

UDK 619

ISSN 1820-9955

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”
Novi Sad

Arhiv veterinarske medicine

Arh. vet. med.	vol. 2	br. 2	str. 1- 96	Novi Sad, 2009.
----------------	--------	-------	------------	-----------------

CIP – Каталогизација у публикацији
Библиотека Матице српске, Нови Сад

619

Arhiv veterinarske medicine / glavni i odgovorni urednik
Branka Vidić. – Vol. 2, br. 2 (2009) – . – Novi Sad :
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, 2008 – . – 25 cm

Dva puta godišnje.

ISSN 1820-9955

COBISS.SR-ID 235692807

ACTUAL INFECTIOUS DISEASES IN BULGARIAN PIG INDUSTRY*

Angel Mortrovski**, Nedelcho Nedelchev, Stoil Karadzhov
National Diagnostic and Research Veterinary Institute, Sofia, Bulgaria

Abstract

At the moment the most important diseases for Bulgarian pig industry are classical swine fever and Aujeszky's disease in respect of which we are obliged to meet the requirements of the European Union (EU) as well as Porcine reproductive and respiratory syndrome and Porcine circovirus type 2, which cause big losses on pig farms. According to the experts on pig diseases we are now in the era of multifactorial diseases. The emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) and porcine circovirus type 2 (PCV2) in the last 15 years also lead to alteration of the pig pathology and increased the importance of multifactor diseases. Also, the diseases important for pig production in Bulgaria are the diseases: porcine parvovirus (PPV), swine influenza virus (SIV), *Mycoplasma hyopneumonia* (M hyo) and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), the infections that often joined with above mentioned causative agents.

Key words: infectious diseases, pig, Bulgaria

* Rad je saopšten na 8. kongresu veterinara Srbije, 15-19. septembra 2009. godine, Beograd

** E mail: angelmortovski@yahoo.com

INFEKTIVNE BOLESTI U INDUSTRIJSKOJ PROIZVODNJI SVINJA U BUGARSKOJ

Angel Mortrovski, Nedelcho Nedelchev, Stoil Karadzhov
Nacionalni dijagostički i istraživački veterinarski institut, Sofija, Bugarska

Kratak sadržaj

Trenutno, najvažnija bolest u industrijskoj proizvodnji svinja u Bugarskoj su klasična kuga svinja i Aujeckijeva bolest, u pogledu kojih smo obavezni da ispunimo zahteve Evropske unije (EU), kao i za respiratorni sindrom svinja i cirkovirus svinja tip 2, koji izazivaju velike gubitke na farmama. Prema mišljenju stručnjaka za bolesti svinjarstva, sada su aktuelne multifaktorijske bolesti. Pojava reproduktivno respiratornog sindroma svinja (PRRS) i cirkovirusa svinja tip 2 (PCV2) u poslednjih 15 godina takođe je dovela do promene i u patologiji svinja i istaklo uticaj multifaktorijskih bolesti. Bolesti koje takođe utiču na proizvodnju svinja u Bugarskoj takođe su značajne parvovirus (PPV), virus influence svinja (SVI), *Mycoplasma hyopneumonia* (M hyo) i *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), infekcije koje se često javljaju uz gore spomenute uzročnike.

Ključne reči: infektivne bolesti, svinja, Bugarska

INTRODUCTION

Bulgarian pig industry has some features which influence the infectious diseases. Since 1990 the number of farms and pigs has been considerably reduced, and the tendency of declining in pig industry is still continuing. Yet, the largest number of pigs is raised on large farms, what contributes the occurrence of many infectious diseases.

Table 1: Current state of Bulgarian pig industry

Category of farms	Farms No.	Pigs No.
Industrial farms	61	425 260
Family farms type A	79	24 331
Family farms type B	1341	38 697
Back yards	50 787	97 535
East Balkan breed	107	8584
Total	52 375	594 407
Wild boars	-	63 963

Besides reduced pig production, the following factors influence on the occurrence of infective disease:

- breeding farms are renewed periodically by sows and boars, purchased from other farms, which creates conditions for persisting of infectious agents;
- the import of animals is usually done from two or more sources, which enhances the risk of penetration of the infection;
- on some farms the animals are reared in the open air, which creates a possibility for contact with birds and wandering animals;
- in all the farms continuous farrowing is going on, which constantly provides susceptible animals on the farm;
- on all the farms a closed circle of performance is going on and the fatteners serve as a reservoir of persisting infections;
- boars are reared on farms. On some farms natural insemination (mating) is carried out and boars play an important role in spreading of infections;
- "all in – all out" management is often neglected;
- there are pigs reared in back yards;
- there is a population of East Balkan bread pigs, reared on pastures;
- the existence of a population of wild boars.

Classical swine fever (CSF) has been a constant problem in the past with periodical epizootics that lasted for several years each. The mass vaccination was an important measure for limiting the losses. After 2002 there is a constant tendency of decreasing the outbreaks in domestic pigs, excluding 2006 when 3 new outbreaks appeared. The last outbreak in wild boars took place in 2004 and 2005. The outbreaks in domestic pigs were recovered by "stamping out".

Table 2: Epizootiological state of Bulgarian pig industry in respect to CSF (Kamenov, 2009).

Year	Commercial farms		East Balkan pigs		Backyards		Occasions in wild boars
	No of infected herds	No of infected pigs	No of infected herds	No of infected pigs	No of infected herds	No of infected pigs	
2002	10	41	-	-	-	-	-
2003	5	34	2	24	4	5	-
2004	1	3	1	19	-	-	48
2005	-	-	-	-	-	-	88
2006	3	68	-	-	4	5	-
2007	1	41	2	46	-	-	-
2008	1	8	-	-	-	-	-
2009	-	-	-	-	-	-	-

From January 1, 2007 the vaccination of domestic pigs is forbidden. In 2005 started the Program for Control and Eradication of CSF, approved by EU, which includes (Kamenov, 2009):

- active surveillance of pig holdings aimed to as early as possible detection of CSF clinical symptoms;
- passive surveillance by investigation of blood samples for antibodies;
- three vaccination campaigns of wild boars with two vaccinations, each in 40 km zone, along the western and northern border;
- control of the wild boars by investigation of tissue samples for virus and blood samples for vaccine – induced antibodies.

Aujeszky's disease (AD) is a basic problem for Bulgarian pig industry as after stopping the vaccination against CSF it remains the most important obstacle for export of pigs in EU. The results of virological investigations (virus isolation in tissue culture), performed in National Diagnostic and Research Veterinary Institute (NDRVMI), during the recent 11 years, show that during all the years AD outbreaks have appeared: 62.26% of investigated animals were positive. The biggest number investigated (29) and positive (72.41%) were amongst the sucking piglets, which is the proof that the virus persists amongst the sows. The confirmation of this statement is the fact that both foetuses investigated were positive. All the investigated dogs during this period were positive which shows that apart from clinical manifestation AD maintains itself in sows as a latent infection and the virus exists in the organs and meat in clinically healthy, in many occasions vaccinated animals (Table 3).

Table 3: Results from virological investigations

Year	No.farms investigated	Number positive/number investigated				
		sucklers	weaners	fetuses	dogs	Total
1998	1	-	1/1	-	-	1/1
1999	3	8/8	-	-	-	8/8
2000	1	-	1/1	-	-	1/1
2001	3	-	0/5	1/1	-	1/6
2002	3	0/3	0/4	-	-	0/7
2003	1	4/4	-	-	-	4/4
2004	6	5/9	0/1	1/1	5/5	11/16
2005	1	2/2	-	-	-	2/2

In the previous period AD was proved by virological investigation in sheep and cattle, which shows that AD virus in infected pigs presents a constant threat for other animal species.

Although little, the above mentioned virological investigations are not in the frame of monitoring program, but on occasion of disease suspicion. In many of the cases of suspicion no samples were sent for investigation and that is why the disease was not registered.

Serological screening was also not performed, but the imported animals were preliminary investigated, but the results were not significant. The investigation, performed 10 years ago on 20 blood samples from each of 14 industrial farms, show that more than 42% of the farms and more than 34% of the animals were infected. Almost all the farms and most of the animals were positive, which is a proof of vaccination (Motovski et al,1999). Because of a small number of investigated animals it is not possible to say that the other farms were not infected. As a result of many year vaccination and sharp decrease of animals on the farms, it is possible that some of them got free from the virulent virus.

The National Program for AD Eradication includes intensive vaccination with gE – negative and TK – negative high – titer adjuvanted vaccines, which allow distinguishing the vaccinated from infected animals and create strong immunity which limits the virus spread. The disclose of AD infected farms would be performed by complementary (gE) ELISA, which distinguishes vaccinated from infected animals. Recovering of the infected farms would be fulfilled by gradual slaughter of the infected animals and replacing them by AD free ones. The country will be considered AD free two years after the last case of AD. The recovered farms will be controlled yearly by serologic investigation. The National program was presented to EU for approval and financing.

