kod manifestne srčane insuficijencije, BNP iRNK se dalje povećava u levoj pretkomori i u levoj komori zajedno sa povećanjem tkivnog BNP leve komore i daljeg povećanja cirkulirajućeg BNP (Luchner i sar., 1998). Natrijumuretični peptidi A i B deluju kao srčani hormon sa raznovrsnim fiziološkim dejstvima uključujući natrijumurezu, diurezu, vazorelaksaciju i inhibiciju sekrecije renina i aldosterona (Nakao i sar., 1992).

Ispitivanje na zdravim psima rase King Čarls španijel, rase sa predispozicijom za mitralnu regurgitaciju, je pokazalo da starenje ima jak pozitivan uticaj na koncentraciju NT-ANP, dok povećanje telesne mase prouzrokuje umereno smanjenje NT-ANP. Promene u koncentraciji BNP plazme nisu u korelaciji sa starošću pasa (Eriksson i sar., 2001). Ispitivanje sprovedeno na zdravim nemačkim ovčarima je takođe pokazalo da ne postoji korelacija između starosti i koncentracije BNP (Spasojević Kosić, 2008). Kod ljudi se, međutim, koncentracija BNP u plazmi povećava sa starošću (Sayama i sar., 1999), što se pripisuje smanjenoj funkciji bubrega i srčanoj hipertrofiji bez ispoljene srčane insuficijencije.

Genetski aspekt starenja

Vaskularne glatkomišićne ćelije koje su stimulisane angiotenzinom II ispoljavaju povećanu ekspresiju proteina p66Shc (Yoshizumi i sar., 2001). Ovaj protein postoji u 3 izoforme sa odnosnom molekularnom masom od 46, 52, i 66 kDa (P46Shc, P52SHC, P66Shc) i zasebnim fiziološkim ulogama. Dok P46Shc i P52Shc unapređuju proliferaciju i diferencijaciju ćelija, P66Shc je ključni faktor u kontroli procesa u vezi sa starenjem. Miševi bez ovog proteina (p66Shc^{-/-}) pokazuju povećanu ćelijsku rezistentnost na oksidativni stres i produženje života za 30% (Migliaccio i sar., 1997; Migliaccio i sar., 1999). Koristeći genetski modifikovane miševe (miševi kojima nedostaje gen za protein P66Shc), postavljena je hipoteza da p66Shc učestvuje u kaskadnim reakcijama dovodeći do ventrikularnog remodeliranja indukovano AII. Rezultati su pokazali da se prekidanje P66Shc suprotstavlja AII-indukovanoj hipertrofiji miokarda i da štiti srčane i endotelijalne ćelije od apoptoze (Graiani i sar., 2005).

Ćelije miokarda normalno ispoljavaju malo p66Shc, ali njegov nivo se povećava kod dilatacione miopatije srca pasa indukovane stimulacijom komora (ventrikularni pejsing) (Cesselli i sar., 2001). Interesantno je, takođe, da su sve tri Shc izoforme aktivirane u humanom fetalnom srcu, u periodu koji karakteriše apoptoza i proliferativni procesi (Fiorina i sar., 2004). Apoptoza participira u intrauterinom i ranom postgestacionom razvoju srca (Kajstura i sar., 1995; Fiorina i sar., 2004), a sve komponente RAS su izražene od strane fetalnog srca i učestvuju u njegovom normalnom razvoju (Lamparter i sar., 1999; Price i sar., 1997).

Postavlja se pitanje razloga postojanja ekspresije proteina p66Shc, ako je on štetan za srce? Objašnjenje koje su ponudili Graiani i saradnici (Graiani i sar., 2005) je da p66Shc može da igra ulogu u normalnoj apoptozi u srcu tokom njegovog razvoja. U ovom kontekstu, povećana p66Shc ekspresija može da bude protumačena kao još jedna manifestacija parcijalnog i uzaludnog po-

vratka na fetalni fenotip, koji je primećen u ćelijama miokarda kao odgovor na stres. Reaktivacija lokalnog srčanog RAS ili ekspresije angiotenzinogena, izgleda da je takođe deo ovakvog neuspelog fetalnog reprogramiranja. U toku razvoja srca, p66Shc i lokalni RAS mogu zajedno da pomažu u kontroli celularne proliferacije delimično preko apoptoze; međutim, re-ekspresija p66Shc i lokalnog RAS nema takvu prednost kod zrelog srca, koji se sastoji uglavnom od terminalno diferenciranih ćelija miokarda nesposobnih za ponovni ulazak u ćelijski ciklus, ali podložnih apoptozi (Booz, 2005).

Biohemijske promene na srcu uslovljene starenjem

Srčane performanse su usko povezane sa korišćenjem kiseonika od strane mitohondrija, zato što mitohondrije čine preko 1/3 zapremine ćelija srca i skoro u potpunosti podržavaju energetske zahteve za srčanom kontrakcijom. Sinteza ATP i homeostaza Ca^{2+} , procesi tako značajni za preživljavanje ćelije, zavise od mitohondrija, transportnih sistema u membrani mitohondrija i membranskog potencijala preko unutrašnje membrane mitohondrija (Gunter, Pfeifer, 1990).

Sadržaj fosfolipida membrane mitohondrija menja se ishranom i starenjem. Povećanje vremena diastolne relaksacije kod starijih jedinki u odnosu na mlađe može da bude delimično vezano za redukovanu sposobnost Ca^{2+} - pumpe sarkoplazmatkog retikuluma i Na^{+} - Ca^{2+} izmene starijeg srca da ekstrahuje Ca^{2+} iz citosola (Narayanan, 1981; Heylinger i sar., 1988, 1989; Josephson i sar., 1991). Akumulacija kalcijuma u citosolu ćelija miokarda ima glavnu ulogu u genezi malignih aritmija (Billman i sar., 1991; Billman, 1992; Lee i Allen, 1991; Opie i du Troit., 1992).

Dokazano je smanjenje odnosa ω -3/ ω -6 nezasićenih masnih kiselina mitohondrijalne membrane, kao i smanjenje mitohondrijalnog fosfolipida u srcu starijih pacova (McLennan i sar., 1989; Pepe i sar., 1999). U izolovanim ćelijama miokarda komora srca, akutno dodavanje ω -3 nezasićenih masnih kiselina u medijum štiti od prepunjenosti Ca^{2+} (Halaq i sar., 1992). Mehanizam ovakvog delovanja u vezi je sa direktnim efektima ω -3 nezasićenih masnih kiselina na svojstva L-tipa kalcijumovih kanala (Pepe i sar., 1994; Bogdanov i sar., 1998). Osim toga, infuzija ω -3 nezasićenih masnih kiselina značajno povećava PR interval elektrokardiograma, koji odražava provodljivost impulsa kroz atri-oventrikularni (AV) čvor, a koji zavisi od ulaska Ca^{2+} u ćeliju (Billman, 1992). Zapaženo je da ω -3 nezasićene masne kiseline redukuju srčanu frekvencu, čime indirektno štite od ishemičnih aritmija preko smanjenja srčanog metabolizma i obezbeđivanja vremena da se visok nivo kalcijuma iz citosola ukloni. Na modelu infarkta kod neanestetisanih pasa, eksperimentalno indukovana

akutna ventrikularna fibrilacija može da se spreči prethodnom intravenskom infuzijom emulzije ω -3 nezasićenih masnih kiselina (Billman i sar., 1994).