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Yordanov and Chenchev (2000) found antibodies on farms with reproductive disorders and respira-

tory diseases. In the following years this infection took a wide spread and caused great economical losses (Motovski, 2001). Most often the first signal for penetration of the disease into the farm were abortions irrespective the antibiotic treatment against leptospirosis, which in other cases are effective. Premature farrowing (before 112th day of pregnancy), stillborn and increased mortality in pigs before weaning were dominating symptoms in the infected farms. Respiratory diseases in weaned pigs were common symptoms of this infection. In some farms we observed reproductive disorders only, in others respiratory diseases in growers and on the thirds – sudden death in fatteners. The clinical symptoms vary very much in severity on different farms depending on the difference of existing conditions – stress, concurrent infections, environment and probably the virulence of the field strain of PRRS virus (Motovski, 2004). On many farms we observed periodical exacerbation of the disease, which shows that the herds were not equal in immunological respect (Benfield et al., 1997).

On the base of immunosuppression, caused by PRRS virus (Benfield et al., 1997; Thacker et al., 1999) we observed exacerbation of the persisting infections on the farms including such ones that didn't produce disease in the past. As an example of this is considerable increase of the severity of enzootic pneumonia in growers and finishers and the increase of clinical cases of *Str. suis* meningitis. In a case of acute running of PRRS we observed exacerbation of AD with high mortality in sucklers. On a large farm we observed exacerbation of porcine parvovirus with a lot of mummies and low fertility. Regardless to vaccination, leptospirosis emerged on farms where no clinical manifestation was earlier observed. Contrary to some statements we didn't observe self recovery of PRRS infected farms (Motovski, 2004).

An inactivated (Progressis, Merial) and live vaccine with European strain (Porcilis PRRS, Intervet) were examined. The vaccination with the live vaccine proved safe and effective – the increase of fertility ($P < F_{2550.02}$), decrease of returns and abortions ($P < F_{2550.001}$) and the increase of extra acquired piglets, which exceeded the price of the vaccine (Table 4). Now most of the farms vaccinate sows with the live vaccine every 3 or 4 months and some of them before or after weaning.

Table 4: Results from vaccination of sows against PRRS

Index	Nonvaccinated	Vaccinated from 0 to 45 days of pregnancy	Vaccinated 15 days before mating
No groups investigated	19	7	3
No of inseminated sows	437	161	69
% returns	21.51±2.43	17.39±3.4	18.84±3.13
% abortions	8.69±2.23	5.59±3.0	0
% farrowed	69.79±3.3	77.02±4.62	81.16±3.13
No of pigs born /sow (average)	8.53±0.15	9.08±0.15	9.83±0.21
No of pigs born/inseminated sow (average)	5.95	6.99	7.98
Cost of the vaccine/sow, leva	-	3.00	3.00
Cost of the pigs born/sow, leva	77.35	90.87	103.74

PCV 2 entered Bulgarian pig industry and was established by complex investigations of organs from 36 pigs on 8 pig farms (Motovski et al., 2005). Out of the eight investigated farms we proved postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by pathologic investigation and *in situ* hybridisation (Segales, 2002) in 4 and porcine dermatitis and nephropathy syndrome on one farm where the pigs showed characteristic clinical symptoms and pathological lesions for these diseases. The diagnosis of PMWS was established in 4 out of 5 farms with high mortality in weaners, what confirms the important role of this disease in the mortality after weaning (Table 5).

Table 5: Results from the complex laboratory investigation in 8 farms for PCV2 (Motovski et al., 2005).

Farm	Kidneys – No			Lymph nodes – No.		
	Investig.	positive by.		Investig.	positive by	
		Histology	<i>In situ</i> hybridization		Histology	<i>In situ</i> hybridization
1	5	-	-	6	1	-
2	3	-	-	3	2	2
3	6	2	-	4	4	4
4	6	-	-	6	-	-
5	2	-	-	2	-	-
6	5	5	5	6	6	6
7	5	-	-	5	-	-

PCV2 took a wide spread and affected all the pig farms and most of the animals on them – in 60% to 96% (average 75.76%) of sows and pigs on ten investigated farms antibodies were found (Table 6). The spread of PCV2 in different age groups is displayed in Table 7.

Table 6: Prevalence of PCV2 in industrial pig farms (Milev et al., 2009).

Farm No.	No investigated	% positive
1	50	72.00
2	57	61.40
3	57	61.40
4	60	60.00
5	45	66.67
6	50	96.00
7	50	72.00
8	50	96.00

Table 7: Prevalence of PCV2 in age groups

Age group		No investigated	% positive
6 – weeks		55	90.91
10 - weeks		44	70.45
12 – weeks		30	63.33
14 – weeks		64	45.31
18 – weeks		49	42.86
22 – weeks		50	100
24 – weeks		40	100
Gilts		35	71.43
Sows		55	100
Total	No		
	%		

From the table it can be seen that all the age groups were affected. The piglets acquired colostral immunity, which faded away after 18 weeks of age and then the pigs became susceptible. Some of the gilts were negative, but they survived infection again. Except the industrial pig farms now PCV2 is widespread in back yards and among East Balkan pigs and wild boars (table 8) (Milev et al., 2009).

Table 8: Results from investigation according to categories and regions (Milev et al., 2009).

Category of pigs	Region	No investigated back yards, farms, hunting areas	No investigated sows	No PCV2 positive
Domestic in back yards	Blagoevgrad	2	20	100
	Kjustendil	1	12	100
	Vratza	1	5	100
	Montana	2	12	100
	Yambol	1	10	100
	Gabrovo	5	59	100
	Razgrad	2	32	90.62
	Pleven	1	12	100
	Russe	2	16	50
	<i>Total</i>	17	178	89.89
East Balkan pigs	Shoumen	6	107	83.17
	Varna	2	32	100
	Burgas	4	72	63.89
	<i>Total</i>	12	211	79.15
Wild boars	Kardzhaly	1	9	55.55
	Blagoevgrad	4	40	67.50
	<i>Total</i>	5	49	67.34

On all the investigated farms we observed symptoms of PMWS: progressive loss of weight, difficult breathing, obvious enlargement of inguinal lymph nodes, diarrhoea, paleness and jaundice. The sick animals didn't react to the treatment. Dead animals showed enlargement of the mesenteric, bronchial and inguinal lymph nodes, which often were reddened, and enlargement of lungs septa (interstitial pneumonia) was noticed. Pigs affected with PDNS had red to purple skin spots preliminary on back of the hams and perineum which tended to fuse. Such pigs showed anorexia and reluctance to move. The lesions after death was lymphadenopathy, enlarged kidneys with petechia and multi-coloured lungs, sometimes with purulent pneumonia.

Our experience shows that we can limit the losses of PCV2 by strict application of general prophylactic measures and maintain the herd immunity against the existing diseases by vaccination, on the first place against PRRS and *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo). In Bulgaria an inactivated vaccine for sows (Circovac, Merial) has been registered and also two live subunit vaccines for pigs Ingelvac Circoflex (Boehringer) and Porcilis PCV (Intervet). Some farms examined the inactivated vaccine for sows but were not satisfied with the results. The first results from a live vaccine for pigs are encouraging (Table 9).

Table 9: Results from vaccination against PCV2

Index	Group	Average	Difference
No of pigs	experimental	394	-
	control	394	
Injected pigs, %	experimental	30.21±13.11	- 15.49
	control	45.70±12.62	
Average daily gain, g	experimental	416	9
	control	407	
Mortality, %	experimental	0.49±0.03	-2.52
	control	3.01±0.04	

The associated infections are characteristic for Bulgarian pig industry as well. By complex investigations of 13 industrial farms we established that in all of them persist PCV2, porcine parvovirus (PPV), influenza virus (SIV), M. hyo and Actinobacillus pleuropneumoniae (APP), in 70% of them PRRS and in 60% - AD. On 3 pig farms all the 7 investigated infectious agents are present, on 2 they are 6, on 5 – 5 and on 3 – 4 agents (Table 10). In investigation of 177 pigs on 9 industrial pig farms we found that all of them were affected by AD, M. hyo and APP, but on 5 of them PRRS and SIV exist. The highest percent of seropositive and the most farms and animals with seroconversion was established in respect to APP and AD (Table 11).

Table 10: Associated infections of PCV2 with other pathogens

Pig farm	PCV2	PRRS	M..hyo	APP	SIV	ADV	PPV	Comon
1	+	-	+	ni*	+	-	+	4
2	+	ni*	ni*	+	+	+	+	5
3	+	+	+	+	ni*	+	+	6
4	+	ni*	+	+	+	ni*	+	5
5	+	-	+	+	+	ni*	+	5
6	+	+	+	ni*	ni*	ni*	+	4
7	+	ni*	+	+	+	+	+	4
8	+	+	+	+	+	+	+	7
9	+	+	+	+	+	-	+	6
10	+	+	+	+	+	+	+	7
11	+	+	+	+	+	+	+	7
12	+	+	+	+	ni*	-	+	5
13	+	-	+	+	+	-	+	5
Total	No	13	7	12	11	10	6	13
	%	100	70	100	100	100	60	100

ni* - not investigated

Table 11: Results from serological investigation of 177 pigs in 9 farms.

Index	AD	M. hyo	APP	PRRS	SIV H ₃ N ₂
No of positive farms	9	9	9	5	5
% positive animals	60.90	24.86	100	12.43	15.25
No of farms with seroconversion	8	2	9	3	2
% animals with seroconversion	51.72	9.19	23,73	5.75	5.75

We detected associated infections in pigs in back yards, East Balkan breed and wild boars as well (Milev et al, 2009). In all the investigated regions we found animals in back yards with PCV2 antibodies. In Russe region positive were half of the investigated animals and in Razgrad region 90%, but in all the rest regions all the investigated animals were positive. In all of the four investigated regions we found positive on SIV antibodies and the difference between them was considerable. In 3 regions there were animals with AD antibodies with big difference between the regions. In each of the three investigated regions there were East Balkan pigs with antibodies against three viruses and the difference between the regions was small. A part of the wild boar population in both investigated regions had PCV2 antibodies and SIV antibodies, on one of them AD antibodies were present as well. In all three categories of pigs the percent of seropositive animals was the highest for PCV2 and the lowest for AD (Table 12).

Table 12: Results from investigation of different categories of pigs and different regions (Milev et al., 2009).

Category of Pigs	Region	No investing. back yards, farms, hunting areas	No Investigated Pigs	% positive for		
				PCV2	SIV	ADV
Domestic in backyards	Blagoevgrad	2	20	100	-	-
	Kjustendil	1	12	100	-	-
	Vratza	1	5	100	-	-
	Montana	2	12	100	-	-
	Yambol	1	10	100	-	-
	Gabrovo	5	59	100	28.81	20.33
	Razgrad	2	32	90.62	84.37	75
	Pleven	1	12	100	50	0
	Russe	2	16	50	87.5	6.25
East Balkan pigs	Shoumen	6	107	83.33	30.84	23.36
	Varna	2	32	100	50	31.25
	Burgas	4	72	63.89	43.05	16.67
Wild boars	Kardzhaly	1	9	55.55	11.11	0
Wild boar	Blagoevgrad	4	40	67.50	32.50	7.5

All the investigated sows and the majority of the pigs of all age groups in an industrial pig farm had antibodies against three viruses. The most positive animals for PCV2 and SIV antibodies were in finishers, but for AD antibodies – in sucklers (Table 13). The results from serologic investigations are confirmed by virologic investigations (Table 14) (Dimitrova et al., 2009).

Table: 13. Results from serological investigation (Dimitrova et al., 2009).

Category of pigs	Investigated for:					
	PCV2 ELISA antibodies		SIV HI - antibodies		AD ELISA antibodies	
	No. investi-gated	% positive	No. investi-gated	% positive	No. invest-tigated	% positive
Sucklers	20	80	30	93.33	30	93,33
Growers	50	74	40	75.00	40	47.50
Fatteners	40	92.5	30	96.67	30	46.67
Sows	10	100	10	100	10	100

Table 14. Results from virological investigation (Dimitrova et al., 2009).

Category of pigs	Investigated for:					
	ADV isolation in tissue culture		PCV2 PCR		PC V2 DIFM	
	No. investi-gated	% positive	No. investi-gated	% positive	No. investigated	% positive
Sucklers	3	66.67	-		2	100
Growers	13	30.77	3	100	4	50
Fatteners	26	42.31	ni	ni	24	58.33
Sows	ni*	ni*	ni*	ni*	Ni*	ni*

*ni – not investigated

CONCLUSIONS

1. The Bulgarian pig industry has some features, which affect the infectious diseases: sharply shrinking and constantly decreasing; rearing of pigs on large industrial and small family farms and in back yards; the existence of East Balkan breed on pastures and a population of wild boars.
2. There is a constant tendency of decrease of CSF outbreaks since 1990. The Program for Control and Eradication includes clinical, virulogical and serological monitoring of domestic pigs without vaccination and vaccination of wild boars along the western and northern border.
3. Aujeszky's disease is widespread on Bulgarian pig farms and the virus maintains itself as a latent infection. The Program for Eradication includes intensive vaccination by gE- vaccine and test and removal by gE ELISA.

4. PRRS became widespread after 2000 and induced big losses due to reproductive disorders and respiratory diseases. The vaccination decreases economical losses and the live vaccine with European strain is safe and more effective.
5. PCV2 infected Bulgarian pig industry in the recent years and spread among domestic pigs in the industrial farms and back yards, East Balkan pigs and wild boars. It induces PMWS and PDNS and immunosuppression as well. The vaccination of pigs is better than the vaccination of sows.
6. The associated infections are characteristic for Bulgarian pig industry as well and include association of two or more pathogens: PCV2, PRRS, AD, SIV, M. hyo, APP and PPV. The associated infections affect not only the industrial farms, but also back yards, East Balkan pigs and wild boars.

LITERATURE

1. Benfield, D.A., Collins J.E., Lenny A.L., Loula T.J.: Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: Diseases of swine. Ames, Iowa, Iowa State University Press, USA, 1992,
2. Benfield, D.A., Christopher-Hennings J., Nelson E.A., Rowland R.R., Nelson J.K., Rossow C. C., Collins J.E.: Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. In: Proceedings of American Association of swine Practitioners. Quebec, Canada, 1997, 455-458.
3. Dimitrova, A., Milev D., Faldgijska G., Atanasova D., Christova V.: A case of Porcine respiratory disease complex in an industrial pig farm. In: Scientific – practical conference on occasion of 108 anniversary of NDNIVMI, May 21, Sofia, 2009, Under print.
4. Kamenov, P.: Classical swine fever. Epizootiological state, control and profilactics in Republic of Bulgaria. In: Conference "One health", June 23-24, Plovdiv, 2009,
5. Milev, D., Faldgijska G., Ivanova E., Motovski A., Nikolov D., Chervenkov M.: Incidence of PCV2, SIV and ADV in wild boars, east Balkan pigs and the pigs in back yards. In: Scientific–practical conference on occasion of 108 anniversary of NDNIVMI, May 21, Sofia, 2009, Under print.
6. Motovski, A., Uostoglou P., Paul G.: Investigation on participation of four actual virus infections in pigs. *Veterinarna sbirka*, 9-10, 1999, 20-24.
7. Motovski, A.: Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary medicine*, VII, 1-2, 68-77, 2001.
8. Motovski, A.: Peculiarities in manifestation of PRRS in Bulgaria. *Veterinarna sbirka*, 3-4, 17-20, 2004.
9. Motovski, A., Segales J., Manov V., Motovski D., Milev D.: First description of circovirus infections in Bulgaria. *Veterinary medicine*, IX, 1-2, 7-11, 2005.

10. Segales, J.: Update on postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome diagnostics, *J Swine Health Prod* 10, 277-281, 2002.
11. Thacker, E.L., Halbur P.G., Ross R.F., Thanawongnuwech R., Thacker B.J.: *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induced pneumonia. *J Clinical Microbiology*, 37, 620-627, 1999.
12. Yordanov, S., I.Chenchev. First dates for the existence of Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Bulgaria. In: Proceedings of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, Brescia, Italy, 27-30 August, 2000.

Primljeno: 17.11.2009.
Odobreno: 23.11.2009.