Smanjenje količine ω -3 nezasićenih masnih kiselina u ćelijskim membrama miokarda sa starenjem može da dovede do povećane vulnerabilnosti ćelija prema prepunjenosti jonima kalcijuma. Osetljivost miokarda naročito može da bude izražena u stanjima kao što su težak rad, ishemija i reperfuzija ili oksidativni stres. Dijeta bogata u ω -3 nezasićenim masnim kiselinama direktno modulira odnos ω -3 / ω -6 nezasićenih masnih kiselina membrane mitohondrija i sadržaj kardiolipina, slabi promene koje se javljaju u ćelijskoj membrani sa starenjem i utiče na procese u ćelijama zavisne od jona kalcijuma. Na taj način, dijeta bogata u ω -3 nezasićenim masnim kiselinama menja uticaj ishemije i reperfuzije na ćelije "ostarelog" srca (Pepe, 2000).

Literatura

1. Basso N., Paglia N., Stella I., de Cavanagh E.M., Ferder L., del Rosario Lorez Arnaiz M., Insera F.: Protective effect of the inhibition of the renin-angiotensin system on aging. *Regul Pept*, 128, 247–252, 2005.
2. Billman G.E., Hallaq H., Leaf A.: Prevention of ischemia-induced ventricular fibrillation by ω 3 fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 4427–4430, 1994.
3. Billman G.E., McIlroy B., Johnson J.D.: Elevated myocardial calcium and its role in sudden cardiac death. *FASEB J*, 5, 11, 2586–2592, 1991.
4. Billman G.E.: Cellular mechanisms for ventricular fibrillation. *News Physiol Sci*, 7, 254–259, 1992.
5. Billman G.E.: Ro 40-5967, a novel calcium channel antagonist protects against ventricular fibrillation. *Eur J Pharmacol*, 229, 2–3, 179–187, 1992.
6. Bogdanov K., Spurgeon H., Vinogradova T., Lakatta E.: Modulation of the transient outward current in adult rat ventricular myocytes by polyunsaturated fatty acids. *Am. J Physiol*, 274, 571–579, 1998.
7. Bonnett B.N., Egenvall A., Hedhammar A., Olson P.: Mortality in over 350000 Insured Swedish dogs from 1995 - 2000: I Breed-, Gender-, Age- and cause-specific rates. *Acta Vet Scand*, 46, 3, 105–120, 2005.
8. Bonnett B.N., Egenvall A., Olson P., Hedhammar A.: Mortality in insured Swedish dogs: rates and diagnostic category of death in various breeds. *Vet Rec*, 141, 40–44, 1997.
9. Booz G.W.: Growing old, angiotensin II, cardiac hypertrophy and death, making connection with p66Shc, Editorial Commentary. *Hypertension*, 46, 259–260, 2005.
10. Bronzon R.T.: Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am J Vet Res*, 43, 2057–2059, 1982.

11. Cafagna D., Ponte E.: Morphological and functional aspects of the cardiovascular system related to aging: does "aging heart" exist?. *Minerva Med*, 88,12, 491-500, 1997.
12. Cesselli D., Jakoniuk I., Barlucchi L., Beltrami A.P., Hintze T.H., Nadal-Ginard B., Kajstura J., Leri A., Anversa P.: Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res*, 89, 279 - 286, 2001.
13. Colbatzky F., Vollmar A., Monch U., Hermanns W.: Synthesis and distribution of atrial natriuretic peptide (ANP) in hearts from normal dogs and those with cardiac abnormalities. *J Comp Pathol*, 108, 149-163, 1993.
14. Egenvall A., Bonnett B.N., Haggstrom J.: Heart disease as a cause of death in insured Swedish dogs younger than 10 years of age. *J Vet Intern Med*, 20,4, 894 -903, 2006.
15. Egenvall A., Bonnett B.N., Hedhammar A., Olson P.: Gender, age, breed and geographic pattern of morbidity and mortality in insured dogs during 1995 and 1996. *Vet Rec*, 146, 519-525, 2000.
16. Egenvall A., Bonnett B.N., Hedhammar A., Olson P.: Mortality in over 350000 Insured Swedish dogs from 1995 - 2000: II Breed - specific age and survival patterns and relative risk for cause of death. *Acta Vet Scand*, 46, 121-136, 2005.
17. Eichelberg H., Seine R.: Life expectancy and expectancy and cause of death in dogs. I. The situation in mixed breeds and various dog breeds. *Berliner Munchner Tierarzliche Wochenschrift*, 109, 292-303, 1996.
18. Eriksson A.S., Jarvinen A.-K., Eklund K.K., Vuolteenaho O.J., Toivari M.H., Neiminen M.S.: Effect of age and body weight on neuromuscular variables in healthy Cavalier King Charles Spaniels. *Am J Vet Res*, 62,11, 1818-1824, 2001.
19. Fiorina P., Corradi D., Pinelli S., Maestri R., Lagrasta C., Buscaglia M., Davalli A., Folli F., Astorri E.: Apoptotic/myogenic pathways during human heart development. *Int J Cardiol*, 96, 409-417, 2004.
20. Fleming J.M., Creevy K.E., Promislow D.E.L.: Mortality in North American dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *J Vet intern Med*, 25, 187-198, 2011.
21. Graiani G., Lagrasta C., Migliaccio E., Spillmann F., Meloni M., Mededdu P., Quiani F., Padura I.M., Lanfranccone L., Pelicci P.G., Emanuelli C.: Genetic deletion of the p66Shc adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage. *Hypertension*, 46, 433-440, 2005.
22. Guglielmini C.: Cardiovascular diseases in the aging dog: diagnostic and therapeutic problems. *Veterinary Research Communications*, Kluwer Academic Publishers, Netherland, 27 Suppl 1, 555-560, 2003.

23. Gunter T.E., Pfeiffer D.R.: Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, 258, 755–786, 1990.
24. Haidet G.C., Wennberg P.W., Finkelstein S.M., Morgan D.J.: Effects of aging per se on arterial stiffness: systemic and regional compliance in beagles. *Am Heart J*, 132, 319–327, 1996.
25. Haidet G.C.: Alpha-adrenergic-mediated reflex responses to induced muscular contraction are changed with age in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 265, 6, 1899–1908, 1993b.
26. Haidet G.C.: Effects of age on beta-adrenergic-mediated reflex responses to induced muscular contraction in beagles. *Mechanisms of aging and development*, 68, 89–104, 1993a.
27. Halaq H., Smith T., Leaf A.: Modulation of dihydropyridine-sensitive calcium channels in heart cells by fish oil fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1760–1764, 1992.
28. Heylinger C., Prakash A., McNeil J.: Alterations in membrane Na^+ - Ca^{2+} exchange in the aging myocardium. *Age*, 11, 1–6, 1988.
29. Heylinger C., Prakash A., McNeil J.: Effect of calmodulin on sarcoplasmic reticular Ca^{2+} transport in the aging heart. *Mol Cell Biochem*, 85, 75–79, 1989.
30. Josephson R., Silverman H., Lakatta E., Stern M., Zweier J.: Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 266, 2354–2361, 1991.
31. Kajstura L., Mansukhani M., Cheng W., Reiss K., Krajewski S., Reed J.C., Quiani F., Sonnenblick E.H., Anversa P.: Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res*, 219, 110–121, 1995.
32. Kim S., Iwao H.: Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol rev*, 52, 11–34, 2000.
33. Lakatta E.G., Levy D.: Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises, part II: The aging heart in health: link to heart disease. *Circulation*, 107, 346–354, 2003.
34. Lamparter S., Sun Y., Weber K.T.: Angiotensin II receptor blockade during gestation attenuates collagen formation in the developing rat heart. *Cardiovasc Res*, 43, 165–172, 1999.
35. Lee J.H., Allen D.G.: Mechanisms of acute ischemic contractile failure of the heart. Role of intracellular calcium. *J Clin Invest*, 88, 2, 361–367, 1991.
36. Luchner A., Stevens T.L., Borgeson D.D., Redfield M., Wei C.M., Porter J.G., Burnett J.C.Jr.: Differential atrial and ventricular expression of BNP during evolution of heart failure. *Am J Physiol*, 274 (Heart Circ Physiol 43), H1684–1689, 1998.