ISPITIVANJE PRISUSTVA INFEKCIJE SA *BRUCELLA OVIS* (OVINE EPIDIDIMITIS) KOD OVACA

Živoslav Grgić¹, Branka Vidić, Sara Savić, Aleksandar Milovanović
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad

Kratak sažetak

Brucella ovis izaziva klinički manifestnu formu bolesti koja se naziva epididimitis ovnova. Uzročnik je gramnegativni kokobacil ili kratki štapić, fakultativni intracelularni patogen. Bolest karakterišu genitalne lezije koje se manifestuju u formi epididimitisa i placentitisa kod ovaca, a često infekcija protiče u subkliničkom obliku. Posledice ovog oboljenja su smanjena plodnost kod ovnova, česti abortus kod ovaca, i povećan perinatalni mortalitet. Infekcija se u zapaht najčešće unosi preko inficiranih ovnova, koji semenom izlučuju veliki broj brucela, dok je pasivna genitalna transmisija uobičajen način inficiranja. *B. ovis* izazva upalu pasemenika, semenika i utiče na fertilitnost ovnova, dok kod ovaca može uzrokovati abortus i placentitis. Ovnovi su mnogo prijemčiviji za infekciju od ovaca, a bolest se češće javlja kod starijih grla. Dijagnoza na osnovu kliničke indikacije za brucelozni epididimitis nije dovoljno pouzdana, pa se za dokazivanje infekcije sa *B. ovis* uzimaju uzorci semena, vaginalni brisevi, mleko i razmazi suspektnog tkiva koji se boje i ispituju metodom mikroskopije i kultivacijom na selektivnim hranljivim podlogama. Našim ispitivanjima obuhvaćene su ovce i ovnovi iz svih opština Južnobačkog i Sremskog okruga, kao i odabrani uzorak ovnova iz Srednjobanatskog epizootiološkog područja. Ispitivanjem su obuhvaćeni i ovnovi kod kojih su postojale kliničke indikacije za epididimitis, koje je konstatovala služba NIV-NS. Pregledano je 1500 uzoraka seruma ovaca i ovnova metodom reakciju vezivanja komplemenata (mikro-RVK). Nalaz specifičnih antitela protiv *B. ovis* u razblaženju seruma 1:5 i većem, dijagnostikovao je kao pozitivan. Nalaz specifičnih antitela protiv *B. ovis* utvrđen je kod ovaca koje potiču iz opštine Bečej i Titel na epizootiološkom području Južnobačkog okruga. Prevalenca je bila veoma niska i iznosila je 0,89%. Na epizootiološkom području Srednjobanatskog okruga, gdje su ispitivani samo ovnovi, dijagnostikovao je nešto viši nivo prevalencije za *B. ovis* (4,29%), dok na epizootiološkom području Sremskog okruga nisu dijagnostikovana seropozitivna grla na *B. ovis*. Takođe je usta-

1 E-mail: grgic@niv.ns.ac.rs

novljeno da pregledani ovnovi sa kliničkim simptomima epididimitisa nisu bili seropozitivni na *B. ovis*.

Ključne reči: ovce, *B. ovis*, epididimitis

EXAMINATION OF *BRUCELLA OVIS* (OVINE EPIDIDIMYTIS) INFECTION IN SHEEP

Živoslav Grgić, Branka Vidić, Sara Savić, Aleksandar Milovanović
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Rumenački put 20, Novi Sad

Abstract

Brucella ovis is caused by clinically manifested disease named ram epididymitis. The causative agent is a gram-negative coccobacillus or short rod, facultative intracellular pathogen. The diseases is characterized by genital lesions manifested in a form of epididymitis and placentitis in sheep, but the infection may also be subclinical. The consequences of this disease are reduced fertility in rams, frequent abortions in sheep and increased perinatal mortality. Most often the infection enters into a flock through infected rams, that shed great number of Brucella, however passive genital transmission is the usual way of infection. *B. ovis* causes inflammation of epididymis, semen and influences the fertility of rams, but in sheep it causes abortion and placentitis. Rams are more susceptible than sheep, and the disease affects adult animals. The diagnosis based only on clinical identification most often is not sufficiently reliable, so the samples of semen, vaginal swab, milk and the smears of susceptible tissues are taken and then stained, microscopically examined and cultivated on nutritive agar. Our examination encompassed sheep and rams from the municipalities in Southern Bačka and Srem district, as well as the samples from Middle Banat. The examination included also the rams with clinical symptoms of epididymitis, what had been proven by NIV-NS. There were 1500 sera samples from sheep and rams examined by the method of complement fixation (MCF). The findings of specific antibodies against *B. ovis* in dilution 1:5 was considered positive. Specific antibodies against *B. ovis* were detected in the sheep that originated from Bečej and Titel municipality, Southern Bačka district. The prevalence was very low and was 0.89%. In Middle Banat district, where only rams were examined, a higher prevalence was diagnosed for *B. ovis* (4.29%), but in Srem district no animals were seropositive on *B. ovis*. The

examined rams with clinical symptoms of epididymitis were not seropositive on *B. ovis*.

Key words: sheep, *B. ovis*, epididymitis

UVOD

Brucella ovis izaziva klinički manifestnu formu bolesti koja se naziva epididimitis ovnova. Uzročnik je gram negativni kokobacil ili kratki štapić, fakultativni intracelularni patogen. Bolest karakterišu genitalne lezije koje se manifestuju u formi epididimitisa i placentitisa kod ovaca, a često infekcija protiče u subkliničkom obliku. Shodno tome, posledice bolesti su smanjena plodnost kod ovnova, česti abortus kod ovaca, i povećan perinatalni mortalitet. Infekcija je dokazana u većini zemalja gde se gaje ovce. Bolest je prisutna u Argentini, Australiji, Austriji, Kanadi, Francuskoj, Nemačkoj, Mađarskoj, Meksiku, Novom Zelandu, Peruu, Rumuniji, Bugarskoj, Rusiji, Slovačkoj Republici, Južnoj Africi, Španiji, SAD (Blasko i sar., 1990).

Infekcija *B. ovis* u prirodnim uslovima dokazana je samo kod jelena, dok su u eksperimentalnim uslovima goveda i koze prijemčive za *B. ovis*. Do danas ne postoje izveštaji o slučajevima infekcije kod ljudi i smatra se da *B. ovis* nije zoonoza (Blasko i sar., 1990).

Infekcija se u zapat najčešće unosi preko inficiranih ovnova, koji semenom izlučuju veliki broj brucela, dok je pasivna genitalna transmisija uobičajen način inficiranja (Buling i Andersom, 1983). Ovnovi su mnogo prijemčiviji za infekciju od ovaca, a bolest se češće javlja kod starijih grla. Većina ovnova aktivno izlučuje brucele semenom tokom 2 do 4 godine ili duže (Burgess i Mcowell, 1981). Ovce su mnogo otpornije na infekciju i kraće izlučuju brucele vaginalnim iscetkom i mlekom, kada su infekciji izložena i jagnjad. Prenos sa ovna na ovna nije razjašnjen i može se ostvariti na razne načine uključujući i oralnu transmisiju. Inficirane životinje mogu izlučivati uzročnika i putem urina. Kontaminacija pašnjaka nije značajan put transmisije *B. ovis* (Burgess i Mcowell, 1981).

B. ovis može izazvati upalu pasemenika, semenika i uticati na fertilitet kod ovnova. *B. ovis* takođe može uzrokovati abortus i placentitis kod ovaca, ali se to ne dešava često. Sistemske promene su retke kod odraslih ovaca i ovnova. Procenat nivoa abortusa kod ovaca i perinatalni mortalitet je nizak i varira od 1 i 2%, a eksperimentalnim zaražavanjem do 8%. Dokaz postojanja genitalnih lezija, unilateralni ili, ređe bilateralni epididimitis utvrđuje se palpacijom testisa ovnova što može da bude indikacija prisutva ove infekcije u stadu. Međutim, dijagnoza na osnovu kliničkih znakova nije dovoljno pouzdana, pa se za dokazivanje infekcije sa *B. ovis* uzimaju uzorci semena, vaginalni brisevi, mleko i razmazi suspektnog tkiva koji se boje i ispituju metodom mikroskopije i kultivacijom na selektivnim hranljivim podlogama. Razvoj molekularnih metoda, kao što je PCR metod omogućava efikasniju etiološku dijagnozu (Bricker, 1971; Materola, 2003). Indirektna dijagnoza je zasnovana na serološkim testovima i više se koristi u rutinskoj dijagnostici. Od seroloških testova

koriste se test vezivanja komplementa (RVK) (Burgess i Norris, 1982; Corbel i sar., 1978), agar gel imunodifuzija (AGID) i ELISA test (Ris i sar., 1984).

MATERIJAL I METOD

Životinje: ispitivanjem su obuhvaćene ovce i ovnovi iz svih opština Južnobačkog i Sremskog okruga, na osnovu odabranog uzorka, kao i ovnovi iz Srednjobanatskog okruga.

Ispitivanjem su obuhvaćeni i ovnovi kod kojih su postojale kliničke indikacije za epididimitis, koje je konstatovala služba NIV-NS.

Krvni serum: Ispitivanjima je obuhvaćeno 1500 uzoraka seruma ovaca prikupljenih tokom sprovođenja Programa mera za 2005. godinu. Za ispitivanje prisustva specifičnih antitela koristili smo reakciju vezivanja komplementa (mikro-RVK). Nalaz specifičnih antitela u razblaženju seruma 1:5 i većem smatran je pozitivnim.

REZULTATI I DISKUSIJA

Tokom ispitivanja ustanovljeni su rezultati prikazani su u tabelama 1, 2. i 3. Na Južnobačkom epizootiološkom području primenom RVK ispitano je 779 uzoraka seruma ovaca od ukupno 47790 seruma ovaca koji su ispitani na brucelozi prema Programu mera za 2005. godinu. Pozitivni nalazi dobijeni su kod 7 uzorka seruma. Pozitivni nalazi utvrđeni su kod ovaca koje potiču iz opštine Bečej i Titel. Prevalencija infekcije ovaca sa *B. ovis* na Južnobačkom epizootiološkom području je iznosila P= 0,89% (tabela 1).

Tabela 1. Nalaz RVK antitela za *B. ovis* u krvnom serumu ovaca na Južnobačkom epizootiološkom području

Opština	Broj ovaca u opštini	Broj ispitanih uzoraka	% ispitanih uzoraka seruma u odnosu na br. ovaca	Br. pozitivnih u odnosu na br. ispitanih	Stepen prevalencije ispitane populacije ovaca
Bač	5104	83	1,62	-	-
Bačka Palanka	8832	145	1,64	-	-
Bački Petrovac	203	4	1,94	-	-
Bečej	11411	187	1,63	5	2,67
Novi Sad	8453	137	1,62	-	-
Srbobran	3147	50	1,58	-	-
Temerin	1273	22	1,72	-	-
Titel	4309	70	1,62	2	2,87
Žabalj	5058	81	1,60	-	-
Ukupno	47790	779	1,63	7	0,89

U krvnim serumima (651) ovaca koje potiču iz sremskog epizootiološkog područja (populaciji od 41187 životinja) dobijeni su negativni nalazi na prisustvo *B. ovis* (tabela 2).

Analizirajući epizootiološka područja Južnobačkog i Sremskog okruga sa ukupno 88977 životinja, dobijeni su rezultati prevalencije na infekciju ovaca sa *B. ovis* od $P=0,49$. U okviru navedenih ispitivanja uključeni su i krvni serumi 70 ovnova sa Srednjobanatskog epizootiološkog područja, gde smo ispitivanjem ustanovili 3 pozitivne životinje. Na osnovu svih izvršenih ispitivanja uzoraka seruma ovaca utvrđeno je 10, odnosno 0,66%, pozitivnih životinja na *B. ovis* (tabela 3).

Tabela 2. Nalaz RVK antitela protiv *B. ovis* u krvnom serumu ovaca na području Sremskog okruga

Opština	Broj ovaca u opštini	Broj ispitanih uzoraka	% ispitanih uzoraka seruma u odnosu na br. ovaca	Br. pozitivnih u odnosu na br. ispitanih	Stepen prevalencije ispitane populacije ovaca
Beočin	2456	38	1,54	-	-
Indija	5880	93	1,58	-	-
Irig	2927	45	1,53	-	-
Pečinci	3936	61	1,54	-	-
Ruma	4934	78	1,58	-	-
Sr. Karlovci	731	13	1,77	-	-
Sr. Mitrovica	10007	159	1,58	-	-
St. Pazova	4069	65	1,59	-	-
Šid	6247	99	1,58	-	-
Ukupno	41187	651	1,58	-	-

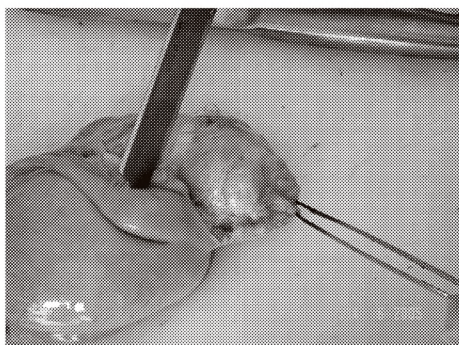
Tabela 3. - Zbirni rezultati ispitivanja krvi ovaca na *B. ovis*

Epizootiološko područje	Ukupan br. ovaca u epizootiološkom području	Broj ispitanih uzoraka	% ispitanih uzoraka seruma u odnosu na br. ovaca	Br. pozitivnih u odnosu na br. ispitanih	Stepen prevalencije ispitane populacije ovaca
Južna Bačka	47790	779	1,63	7	P = 0,89
Srem	41187	651	1,58	-	-
Južna Bačka i Srem	88977	1430	1,61	7	P = 0,49
Srednji Banat	13287	70*	0,52	3	P = 4,29
Ukupno	102264	1500	1,46	10	P = 0,66

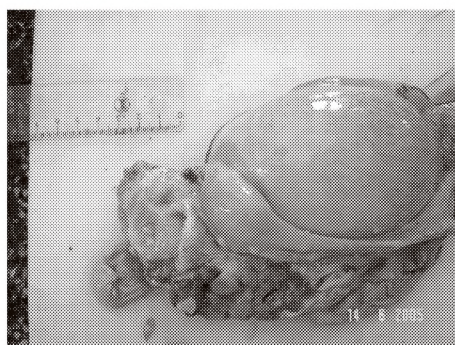
*Uzorci seruma ovnova

Potrebno je istaći da su uzorci seruma kod kojih je dobijen pozitivan i sumnjiv nalaz na *B. ovis*, ispitani i na *B. melitensis* i da je dobijen negativan nalaz. U okviru ispitanih uzoraka nalazili su se i krvni serumi 7 ovnova koji su imali kliničke

indikacije za brucelozni epididimitis, ali je serološki nalaz bio negativan. Bakteriološkim ispitivanjem gnojnih apscesa (slika 1 i 2) i prepucijalnog sadržaja ovnova sa genitalnim lezijama nije izolovana patogena mikroflora.



Slika 1. Gnojni apsces na epididimisu



Slika 2. Gnojni apsces na epididimisu

Kod svih genitalnih lezija ovnova potrebno je postaviti osnovanu sumnju na mogući epididimitis uzrokovan *B. ovis*-om. Međutim, lezije koje se mogu palpirati ne moraju biti nađene kod svih inficiranih ovnova, pa je neophodno izvršiti i laboratorijska ispitivanja. Mnoge lezije na epididimisu ustanovljene palpacijom kod ovnova su često sterilni granulomi izazvani traumom. Sumnju da je infekcija prisutna pobuđuje loš kvalitet semena u kome je prisutan veliki broj leukocita. Postojanje kliničkih lezija kod ovnova može biti indikacija o postojanju infekcije, ali da bi se potvrdila bolest neophodno je laboratorijsko ispitivanje. U ranoj fazi oboljenja se može konstatovati samo slab kvalitet semena, koji se ispoljava u vidu smanjene pokretljivosti, broja i anomalija u izgledu spermatozoida. U poodmakloj fazi oboljenja mogu se palpirati lezije na epididimisu i skrotumu. Epididimitis može biti unilateralan ili povremeno bilateralan. Testisi mogu atrofirati. Lezije koje se mogu palpirati su uglavnom trajne, a u nekim slučajevima mogu biti prolazne. Oko 30 do 50% svih inficiranih ovnova ima lezije na epididimisu koje se mogu palpirati. Kod nekih ovnova su opisani slučajevi izlučivanja *B. ovis* bez klinički vidljivih lezija. Međutim, ova klinička dijagnoza nije dovoljno osetljiva jer je epididimitis prisutan kod oko 50% ovnova inficiranih *B. ovis*-om (Blasko, 1990). Takođe, klinička dijagnoza je nespecifična i zbog postojanja mnogih drugih bakterija koje izazivaju klinički epididimitis (*Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetemocomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus spp.*, *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *B. melitensis* i *Chlamydophila abortus*). *B. ovis* nema zoonozni karakter, međutim na područjima gde *B. ovis* koegzistira sa *B. melitensis* potrebna je posebna pažnja prilikom uzorkovanja, rukovanja i slanja uzoraka, jer je *B. melitensis* visoko patogena za ljude. Za dokazivanje infekcije *B. ovis*-om uzimaju se uzorci semena, vaginalni brisevi, mleko i razmazi suspektnog tkiva koji se mogu obojiti i ispitati mikroskopijom. *B. ovis* se može izolovati iz uzoraka semena od živih ovnova i iz vaginalnih briseva kao i

mleka ovaca. Neophodno je dvokratno uzorkovanje semena jer se *B. ovis* izlučuje povremeno (intermitentno). Pri sekciji kod ovnova sa kliničkim znacima koji ukazuju na infekciju *B. ovis*-om najbolje je uzeti uzorak dela pasemenika, seminalne kesice i ingvinalnih limfnih čvorova. Kod ovaca se uzorkuje uterusni, ilijačni i supramamarni limfni čvorovi. Kod abortiranih ili mrtvorodenih jagnjadi za kultivaciju su najpogodniji abomazusni sadržaj i pluća.