37. McLennan P., Abeywardena M., Charnock J.: The influence of age and dietary fat in animal model of sudden cardiac death. *Aust.NZ J Med*, 19, 1-5, 1989.
38. Michell A.R.: Lonevity of British breeds of dog and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. *Vet Rec*, 145,22, 625-629, 1999.
39. Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., Pelicci G., Reboldi P., Pandolfi P.P., Lanfrancone L., Pelicci P.G.: The p66Shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, 402, 309-313, 1999.
40. Migliaccio E., Mele S., Salcini A.E., Pelicci G., Lai K.M., Superti-Furga G., Pawson T., Di Fiore P.P., Lanfrancone L., Pelicci P.G.: Opposite effects of the p52Shc p46Shc and p66Shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J*, 16, 706-716, 1997.
41. Miller C.W., Nealeigh R.C., Crowder M.E.: Evaluation of the cardiovascular changes associated with aging in a colony of dogs. *Biomed Sci Instrum*, 12, 107-110, 1976.
42. Miller M.S., Tilley L.P., Smith F.W.Jr.: Cardiopulmonary disease in the geriatric dog and cat. *Vet Clin North Am Small Anim pract*, 19,1, 87-102, 1989.
43. Nakao K., Ogawa Y., Suga S., Imura H.: Molecular biology and biochemistry of natriuretic peptide system I: Natriuretic peptides. *J Hypertension*, 10, 907-912, 1992.
44. Narayanan N.: Differential alterations in ATP-supported calcium transport activities of sarcoplasmic reticulum and sarcolemma of ageing myocardium. *Biochim Biophys Acta*, 678, 442-459, 1981.
45. Opie L.H., du Troit E.F.: Post-ischaemic stunning: The two-phased model for the role of calcium as pathogen. *J Cardiovasc Pharm*, 20,Suppl. 5, S1-S4, 1992.
46. Ott R.S.: Animal selection and breeding techniques that create diseased populations and compromise welfare. *J Am Vet Med Ass*, 12, 1969-1974, 1996.
47. Patronek G.J., Waters D.J., Glickman L.T.: Comparative longevity of pet dogs and humans: Implications for gerontology research. *Journal of gerontology Biological sciences*, 52,B171-B178, 1997.
48. Pepe S., Bogdanov K., Hallaq H., Spurgeon H., Leaf A., Lakatta E.: ω 3 polyunsaturated fatty acid modulates dihydropyridine effects on L-type Ca^{2+} channels, cytosolic Ca^{2+} , and contraction in adult rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 8832-8836, 1994.
49. Pepe S., Tsuchiya N., Lakatta E., Hansford R.: PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca^{2+} activation of PDH. *Am J Physiol*, 276, 149-158, 1999.

50. Pepe S.: Mitochondrial function in ischaemia and reperfusion of the ageing heart. *CEPP*, 27, 745–750, 2000.
51. Price R.L., Carver W., Simpson D.G., Fu L., Zhao J., Borg T.K., Terracio L.: The effects of angiotensin II and specific angiotensin receptor blockers on embryonic cardiac development and looping patterns. *Dev Biol*, 192, 572–584, 1997.
52. Sayama H., Nakamura Y., Saito N., Kinoshita M.: Why is the concentration of plasma brain natriuretic peptide in elderly patients greater than normal?. *Coron Artery Dis*, 10, 537–540, 1999.
53. Spasojević-Kosić Lj.: Natrijumuretični peptid B kao biomarker u proceni starenjem izazvanih promena i funkcionalne rezerve srca pasa. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 2008.
54. Strasser A., Simunek M., Seiser M., Hofecker N.G.: Age-dependent changes in cardiovascular nad metabolic responses to exercise in beagle dogs. *Zentrablatt fur Veterinarmedizin*, 44, 449–460, 1997.
55. Templeton G.H., Willerson J.T., Platt M.R., Wiesfeldt M.: Contraction duration and diastolic stiffness in aged canine left ventricle. *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and metabolism*, 11, 169–173, 1976.
56. Templeton G.H., Willerson J.T., Platt M.R., Wiesfeldt M.L.: Influence of aging on left ventricular hemodynamics and stiffness in beagles. *Circ Res*, 44, 189 – 194, 1979.
57. Van Vleet J.F.: Age-related non-neoplastic lesions of the heart. In: Mohr U., Carlton W.W., Dungworth D.L., Benjamin S.A., Capen C.C., Hahn F.F., editors, *Pathobiology of the aging dog*, 2 (Iowa State University Press, Ames), 101–107, 2001.
58. Waters D.J.: Aging research 2011: exploring the pet dog paradigm. *ILAR Journal*, 52, 1, 97–105, 2011.
59. Yin F.C.P., Spurgeon H.A., Greene H.L., Lakatta E.G., Weisfeldt M.: Age-associated decrease in heart rate response to isoproterenol in dogs. *Mechanisms of ageing and development*, 10,1-2, 17–25, 1979.
60. Yoshizumi M., Tsuchiya K., Kirima K., Kyaw M., Suzaki Y., Tamaki T.: Quercetin inhibits Shc- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated c-Jun N-terminal kinase activation by angiotensin II in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 60, 656–665, 2001.

Primljeno: 15.02.2011.

Odobreno: 20.02.2011.

MIKOLOŠKA FLORA KOŽE PASA KAO PROBLEM EKOLOGIJE GRADA⁶

Igor Stojanov **, Dragica Stojanović, Ivan Pušić, Jasna Prodanov-Radulović
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Rumenački put 20, Novi Sad, Serbia

Kratak sadržaj

Kućni ljubimci nose veliki broj različitih mikroorganizama. Neki od njih mogu biti patogeni za ljude jer se radi o patogenima koji su infektivni i za ljude i za životinje, dok drugi predstavljaju posrednu opasnost. Koža je veliki organ sa značajnim funkcijama za organizam. Obzirom na svoj neposredni kontakt sa okolinom može biti površina sa koje se u životnu sredinu u gradovima prenose različiti mikroorganizmi među kojima i saprofitne gljivice. Predmet našeg rada su mikološka ispitivanja krzna, odnosno dlačnog pokrivača pasa sa i bez kliničkih simptoma oboljenja kože. Cilj nam je da utvrdimo koje se vrste saprofitnih gljivica nalaze na koži psa i kakav može biti njihov značaj za ljude. U toku godinu dana na prisustvo gljivica analizirano je 72 uzoraka kože pasa sa promenama i 32 uzorka pasa bez promena na koži. Za mikološka ispitivanja uzeti uzorci su zasejavani na Saburo dekstrozni agar i inkubirani na 25°C, 10 - 21 dana. Izrasle kolonije su identifikovane na osnovu njihovog izgleda i boje, a mikroskopski u odnosu na građu njihovih konidija, makrokonidija i konidijofora. Prisustvo pojedinih gljivica iz spoljne sredine na krznu pasa kod grupe koja je imala promene na koži kretao se između 26,38% do 66,66% dok je u grupi pasa koji su bili bez promena na koži zastupljenost gljivica iz spoljne sredine kretala se od 22,00% do 65,62%. Izolovan je veći broj različitih gljivica: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Mucor* sp. i *Fusarium* sp.

Ključne reči: kućni ljubimci, psi, gljivice, grad

⁶ Rad saopšten na X International Scientific Conference, September, 13th-14th 2010, Nitra

** E mail: igor@niv.ns.ac.rs

MYCOLOGICAL FLORA OF DOG'S SKIN - A PROBLEM OF CITY ECOLOGY

Igor Stojanov, Dragica Stojanović, Ivan Pušić, Jasna Prodanov-Radulović
Scientific Veterinary Institute ²Novi Sad², Rumenački put 20, Novi Sad, Serbia

Abstract

On the surface and inside the body of pets there is a large number of different microorganisms. Some of them are pathogens of humans, and infect both humans and animals, while the others present only an indirect threat for humans. Skin is a large organ that plays an important role. It is in a direct contact with the environment and presents a mean of transmission for the microorganisms that may be transferred to human beings living in the cities. The objective of this paper was to carry out mycological examination of hair from dogs with clinical symptoms of skin diseases. The aim was to determine saprophytic fungi on dog skin and determine how they influence humans. In a one-year period the presence of fungi was analyzed in 72 samples from dogs with skin changes and 32 samples from dogs without lesions. The samples were inoculated on Saburo dextrose agar and incubated at 25°C for 10-21 days. The grown colonies were characterized based on their shape and color, and under a light microscope conidia, macroconidium and conidiophore were identified. On the dogs with lesions, the presence of fungi ranged from 26.38% to 66.66%, but in the group of dogs without lesions fungi were present in 22% to 65.62%. The isolated fungi were identified as: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Mucor* sp. i *Fusarium* sp.

Key words: pets, dogs, fungi, city

UVOD

Gajenje životinja u zatvorenoj sredini, u stanovima i kućama, poznato je još od vremena starog Egipta, kada su se u kućama mogle naći različite vrste "kućnih ljubimaca". Prisustvo pojedinih vrsta velikih mačaka (gepard, tigar, lav) bilo je često samo izraz socijalnog prestiža u okviru društvenih staleža, dok su psi i mačke imali i neposrednu ulogu čuvara kuća ili zaštite od prisustva neželjenih glodara. Međutim da li se tokom razvoja civilizacije menjao, pored samog odnosa ljudi prema "kućnim ljubimcima" i uslovi, odnosno ambijent, u kom su se te životinje i nalazile. Poseban aspekt potrebe za držanjem životinja u uslovima gradske sredine čini se nije doprineo razvoju svesti o mogućem njihovom uticaju na zdravlje ljudi. Grad i stanovnici, koji su inače, zbog struk-

ture urbane sredine i velike koncentracije ljudi na malom prostoru, izloženi povećanoj ekspoziciji različitih agensa, nisu obratili pažnju na zdravstveni značaj kućnih ljubimaca. Zapravo kućni ljubimci su proglašeni za svojevrsnu formu alternativnog lekovitog entiteta za ljude pod stresom u gradskoj sredini, dok slično dejstvo, očigledno je, nije im pripisano u sredinama koje se nazivaju seoskim.

Živi organizmi kućnih ljubimaca na svojoj površini i unutar sebe nose veliki broj različitih mikroorganizama (Barbara Blyskal, 2006). Neki od njih mogu biti patogeni za ljude jer se radi o patogenima koji su infektivni i za ljude i za životinje, dok drugi predstavljaju posrednu opasnost. Koža je veliki organ (Aiello Susan, 1998; Popović N., Lazarević M. 1999) sa značajnim funkcijama za organizam. Obzirom na svoj neposredni kontakt sa okolinom može biti površina sa koje se u životnu sredinu ljudi u gradovima unose različiti mikroorganizmi među kojima i saprofitne gljivice.

Sa obzirom na iznesene činjenice predmet našeg rada su mikološka ispitivanja krzna, odnosno dlačnog pokrivača pasa sa i bez kliničkih simptoma bolesti kože. Cilj nam je da utvrdimo koje se vrste saprofitnih gljivica nalaze na koži psa i kakav može biti njihov značaj za ljude.

MATERIJAL I METODE

Ispitani materijal je bio poreklom od pasa koji su imali različite forme promena na koži i postojala je potreba laboratorijske analize koja bi ukazala na etiologiju bolesti, kao i od pasa sa intaktnim integumentom kože. Mikološki je ispitano 72 uzoraka briseva i skarifikata kože (Cabaness i sar., 1996) pasa sa promenama i 32 uzorka pas bez promena na koži. Za mikološka ispitivanja uzeti uzorci su zasejavani na Saburo dektrozni agar i inkubirani na 25°C, 3-7 dana. Izrasle kolonije su identifikovane na osnovu njihovog izgleda i boje, a mikroskopski u odnosu na građu njihovih konidija, makrokonidija i konidiofora (Quinn et al. 2002).

REZULTATI RADA I DISKUSIJA

Naše ispitivanje obuhvatilo je materijale poreklom od pasa sa i bez promena na koži. Uzorci pasa koji su došli na laboratorijsko ispitivanje zbog promena na koži analizirani su i na moguće prisustvo drugih uzročnika dermatitisa, dok su uzorci pasa sa nepromenjenom kožom ispitani samo na prisustvo gljivica spoljne sredine kako bi se uporednom analizom utvrdilo da li postoji razlika u mikološkoj flori zdravih i bolesnih životinja. Nijedna ispitana životinja nije pripadala psima litalicama već životinjama koje su bile pod kontrolom svojih

vlasnika. U tabeli 1. se nalaze podaci o prisustvo gljivica u obrađenim materijalima.

Tabela 1. Broj i vrsta izolovanih gljivica u ispitanim uzorcima kože psa.

Vrsta izolata	Psi sa promenama na koži		Psi bez promena na koži	
	broj uzoraka	broj pozitivnih (%)	broj uzoraka	broj pozitivnih (%)
Aspergillus sp.	72	46 (62,50%)	32	21 (65,62%)
Penicillium sp.	72	44 (61,11%)	32	15 (46,87%)
Alternaria sp.	72	48 (66,66%)	32	19 (59,37%)
Mucor sp.	72	42 (58,33%)	32	20 (62, 50%)
Fusarium sp.	72	19 (26,38%)	32	8 (22,00%)

Prisustvo pojedinih gljivica iz spoljne sredine na krznu pasa kod grupe koja je imala promene na koži kretao se između 26,38% do 66,66% sa tim što se može uočiti da praktično ni jedan uzorak nije bio slobodan od ove vrste mikroorganizama. U grupi pasa koji su bili bez promena na koži zastupljenost gljivica iz spoljne sredine kretala se od 22,00% do 65,62% sa istim nalazima kao i kod prethodne grupe koja nije imala ni jedan uzorak bez prisustva gljivica. Rezultati naših ispitivanja su veoma visoki jer se u radovima drugih autora (Jand, Gupta, 1989) može videti da se nalaz gljivica iz spoljne sredine na koži pasa kretao u visini od 10,8%. Kada je reč o vrsti izolovanih gljivica (*Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp.) može se uočiti da je gotovo identičan našem nalazu.

Rezultati ispitivanja kože pasa u radu Cabanes i sar., (1996) pokazuju da je prisustvo pojedinih vrsta gljivica izuzetno visoka i da se za *Penicillium* vrste kreće u visini od 90%.