Laboratorijska potvrda može da se bazira na direktnim i indirektnim metodima. Mikroskopski pregled semena ili preparati obojeni po *Stamp*-u mogu biti korisni za postavljanje sumnje na infekciju. Brucele su kokobacili ili kratki štapići obično postavljeni pojedinačno ili ponekada u paru ili manjim grupama. Ovaj test nije definitivan jer i drugi agensi, kao što su *Chlamydophila abortus* i *Coxiella burnetii*, mogu ličiti na brucele. Direktna dijagnoza se vrši bakteriološkim metodima, izolacijom *B. ovis* iz uzoraka semena, tkiva, vaginalnog iscetka i mleka ovaca, na adekvatnim selektivnim podlogama (Worthington i sar., 1985). *Brucella* spp. se može izolovati na mnogim jednostavnim ili selektivnim podlogama poput *Farrel*-ove podloge ili *Thayer-Martin*-ove modifikovane podloge (Marin i sar, 1996). Tehnike obogaćenja se takođe mogu koristiti. Kolonije *B. ovis* obično postaju vidljive posle tri do četiri dana. Kolonije su okrugle, sjajne i konveksne oko 0,5 do 2,5 mm u dijametru. *B. ovis* je hrapava forma *Brucella* što se može videti ukoliko se kolonija posmatra preko ukošene iluminacije. *B. ovis* se identifikuje do nivoa vrste preko kulturelnih, biohemijskih i seroloških karakteristika, a fagotipizacijom se može izvršiti definitivna identifikacija. Razvoj molekularnih metoda, kao što je PCR metod omogućava efikasniju etiološku dijagnozu (Bricker, 2002). Indirektna dijagnoza je zasnovana na serološkim testovima i više se koristi u rutinskoj dijagnostici. Od seroloških testova koriste se test vezivanja komplementa (RVK) (Burgess i Norris, 1982), agar gel imunodifuzija (AGID) i ELISA test (Ris i sar., 1984). ELISA test je pokazao veću osetljivost u odnosu na RVK i AGID (Myers i sar., 1972). Međutim, propisani standardni test i dalje je RVK (Corbel i sar., 1978; OIE Manual 2008).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se oceniti da je u odnosu na podatke iz drugih zemalja nivo seroprevalence na *B. ovis* nizak, odnosno nizak stepen inficiranosti sa *B. ovis*. Dobijeni rezultati ispitivanja raširenosti infekcije su ohrabrujući i sa aspekta primenjenog RVK testa. Međutim, prema podacima iz literature, ELISA test koji primenjuju pojedine laboratorije je veoma osetljiv i specifičan metod i neke zemlje ga koriste u programima kontrole ove bolesti.

U daljem praćenju rasprostranjenosti ovog oboljenja preporučuje se korišćenje oba serološka metoda. Takođe je neophodno kod svih genitalnih lezija ovnova postaviti osnovanu sumnju na mogući epididimitis uzrokovan *B. ovis*-om. Tokom naših ispitivanja broj pregledanih životinja ne bi se mogao smatrati reprezentativnim u odnosu na ukupan broj ovaca, pre svega ovnova koji u širenju infekcije imaju prvorazredni značaj. Činjenica da je infekcija *B. ovis*-om dokazana u populaciji ovaca što ukazuje na potrebu da se ovoj infekciji mora posvetiti određena pažnja. U narednom periodu treba vršiti serološka ispitivanja ovnova jednom godišnje, upravo

iz razloga što rezultati naših ispitivanja ukazuju na nizak stepen prevalence, dok je prema podacima iz literature u zemljama koje su prvi put vršile ispitivanja na *B. ovis* utvrđen značajan procenat seroreaktora i preko 20%. Dobijeni rezultati ne bi trebali biti razlog da se epididimitis izazvan brucelama neopravdano zapostavi u budućnosti, već da se status niske prevalence za ovo oboljenje nastoji zadržati primenom mera koje bi sprečile unošenje i širenje infekcije kod ovaca. Ovnovi za priplod moraju se periodično klinički pregledati i vršiti kontrola kvaliteta njihovog semena. Voditi računa o zdravstvenom stanju ovnova kod uvođenja u zapaat. Vršiti kvalitetan odabir i negu mladih ovnova za remont. Mlade ovnove držati odvojeno od starijih. Posebnu pažnju obratiti kod životinja iz uvoza na ovu infekciju.

Obolele životinje se mogu lečiti antibioticima i oksitetraciklinima, što se preporučuje kod nekih vrednih ovnova ali nije ekonomski isplativo. Fertilitnost može ostati niska čak i ako je mikroorganizam eliminisan. Infekcija ovaca se prevenira kontrolom ovnova.

Brucella vrste se mogu eliminisati sa kontaminiranih predmeta i okoline primenom dostupnih dezinficijenasa kao što su: hipohloritni rastvori, 70% etanol, isopropanol, fenolni dezinficijensi, formaldehid, glutaraldehid i ksilen, međutim organska supstanca i niske temperature dovode do opadanja efikasnosti dezinficijenasa. Dezinficijensi za koje je pokazano da uništavaju *Brucellu* na kontaminiranim površinama su 2,5% Na-hipohlorit, 2-3% kaustična soda, 20% suspenzija kreča ili 2% rastvor formaldehida.

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je nivo prevalence kod pregledanih grla ovaca za *B. ovis* na epizootiološkom području Južnobačkog okruga veoma niska i iznosi 0,89%. Na epizootiološkom području Srednjobanatskog okruga je dijagnostikovano nešto viši nivo prevalence za *B. ovis* gdje su ispitivani samo ovnovi i iznosi 4,29%, dok na epizootiološkom području Sremskog okruga nisu dijagnostikovana seropozitivna grla ovaca na *B. ovis*. Takođe je ustanovljeno da pregledani ovnovi sa kliničkim simptomima epididimitisa nisu bili seropozitivni na *B. ovis*.

LITERATURA

1. Blasko J.M.: *Brucella ovis*. Animal brucellosis, Boca Ration: CRC Press Florida, USA, 351-378, 1990.
2. Bricker B.J.: PCR as a diagnostic tool for brucellosis, *Vet Microbiol*, 90, 435-446, 2002.
3. Brown G.M., Ranger C.R., Kelley D.J.: Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. *Cornell Vet*, 61, 265-280, 1971.
4. Buling M.S., Andersom B.C.: Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *J Am Med Assoc*, 182, 372-374, 1983.

5. Burgess G.W., Mcowell J.W.: *Escherichia coli* epididymitis and seminal vesiculitis in a ram. *Aust Vet J*, 57, 479-480, 1981.
6. Burgess G.W., Norris M. J.: Evaluation of the cold complement fixation for diagnosis of ovine brucellosis. *Aust Vet J*, 59, 23-25, 1982.
7. Corbel M.J., Gill K.P.W., Thomas E.L.: Methods for the identification of *Brucella*. In: Fisheries and Food, Ministry of Agriculture, UK, ADAS, RCV 22, 1978.
8. Materola L., Tejero-Garcés A., Ficapal A., Shopayeva G., Blasco J.M., Marin C.M., López-Goni I.: Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet Microbiol*, 92, 65-72, 2003.
9. Marin C.M., Alabart J.L., Blasco J.M.: Effect of antibiotics contained in two *brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*, *J Clin*, 34, 426-428, 1996.
10. Marin C.M., Jimenez De Bagues M.P., Blasco J.M., Gamazo C., Moriyon I., Diaz R.: Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet Rec*, 125, 504-508, 1989.
11. Myers D.M., Jones L.M., Varela-Diaz V.: Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*, *Appl Microbiol*, 23, 894-902, 1972.
12. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th edition, Part 2, Section 2.7, Chapter 2.7.9. Ovine Epididymitis (*Brucella ovis*), 2008.
13. Ris D.R., Hamel K.L., Long D.L.: Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection, *N Z Vet J*, 32, 18-80, 1984.
14. Worthington R.W., Stevenson B.J. & De Lisle G.W.: Serology and semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *N Z Vet J*, 33, 84-86, 1985.

Primljeno: 15.11.2009.
Odobreno: 27.11.2009.

Arhiv veterinarske medicine, vol. 2, br. 2, 17-25, 2009.
Grgić, Ž. i dr.: Ispitivanje prisustva infekcije...

ETIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGICAL INVESTIGATION OF CAPRINE HERPESVIRUS 1 ISOLATED IN BULGARIA¹

Raiko Peshev, Ivo Sirakov, Nedelcho Nedelchev, Stoil Karadzhov
National Diagnostic and Research Veterinary Medical Institute
"Prof. d-r. G. Pavlov", P. Slaveikov 15, Blvd., Sofia, Bulgaria

Abstract

From goat and bucks with genital disorders and abortions the attempts for isolation of caprine herpesvirus 1 (CHV 1) were carried out. For virus exaltation Dexametazone was used. For viruses isolation vaginal, nasal, rectal, preputial swabs and organ samples were used. Primary and continuous cell cultures rabbit kidney (RK), Madin Darby bovine kidney (MDBK), and embrional bovine trachea (EBTR) were used for cultivation. For determination of DNA type and lipid envelop 60 µg/ml iod desoxiuridine (JDUR) and the ether treatment was used. Neutralization by specific hyperimmune serum obtained from Switzerland was performed. Five CHV 1 strains were isolated by cell cultures and identified as goat herpesviruses from different Bulgarian regions. After electron microscopy the viral agents with typical size and morphology for herpesviruses were established. For demonstration gC gene of CHV 1 the polymerase chain reaction (PCR) with primers designed from sequences deposited in gene bank were developed. Isolated on cell cultures herpesviruses were proved as caprine herpesvirus 1 by using applied PCR variant. The products after gC gene amplification from Bulgarian isolates were separated on the same place as the amplicons of reference CHV 1 strains.