Koji su razlozi za bolje poznavanja značaja prisustva gljivica na koži kućnih ljubimaca? Prisustvo, u visokom procentu, gljivica na koži pasa obezbeđuje njihova končasta građa (micelijum) što im omogućava da se lako vezuju za različite površine u prirodi. Sa druge strane vazdušni micelijum služi za razmnožavanje i lako prenošenje spora gljivica u okolnu sredinu (Škrinjar i Tešanović, 2007). Iz spora može nastati novi organizam ako dospe u sredinu koja ima povoljne uslove za njihovo klijanje. Pored ove činjenice važno je znati

da se nove gljivice mogu formirati od bilo kog vegetativnog dela što omogućava njihovo brzo razmnožavanje i opstanak u različitim sredinama. Gljivice su veoma otporne i mogu se razmnožavati u nepovoljnim uslovima kao što su namernice sa izrazitom kiselom sredinom (voćni sokovi na bazi citrusa), niskim sadržajem slobodne vode (čajevi, začini, žitarice, brašno) kao i sušenim, smrznutim i pasterizovanim namirnicama (Škrinjar i Tešanović, 2007; Marriott i Gravani, 2006).

Veliki deo gljivica ne predstavlja opasnost za zdravlje ljudi, ali neke proizvode miktoksine koji su toksični, kancerogeni, mutageni ili teratogeni za životinje i ljude. Gljivice se brzo šire zato što mogu da se prenose vazduhom i mogu da izazovu vidljive promene i raspadanje namernica (poseduju fermentativne, lipolitičke i proteolitičke enzime) (Škrinjar i Tešanović 2007; Marriott i Gravani, 2006).

Ispitivanje značaja prisustva gljivica u stanovima u radu (Portnoy i sar. 2004) utvrđena su tri glavna problema koja ugrožavaju ljude. U zavisnosti od načina gradnje kuća ili stanova gljivice mogu da dovedu do oštećenja objekata, zatim mogu da dovedu do promena izgleda i mirisa prostora i mogu da dovedu različitim zdravstvenih problema u zavisnosti od individualne osetljivosti.

Nalaz i širenja gljivica u zatvorenim prostorima stanovanja u velikoj meri zavisi od njihovog broja u spoljašnjoj sredini. Posledice povećanja broja gljivica u stanovima analizirano je u radu (O'Connor i sar., 2004) kada je saopšteno da je pojavi astme kod osetljive dece prethodilo povećanje broja gljivica u stanu koje je nastalo kao posledica različitih agenasa u kući među kojim i prisustvom mačaka.

Rezultati do kojih smo došli ukazuju da se na površini kože pasa nalazi značajan broj različitih gljivica. Držanje pasa u stanovima povećava izloženost kako ljudi tako i hrane i predmeta gljivicama i u zavisnosti od individualne osetljivosti ugrožava zdravlje ukućana. Najznačajniji metabolički produkti gljivica su mikotoksini. Unošenjem ovih metabolita gljivica mogu dovesti do oštećenja jetre, bubrega, imunog sistema i hematopoeznih organa i pojava kancerogenih promena na organima (Kakrakšević B. 1989.).

ZAKLJUČAK

Ispitivanje je pokazalo da se na površini kože pasa nalazi veliki broj različitih vrsta gljivica. Ova činjenica važna je za vlasnike kućnih ljubimaca jer bi bilo važno upoznati ih sa posledicama koje se mogu javiti zbog povećanog broja spora i micelijuma u prostorijama za stanovanje.

Razlike u nalazu koje su uočene između uzoraka pasa sa obolelom kožom i pasa bez promena na koži moglo bi se reći da nisu od većeg značaja, jer mi

nismo ni želeli da prikazemo značaj pojedinih gljivica u mikroflori kože pasa. Činjenica je da su gljivice zastupljene i kod zdravih i kod bolesnih pasa, ukazuje da bez obzira na to da li pas izgleda zdrav ili je bolestan nosi na sebi gljivice i može neprekidno biti u poziciji da kontaminira prostor stanovanja.

Naše ispitivanje bi trebalo da skrene pažnju da bolesti kao što su besnilo, toksoplazmoza, leptospiroza, tularemija, psitakoza, ehinokokoza, bolest ugriza mačke nisu jedina opasnost koja može biti preneti sa kućnih ljubimaca i da pritajene infekcije, kao što su infekcije gljivicama, takođe mogu predstavljati problem za zdravlje ljudi.

LITERATURA

1. Aiello Susan, The Merck veterinary manual, Eight Edition, 1998.
2. Blyskal B.: Fungi utilizing keratinous substrates, *Review, International Biodegradation & Biodegradation*, 1-23, 2009.
3. Cabanes F.J., Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G.: Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs, *Mycopathologia*, 133, 1, 1-7. 1996.
4. O'Connor G. T., Walter M., et al.: Airborne fungi in the homes of children with asthma in low-income urban communities: The Inner-City Asthma Study, *J Allergy Clin Immunol*, 114, 599-606, 2004.
5. Jand S.K., Gupta M.P.: Dermatomycosis in dogs, *Mycoses*, 32, 2, 104-5, 1989.
6. Portnoy J. M., Barnes C. S., Kennedy K.: Sampling for indoor fungi *J. AllergyClin Immunol*, 113, 189-98, 2004.
7. Karakašević B.: Mikrobiologija i parazitologija, Beograd- Zagreb: Medicinska knjiga, 1989.
8. Marriott, N. G., Gravani, R. B.: Principles of Food Sanitation, Springer, USA, 2006.
9. Popović N., Lazarević M.: Bolesti kože malih životinja, Beograd: Fakultet Veterinarske medicine, 1999.
10. Quinn J. P., Carter E. M., Markey B., Carter R.G., Clinical Veterinary Microbiology and Diesaes; London: Mosby, 2002.
11. Škrinjar, M., Tešanović, D.: Hrana u ugostiteljstvu i njeno čuvanje. Novi Sad: Prirodno matematički fakultet, 2007.

Primljeno: 15.02.2011.

Odobreno: 20.02.2011.

PRAĆENJE POJAVE DIROFILARIOZE KOD RADNIH PASA U SLUŽBI VOJSKE SRBIJE^{8*}

Pajković Dušan¹, Sara Savić^{2 **}, Predrag Veljković³, Živoslav Grgić²

¹Vojska Srbije, Novi Sad

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

³Vojska Srbije, Niš

Kratak sadržaj

Dirofilarioza pasa je parazitsko oboljenje, a uzročnik je *Dirofilaria immitis* ili *Dirofilaria repens*. Može se javiti kao kožni ili kao srčani oblik bolesti kod pasa. Za širenje ovog oboljenja neophodno je prisustvo komaraca kao vektora, u kojima se odvija deo životnog ciklusa dirofilarija. Dirofilarioza se javlja kod pasa, mačaka i ređe kod ljudi. Iako je prvobitno bila prepoznata kao oboljenje koje se javlja u mediteranskim zemljama, tokom godina, došlo je do širenja dirofilarioze prema severu i zapadu Evrope, tako da sada kliničke slučajeve kod pasa nalazimo širom srednje Evrope, uključujući i Srbiju. Prvi podaci o dirofilariozi u Srbiji su objavljeni 1999. godine i od tada se ovo oboljenje prati na više regiona u zemlji. Tokom perioda od 6 godina (2004. do 2010.) je praćena pojava dirofilarioze kod pasa u službi vojske Srbije, nakon pronalaženja više slučajeva odraslih oblika dirofilarija u srcu pasa na obdukciji. Pregledan je 71 uzorak krvi pasa različitih starosti tokom posmatranog perioda i ustanovljena ukupna prevalenca od 14% na dirofilariozu u populaciji pasa u službi vojske.

Ključne reči: dirofilarioza, dijagnostika, psi, seroprevalenca

* Rad je saopšten na: Prvi internacionalni epizootiološki dani, 6-9. april 2011. godine, Sijarinska banja, Lebane

** E mail: sara@niv.ns.ac.rs

STUDY ON DIROFILARIOSIS IN MILITARY DOGS WITHIN THE ARMY OF SERBIA

Pajković Dušan¹, Sara Savić², Predrag Veljković³, Živoslav Grgić²

¹Army of Serbia, Novi Sad

² Scientific veterinary institute „Novi Sad“, Novi Sad

³Army of Serbia, Niš

Abstract

Dirofilariasis is a parasitic disease, caused with *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens*. Dirofilariasis can appear as a heart form and as a cutaneous form. For the spreading of dirofilariasis, the presence of mosquitoes is necessary, because they serve as vectors. Also a part of dirofilaria life cycle is developed within the vector. Dirofilariasis can be found in dogs and cats and sometimes in humans. Even though dirofilariasis was primarily known as a disease found in Mediterranean countries, through the years it has spread out to the north and west of Europe, so now clinical cases of dirofilariasis can be found in middle Europe, including Serbia. First data on dirofilariasis in Serbia were published in 1999. and since that time there is a follow up on dirofilariasis in several regions of Serbia. During a six year period (2004. to 2010.) a study on dirofilariasis in military dogs within the army of Serbia was done. A few cases of adult dirofilaria were found in dogs hearts at autopsy. The study was done on 71 serum samples, from dogs of different age, during the study period and a total seroprevalence of 14% was found.

Key words: dirofilariosis, dogs, diagnostic methods, seroprevalence

UVOD

Dirofilarioza pasa je parazitsko oboljenje, a uzročnik je *Dirofilaria immitis* ili *Dirofilaria repens*. Može se javiti kao kožni ili kao srčani oblik bolesti kod pasa. Srčana forma oboljenja se često naziva i bolest »srčanog crva«, jer se odrasli oblici dirofilarija nalaze u srcu. Za širenje ovog oboljenja neophodno je prisustvo komaraca kao vektora, u kojima se odvija deo životnog ciklusa dirofilarija. Dirofilarioza se javlja kod pasa, mačaka i ređe kod ljudi. Simptomi dirofilarioze kod srčane forme oboljenja pasa su nespecifični – kašalj, gubitak apetita, gubitak glasa, mršavljenje, brzo umaranje, otežan rad srca, hematurija i sl. odnosno liče na simptome kod oboljenja srca pasa. Kod kožne forme dirofilarioze promene su na koži u vidu ranica, čvorića, gubitka dlake na oštećenim mestima uz pojavu konstantnog svraba koji nije lokalizovan.

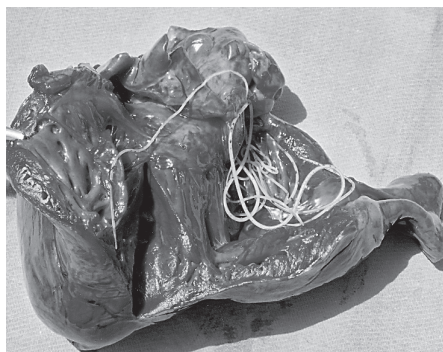
Dirofilarioza se prethodnih decenija smatrala oboljenjem koje se javlja u mediteranskim zemljama Evrope (Genchi et al, 2004). Međutim, zahvaljujući klimatskim promenama, kao i povećanjem broja pasa i mačaka koji putuju širom Evrope, došlo je do širenja oboljenja prema severu i zapadu Evrope (Genchi et al 2009). Tako da sada kliničke slučajeve kod pasa nalazimo širom srednje Evrope – u Mađarskoj, Češkoj Republici, uključujući i Srbiju (Pampiglione et al 1999, Dimitrijević 1999, Svobodova 2006.)

Terapija kod dirofilarioze pasa postoji i primenjuje se u praksi, protiv mikrofilarija u cirkulaciji i protiv odraslih oblika u srcu. Terapija je finansijski prilično zahtevna, a kod terapije protiv odraslih oblika postoji i određeni rizik po život psa koji prima terapiju. Takođe, aplikacija samog leka nije jednostavna (u leđni mišić), a nakon terapije, obavezno je apsolutno mirovanje psa u trajanju od 4-6 nedelja (Hoch i Strickland, 2008).

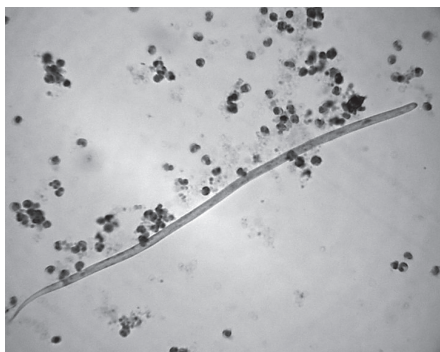
O prisustvu dirofilarioze u Srbiji prvi put je objavljeno 1999. godine (Dimitrijević S, 1999.), a nakon 2000. godine, više autora prati i beleži rasprostranjenost ovog oboljenja na različitim regionima Srbije, odnosno Vojvodine. (Tasić A. et al 2003; Savić-Jevđenić S, i saradnici, 2004, 2006.). Kod službenih pasa je prvi slučaj dirofilarioze otkriveni kao slučajan nalaz tokom obdukcije. U narednom periodu je bilo više ovakvih slučajeva i zbog toga je urađena serološka dijagnostika kod većeg broja živih službenih pasa držanih u vojnim objektima u regionu Novog Sada, Fruške Gore i okoline Pančeva. U ovim regionima su prethodnih godina potvrđeni slučajevi dirofilarioze kod pasa kućnih ljubimaca (Savić-Jevđenić et al 2006).

MATERIJAL I METODE

Materijal za rad predstavljali su uzorci krvi službena psa pasa, iz regiona okoline Novog Sada, Fruške Gore i okoline Pančeva. Psi su čuvani u objektima vojske Srbije (10 objekata na različitim lokacijama) i rađena je konstantna godišnja preventiva u smislu davanja antiendoparazitika, antiiektoparazitika i programa vakcinacije tokom poslednjih 10 godina. Uzorci krvi su uzimani sa heparinom kao antikoagulantom, a analize krvi na dirofilariozu su rađene u Naučnom institutu „Novi Sad“. Analiza uzoraka krvi pasa je rađena primenom modifikovanog Knottov-og testa i metodom ELISA-e (Canine Heartworm Antigen test kit, IDEXX Laboratories, SAD). Uzorci krvi su uzeti u sledećem broju: 30 uzoraka 2004. godine, 26 uzoraka 2006. godine i 15 uzoraka 2010. godine.



Slika 1-*Dirofilaria* u srcu
psa na obdukciji



Slika 2-*Diofilaria* modifikovanim
Knott-ovim testom

REZULTATI I DISKUSIJA

Tokom perioda od 6 godina (2004.-2006.) praćena je pojava dirofilarioze kod službenih pasa vojske Srbije u određenim delovima Vojvodine. Prvi slučajevi dirofilarioze su otkriveni na obdukciji kao slučajan nalaz i takvih je bilo ukupno 7 slučajeva uginulih pasa tokom posmatranog perioda kod kojih je pronađeno prisustvo odraslih oblika dirofilarija u srcu. Tokom 2004. godine, od 30 uzoraka krvi pasa, 5 uzoraka su bili pozitivni na prisustvo mikrofilarija i dali pozitivan nalaz modifikovanim Knott-ovim testom i ELISA metodom (16%) i svi pozitivni uzorci su poticali od pasa sa Fruške Gore i okoline. Tokom 2006. godine ponovo je rađena analiza na dirofilariozu kod službenih pasa vojske Srbije i utvrđena seroprevalenca od 19,2% (5 pozitivnih od 26 pregledanih pasa), takođe samo u regionu Fruške Gore i okoline. Tokom 2010. godine urađena je analiza na dirofilariozu kod 15 službena pasa vojske Srbije, mladih od 5 godina iz istih kasarni i nije utvrđeno prisustvo dirofilarioze ni kod jednog psa. Ukupno gledano, od pregledanih 71 uzoraka krvi službenih pasa u vojsci Srbije na regionu Novog Sada i okoline, Fruške Gore i okoline Pančeva, tokom perioda od 6 godina, 14% uzoraka je bilo pozitivno na dirofilariozu, s tim da poslednje godine ni jedan pas nije imao pozitivan serološki nalaz.