Key words: CHV 1, PCR method, gC gen

1 Rad je saopšten na 8. kongresu veterinara Srbije, 15-19. septembra 2009. godine, Beograd

ETIOLOŠKO I MOLEKULARNO-BIOLOŠKO ISTRAŽIVANJE KOZIJE HERPESVIRUSA 1 IZOLOVANO U BUGARSKOJ

Kratak sadržaj

Kod koza i jaraca sa genitalnim poremećajima i abortusima pokušali smo da izolujemo koziji herpesvirus 1 (CHV 1). Za reaktivaciju virusa korišćen je Dexametazon. Za izolaciju virusa korišćeni su vaginalni, nazalni, rektalni i prepucionalni bris. Za izolaciju – kultivaciju virusa su se koristile primarne i kontinuirane kulture ćelija bubrega zeca („rabbit kidney – RK”), bubrega goveda („Madin Darby bovine kidney – MDBK”) i embrionalne traheje goveda („embrional bovine trachea – EBTR”). Za određivanje DNK tipa i lipidnog omotača upotrebljeno je 60 µg/ml jod dezoksiuridina (JDUR) i tretiranje etrom. Urađena je neutralizacija specifičnim hiperimunim serumom koji je dobijen iz Švajcarske. Pet CHV 1 sojeva iz različitih oblasti Bugarske je izolovano na kulturama ćelija i identifikovano kao koziji herpesvirus. Nakon elektronske mikroskopije virusni agensi tipične veličine i morfologije su prepoznati kao herpesvirus. Za dokazivanje gC gena CHV 1 upotrebljena je lančana reakcije polimeraze (PCR) sa prajmerima koji su dizajnirani na osnovu virusnih sekvenci prijavljenih u banci gena. Upotrebom primenjene PCR tehnike, na kulturi ćelija izolovani herpesvirusi su potvrđeni kao koziji herpesvirus 1. Sekvence umnoženih gC delova genoma bugarskih izolata su se locirale na istom mestu u filogenetskom stablu kao i sekvence referentnih CHV 1 sojeva.

Ključne reči: CHV 1, PCR metod, gC gen

INTRODUCTION

Caprine herpesvirus 1 (CHV 1) is a DNA containing virus with a diameter 120-150 nm and lipid envelope. The antigenic peculiarity of virus is not well studied. According to Engels et al. (1987) viral DNA has a high homology with bovine herpesvirus 1 DNA. After investigation of agent by neutralization test, ELISA and restrictase fragment pattern analysis is determined that CHV 1 is immunologically different from herpesviruses in big ruminants and elks (5, 10, 18). Glycoproteins with molecular weight 74 and 91kD are responsible for cross neutralization between bovine and caprine herpesvirus. Despite the differences in molecular weight it was de-

terminated by PAGE that the polypeptides of goat and bovine herpesviruses have similar mobility (2).

The first report for CHV1 comes in early 1974 from Saito et al. (13) in California who described the disease with high percent mortality among angora goats. In young animals CHV 1 caused generalized infection damaging gastrointestinal and respiratory tracts (1). Macroscopically are visible ulcer and necroses in all gastrointestinal channels, changes in lungs, urinary bladder and liver. Pathohistologically are observed heavy necrotizing enteritis, as well as thickening of alveolar septa and necrotic bronchoalveolitis (12). Clear microscopic damages are observed also in liver, urinary bladder, spleen, thymus, mesenterial lymph nodes and kidney. The disease is accompanied with diarrhea, rhinitis, tracheitis, breathing disturbance and later suppurative nasal discharges.

In bucks the virus caused balanopostitis and penopostitis and in goats vulvovaginitis (8, 14, 15). From damaged genital tract the infection is transmitted by breeding. Abortions are observed, too (17, 19).

The number of isolated CHV 1 in the world is limited. Some parts of epidemiology, pathogenesis and spreading of the disease are not well elucidating. This is the reason to isolate etiological agent and study the cultural and genome characteristics.

In this paper is described the isolation and identification of CHV 1 causing goat infection and by using the physicochemical and molecular biological methods to study some biological peculiarity of the virus.

MATERIAL AND METHODS

Nasal, vaginal and preputial swabs, lung lavages, 10% suspension in phosphate buffered saline (PBS) from internal organs, probang test, buffy coats, fecal and milk samples were used for virus isolation. Totally 163 samples were checked. The samples originated from several country regions: Troian, Suhindol, Kustendil, P.Bania, Smolian, Haskovo, Yambol.

For herpesvirus isolation the method for exaltation by dexamethasone (DMSO) was used (3).

Cell cultures, media and solutions

For virus isolation and identification of viruses primary and permanent cell cultures were used. The primary cell cultures were obtained newborn rabbit kidney and as permanent cell lines Madin Darby bovine kidney (MDBK), (AUBEK), Georgia bovine kidney (GBK), embryonic bovine trachea (EBTR) and calf trachea (TTr). For washing cell culture PBS with rN 7.4 or normal saline were used. As growing media Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) in Hanks balanced salts solution supplemented with 10% fetal calf sera (FCS) and as a supportive media the same media with 2% FCS were used. As additives penicillin 100 UI/mL, streptomycin 100 γ /mL, 0.2 M/L L – glutamine and NaHCO₃ were added.

Isolation and identification of CHV 1 on cell cultures

For infection cell cultures with complete monolayer were used. After elimination of media and washing with PBS or normal saline 0.2 mL virus inoculums were added. Depending on the type of samples adsorption varied between 60 and 120 min at temperature of 37°C. After washing of cell monolayers and adding the maintaining media the tubes were placed in a roller at 37°C. Simultaneously, with the investigated samples non infected control cells were used in the same condition.

Microscopically, the isolates growth was controlled daily by determination the presence of cytopathic effect (CPE) on monolayers. In attempts for primary isolation the cell cultures were observed microscopically 7 days after the infection. Three consecutive passages were performed when CPE was missing and more passages - when CPE was visible. Because of the difficulties connected to the primary isolation of CHV 1 other methods for cultivation were used – infection on fresh monolayer, young 24 h cell cultures or in cell suspension.

Identification of viral agents in the infected cell monolayers with CPE were accomplished by the methods described by Payment and Trudel (1993). To determine the nucleic acid type the viral isolates were treated with 60 µg/mL 5-jodo-2-deoxyuridine (JDUR), and for lipid presence treated with 20% ether.

In neutralization reaction β-variant the reference hyperimmune sera from Switzerland had titer of 8 log₂. The observed CPE was similar to CHV. The serum participated in maintain media at constant dilution 1:4, and investigated isolates in 10 times increasing dilution. As control the reference CHV 1 strain E/CH with a titer 10^{7.33} TCID₅₀/mL on MDBK was applied. As control heterologous RNA strain paramyxovirus parainfluenzae 3 virus "Svetovrachene" strain was used.

Electron microscopy

Electron microscopy investigation was performed with direct electron microscopy (DEM) after slow speed centrifugation of viral isolates 2000 rpm/20 min. Supernatants were differentially centrifuged for 1h at 30000xg and the obtained pellet were dissolved in minimal volume sterile distilled water – 0.5 ml, after which new slow speed centrifugation was carried out at 2000 rpm/20 min. For performance of DEM the clear supernatants were added onto butvar and carbon coated copper grids with 400 mesh and negative staining were performed with 2% sodium phosphotungstate rN 5.8 or 2% uranyl acetate rN 4.2-4.5.

The investigations were carried out by electron microscope JEM 1200 EX with accelerated tension 80 kV and instrumental enlargement 40000 to 75000X.

Molecular biological investigation

The viruses were cultivated in cell culture and in 80% visible CPE they were harvested. Commercial kit GIAamp DNA mini kit Qiagen, GmbH, Hilden Germany was used for isolation of DNA following the kit instruction. The DNA amount was con-

trolled spectrophotometrically with Jenway apparatus (Genova) and by gel electrophoresis and was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the following pairs of primers corresponding to sequences 759–779 and 1172–1154 from the gene bank:

Forward R₁ 5' - AGGGCGCCGGTGGATGCTCTG - 3'

Reverse R₂ 5' - GGCGGGCGGTGCGTCGTGA - 3'

Reaction was conducted in a volume of 25 µL, using Fidely tag PCR Master mix (2X), forward primer P₁, reverse primer P₂ and DNA template. Thermocycler QB - 96 (LKB) and the program described from Hecht et al. (1995) were used for PCR reactions.