Tabela 1 – Prikaz seroloških nalaza na dirofilariozu kod pasa vojske Srbije u periodu 2004.-2010.

Godina	Ukupan broj pregledanih pasa	Broj pasa sa pozitivnim nalazom na dirofilariozu	% pasa sa pozitivnim nalazom na dirofilariozu
2004.	30	5	16%
2006.	26	5	19,2%
2010.	15	0	0
Ukupno	71	10	14%

ZAKLJUČAK

U populaciji pasa koji se koriste u svrhe vojske Srbije je prisutna dirofilarioza tokom poslednjih 6 godina. Oboljenje perzistira tokom posmatranog perioda i na obdukciji su više puta nađeni odrasli oblici parazita u srcu, kod starijih pasa. Terapija protiv odraslih oblika dirofilarija nije preduzimana, radila se samo ustaljena preventiva, tokom posmatranog perioda. U poslednje dve godine sve više je slučajeva dijagnostike dirofilarioze kod živih pasa kućnih ljubimaca na istom regionu Novog Sada i okoline, dok je prema ovom istraživanju kod službenih pasa istog regiona manji broj pasa infestiran dirofilarijom u odnosu na prethodni period. Ovo se može objasniti pre svega manjim brojem uzoraka koji su uzeti tokom 2010. godine, kao i činjenicom da su tokom 2010. godine pregledani mlađi psi u odnosu na preglede izvršene prethodnih godina. S obzirom na sada već široku rasprostranjenost dirofilarioze u regionu Novog Sada, praćenje pojave ovog oboljenja kod pasa u službi vojske Srbije će biti nastavljeno.

LITERATURA

1. Dimitrijević S: Dirofilarioza ante portas. U: Zbornik radova prvog savetovanja Clinica Veterinaris, 58, 1999.
2. Genchi C, L. Rinaldi, C. Cascone, M. Mortarino, G. Cringoli: Is heartworm disease really spreading in Europe. In: American heartworm society symposium, 2004
3. Pampiglione S, Elek G, Palfi P, Vetesi F, Varga I: Human *Dirofilaria repens* infection in Hungary: A case in the spermatoc cord and a review of the literature, *Acta Veterinaria Hungarica*, 47, 1, 77-83, 1999.
4. Savić-Jevđenić S, Vidić B, Grgić Ž, Milovanović A: Brza dijagnostika dirofilarioze pasa u regionu Novog Sada, *Vet. glasnik*, 58, 5-6, 693-698, 2004.

5. Savić-Jevđenić S., Milovanović A., Grgić Ž., Kojić S.: Rasprostranjenost dirofilarioze u regionu Novog Sada - šest godina posle. U: Zbornik kratkih sadržaja, VIII epizootiološki dani sa međunarodnim učešćem, str. 60, 2006.
6. Svobodova Z, Svobodova V, Genchi K, Forejtek P: The first report of autochthonous dirofilariosis in dogs in the Czech Republic, *Biomedical and Life Sciences*, 43, 4, 242-245, 2006.
7. Tasić A, Katić-Radivojević S, Klun I, Mišić Z, Ilić T, Dimitrijević S: Prevalencija filarioza pasa u nekim delovima Vojvodine, U: Zbornik i kratki sadržaji, 15. Savetovanje veterinara Srbije, 172, 2003.
8. Hoch H, Strickland K: Canine and feline dirofilariasis: prophylaxis, treatment, and complications of treatment, *Compend Contin Educ Vet.* 30, 3, 146-151, 2008.
9. Genchi C, Rinaldi L, Mortarino M, Genchi M, Crincoli G: Climate and *Dirofilaria* infection in Europe, *Veterinary Parasitology*, 26, 163, 4, 286-292, 2009.

Primljeno: 15.01.2011.

Odobreno: 20.02.2011.

ENZIM FITAZA U ISHRANI ŽIVINE

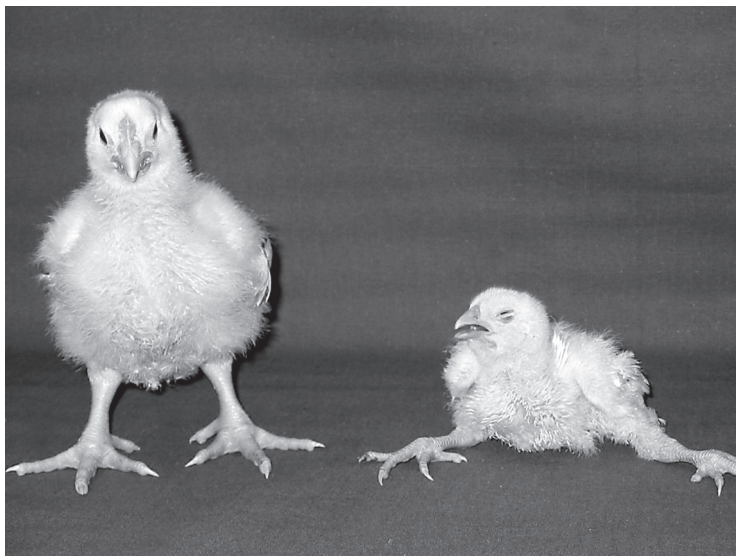
Milica Živkov-Baloš *

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

Hrana za živinu (gotove smeše) proizvodi se, skoro isključivo, od biljnih komponenata i to uglavnom iz domaće proizvodnje. Hranljive materije iz biljnih hraniva, posebno mineralne materije, za živinu najčešće nisu dovoljno iskoristiva zbog prisustva antinutritivnih faktora ili nedostatka enzima potrebnih za varenje i iskorišćavanje hranljivih materija. Hraniva biljnog porekla, sadrže različite količine mineralnih materija, a njihov sadržaj zavisi od biljne vrste, faze vegetacije, dela biljke i načina pripreme hraniva. Zbog različitog i promenljivog sadržaja mineralnih materija u biljnim hranivima, kao i zbog njihove niske dostupnosti, u smeše za ishranu živine dodaju se neorganski izvori minerala. Ovo se naročito odnosi na fosfor.

Fosfor je vrlo važan elemenat u ishrani živine. Važan je zato što je posle kalcijuma, najzastupljeniji mineral u organizmu životinja (oko 80% fosfora je u sastavu kostiju). Ovaj mineral učestvuje u mnogobrojnim procesima u organizmu. Sastavni je deo visokoenergetskih jedinjenja, te je važan i za sve energetske procese u organizmu. S obzirom na značajne uloge fosfora u organizmu, neophodno ga je obezbediti u hrani u dovoljnoj količini i adekvatnom obliku. Sadržaj fosfora u hrani, visok ili nizak, može negativno da utiče na proizvodne rezultate živine. U uslovima blagog deficita ili kod kraćeg trajanja ozbiljnijih deficita fosfora, prvi klinički simptom je smanjen apetit praćen slabijom iskoristivošću hranljivih materija, što je praćeno slabijim rastom, gubitkom telesne mase i padom proizvodnje. Izraženiji dugotrajni nedostatak izaziva nepravilno okoštavanje, deformitete kostiju i pojavu mekih i krtih kostiju kod mladih (rahitis) i odraslih životinja (osteomalacija), posebno u intenzivnoj proizvodnji.

* E mail: milica@niv.ns.ac.rs



Pile hranjeno smešom sa adekvatnim sadržajem fosfora u hrani (levo).
Desno – akutni nedostatak fosfora u hrani.

Optimalna količina fosfora u smešama za tov brojlera uslovljena je ekonomskim pitanjem i pitanjem zagađenja životne sredine. Tako, višak fosfora u hrani, osim direktnog uticaja na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate živine, indirektno utiče na iskoristivost drugih hranljivih materija, prvenstveno minerala. Višak fosfora u hrani dovodi do povećanja količine fosfora rastvorljivog u vodi u stajnjaku, a ovaj lako može biti transportovan putem vode, po površini zemljišta, a odatle do površinskih voda.

Visoko iskoristivi izvori fosfora su fosfatna mineralna hraniva (dikalcijum fosfat, monokalcijum fosfat, monoamonijum fosfat i dr.). Važna prednost mineralnih izvora fosfora je da je fosfor u njima 80-90% iskoristiv, te relativno mali procenat učešća u hrani može da zadovolji potrebe živine u fosforu. Nedostaci fosfata su promenljiv i vrlo različit kvalitet, posebno sadržaj fosfora. Sa druge strane, fosfati vrlo često sadrže toksične elemente u velikim količinama. Hraniva životinjskog porekla (riblje, mesno, mesno-koštano brašno i dr.) su takođe, odličan izvor fosfora. Međutim, pojava bolesti ludih krava je pred proizvođače živinskog mesa postavlja zahteve da se smanji, odnosno obustavi upotreba hraniva životinjskog porekla. Insistira se na uporebi hraniva biljnog porekla, prvenstveno žitarica, odnosno da se efikasnije koriste nisko kvalitetna hraniva.

Zrnasta hraniva i sporedni proizvodi dobijeni preradom zrna, posebno mekinje, su relativno dobri izvori fosfora. Ova biljna hraniva čine i do 60%

obroka živine, tako da se u kompletnim smešama za živinu više od 60-80% fosfora nalazi u slabo iskoristivom obliku. Fosfor je u biljnim hranivima veza za fitinsku kislinu, koja je sastojak semena biljaka, a koja u digestivnom traktu životinja reaguje sa sastojcima crevnog sadržaja stvarajući nerastvorljiva jedinjenja. Ova kiselina stvara komplekse i sa drugim mineralima, amino kiselinama, proteinima, skrobom i lipidima čineći ih slabo iskoristivim za živinu, naročito mlađe kategorije (tovni pilići).



Deficit fosfora kao posledicu ima smanjen porast

Iz hraniva mineralnog i životinjskog porekla fosfor se iskoristi i do 90%, dok je njegova iskoristivost iz fitinske forme, u kojoj je prisutan u biljkama, do 40%. Niska dostupnost hranljivih materija vezanih u formi fitata dovodi do dva najznačajnija problema u proizvodnji:

- potreba dodavanja neorganskih izvora mineralnih materija (pre svega fosfora), i ostalih hranljivih materija u obroke da bi se obezbedile potrebe životinja;
- izlučivanje velikih količina fosfora i drugih hranljivih materija u okolinu putem fecesa.

Stajnjak poreklom od živine je poseban problem zbog značajno povišenog sadržaja neiskorišćenog fosfora poreklom iz biljnih hraniva.

U cilju rešavanja postojećih problema u ishrani živine, enzimi sve više privlači pažnju nutricionista. Između brojnih enzima, u ishrani živine po svom dejstvu i efikasnosti ističe se fitaza. Iako su dejstvo i efekti fitaze, dokumentovani i dobro poznati još od kasnih šezdestih godina prošlog veka, bilo je potrebno 20 godina dok se nije počelo sa njenom komercijalnom upotrebom. Ova vremenska distanca može objasniti činjenicom, da problemi zaštite životne sredine nisu bili značajni u meri u kojoj danas jesu. Pokretačka snaga za upotrebu fitaze su dobri rezultati u iskoristivosti hranljivih materija i bolji pro-

izvodni rezultati životinja. Zahvaljujući brzom progresu biotehnologije, enzimi se danas proizvode komercijalno čime se omogućava njihova šira upotreba.

Aktivnost fitaze ustanovljena je kod velikog broja biljnih vrsta (semena) kao što su pirinač, pšenica, ječam, kukuruz, raž, soja i semena uljarica. Takođe, je poznato da određene vrste mikroorganizama (bakterije, plesni i gljivice) proizvode ovaj enzim. Dodavanje enzima hrani za životinje ima za cilj da: dopuni aktivnost endogenih (telesnih) enzima, otkloni i ublaži dejstvo fitinske kiseline, pojedine hranljive materije učini dostupnijim za resorpciju, poveća energetska i hranjivu vrednost sirovina nižeg kvaliteta i smanji izlučivanje hranljivih materija u spoljašnju sredinu. Efikasnost fitaze u ishrani živine zavisi od više faktora, a najznačajniji su:

- Nivo primenjene fitaze;
- Sadržaj ukupnog fosfora u obroku;
- Količina fitinskog fosfora u obroku;
- Sadržaj kalcijuma i odnos kalcijuma i fosfora u obroku;
- Aktivnost i nivo biljne fitaze korišćenih hraniva;
- Tehnološki proces proizvodnje hrane.

Upotreba fitaze i smanjenje korišćenja neorganskih izvora fosfora ima nutritivno, medicinsko, ekološko i ekonomsko opravdanje u ishrani brojlera. Uključivanje fitaze u obrok podrazumeva da će količina upotrebljenog mineralnog izvora fosfora (MKP, DKP i dr.), kao i ribljeg brašna, biti smanjena. Moguće je da se zameni oko 30% ukupnog fosfora, odnosno 50% iskoristivog fosfora u smešama za ishranu brojlera korišćenjem fitaze. Može da se preporučiti da korišćenje mikrobijalne fitaze uz istovremenu redukciju sadržaja fosfora u smešama za brojlere bude praćeno i izvesnom redukcijom kalcijuma (stočne krede) u obroku.



Upotreba fitaze i smanjenje korišćenja neorganskih izvora fosfora ima nutritivno, medicinsko, ekološko i ekonomsko opravdanje u ishrani brojlera.

Savremena proizvodnja hrane za životinje podrazumeva obaveznu primenu enzima u različitim formama. Novi trendovi u stočarstvu, osim razvoja tehnologija i procesa koji vode ka što boljim proizvodnim rezultatima, usmereni su sve više zaštiti čovekove okoline. U zemljama sa snažnom poljoprivredom i sa značajnim ulaganjima u zaštitu okoline, postoji niz zakonskih propisa iz oblasti ekologije. Stajnjak poreklom od živine je poseban problem, zbog značajno povišenog sadržaja fosfora, kao posledice visoke koncentracije fitata u biljnim hranivima koja su prisustni u značajnim količinama u smešama za ishranu živine. Smatra se da su živinarske i svinjogojske farme veliki zagađivači okoline, naročito reka i obradivih površina i to pre svega fosforom i azotom. Zakonskim propisima propisano je da se hrana za nepreživare mora dopuniti aditivima koji redukuju nivo fosfora u stajnjaku do nivoa koji je ekološki i biološki prihvatljiv.

Primljeno: 15.04.2011.
Odobreno: 20.04.2011.

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 tabele.

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

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

Fotografije se označavaju arapskim brojevima (ispod fotografije) po redosledu navođenja u tekstu, sa nazivom na srpskom jeziku. Primaju se isključivo originalne fotografije (crno-bele ili u boji) na sjajnom (glatkom, a ne mat) papiru. Na poledini 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