Heated lid 110°C

1 cycle

Denaturation 96°C-10 min; Annealing 65°C-1 min; Elongation 72°C-1 min.

Following from 35 cycles

Denaturation 95°C-1 min; Annealing 65°C-1.30 min; Elongation 72°C-1 min.

Final Elongation at 72°C for 5 min.

DNA extraction and PCR products were electrophoresed on 2% agarosa with ethidium bromide (1mg/ml) and were visualized by UV transiluminator. For PCR specificity closely related IBR "Ozet" strain were included.

Serological investigation by micro virus neutralization test (MVNT)

Sera from goats with clinical symptoms typical for CHV 1 infection and recovered were investigated for antibodies against CHV 1 by micro virus neutralization test (MVNT) - β variant. The sera were temperature treated at 56°S for 30 min, after that serial two fold dilution in maintenance media MEM Eagle, penicillin 100 UI/mL, streptomycin 100 µg/mL, 2 mM/L L-glutamin, 1.5 g/L sodium bicarbonate were performed. Hundred tissue culture infectious dose 50/mL (TCID₅₀/mL) from reference strain E/CH with a titer 10^{7.3} was added to dilute sera. The mixtures were incubated at 37°S for 2 h. After that the indication system - cell line MDBK at quantity 4h10⁻⁴ cells/mL was added.

The account of results was performed till 72 h. The highest dilutions of sera giving complete growth suppression of indicator virus were accepted as serum titer.

RESULTS

Viral agents were isolated only after dexametazone treatment from animals with antibodies against CHV 1. The viruses were isolated only from vaginal and preputial swabs. The virus isolates have cultural and biochemical characteristics typical for caprine herpesvirus 1. From goats and bucks with problems in breeding 5 CHV 1 strains were isolated: Troian, Suhindol, Kustendil, P. Bania and Biser.

The citopatic effect on primary and permanent cell cultures depended on used cell lines and started with rounding of cells. Between 6 and 12 h after infection of monolayers only single cells were rounded. Cytopatic effect on 24 h became more diffuse and great number of cells was damaged (Fig. 1A) after which the speed changes

on monolayers were visible. At 48 h on cell monolayers were observed extended empty places as a result of the viral growth (Fig. 1B) and after 48 h the part of cell monolayers was detached from the tube walls and after 72 h a destruction of monolayers was visible (Fig.1 C). In control non infected MDBK cell cultures the cytopathic effect was not observed (Fig. 1 D)

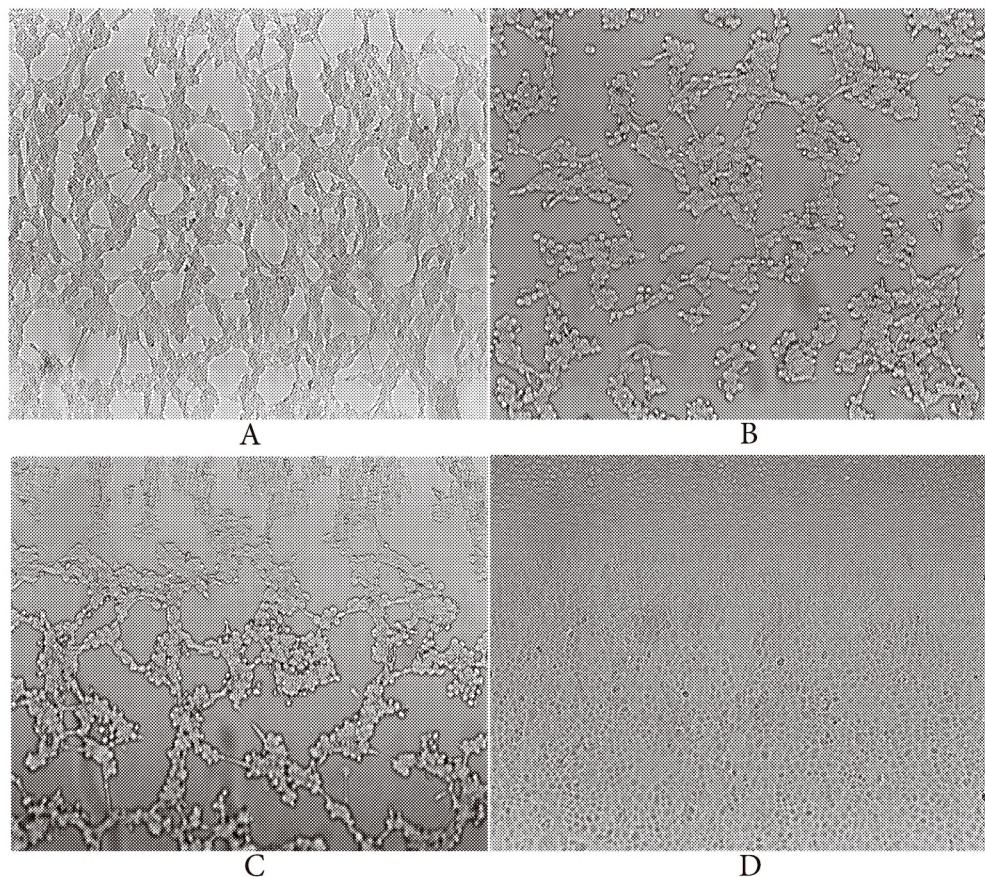


Fig. 1. Cytopathic effect of isolate "Suhindol" on cell culture MDBK: A - 24 h after infection, B - 48 h post infection, C - 72 h after infection, D - control non infected cell culture MDBK. Magnification - 200H.

The obtained results during investigation for identification of agents in infected cell cultures are shown in Table 1.

Table 1. Data from biochemical and molecular biological studies for determination of nucleic acid type, effect of HIS against CHV 1, presence of lipid coat, impact of low and high pH buffers with five CHV 1 isolates, reference E/CH strain and heterologous Pi-3 strain "Svetovrachene".

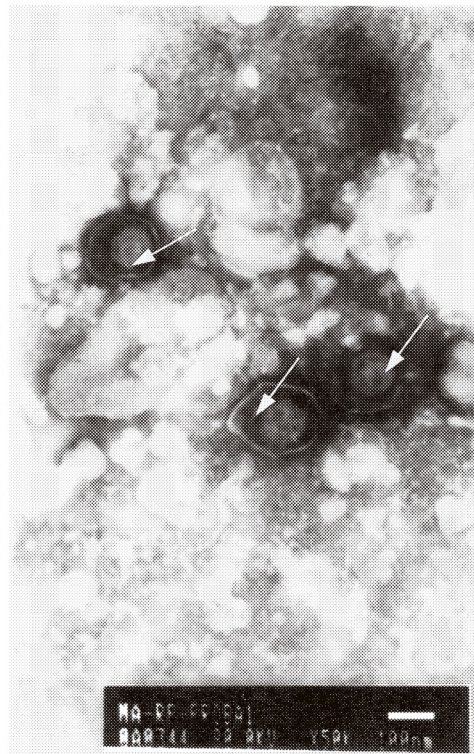
Sample	Strain titration after treatment with				
	Titers before treatment	60 γ /ml JDUR	HIS anti CHV 1	20% ether	Buffer with rN<3 and > 8
goat "Trojan"	10 ^{-7.32}	10 ^{-3.0}	10 ⁻¹	-	-
7892 goat "Suhindol"	10 ^{-6.33}	10 ^{-2.33}	10 ^{-1.50}	-	-
buck "Kustendil"	10 ^{-5.66}	10 ^{-2.0}	-	-	-
buck "P. Bania"	10 ^{-6.33}	10 ^{-3.0}	-	-	-
buck "Biser"	10 ^{-4.66}	10 ^{-2.0}	-	-	-
Referent strain E/SN	10 ^{-7.33}	10 ^{-2.33}	10 ^{-1.33}	-	-
Pi-3 "Svetovrachene"	10 ^{-5.33}	10 ^{-5.33}	10 ^{-5.33}	-	-

After treatment with 60 γ /mL 5-jodo-2-deoxyuridine (JDUR) for the determination of nucleic acid type in 5 isolates a suppression of growth with more than 3-4log₁₀ was established. In treatment of referent strain E/SN a suppression of growth - 5 log₁₀ in comparison with non treated virus. Suppression of viral titer was not found in RNA strain Paramyxovirus PI-3 "Svetovrachene". After neutralization test with positive hyperimmune sera from Switzerland in all new isolated strains a suppression between 4-6 log₁₀ was obtained. In reference strain E/CH also was determined reduction in viral titer with 6 log₁₀. In heterologous strain "Svetovrachene" such decrease in viral titer was not observed.

The five isolates, referent E/CH and control RNA viral strain were not growing on cell culture after treatment with 20% ether.

After electron microscopy the viral particles with diameter approximately 150-180 nm and typical for herpesviruses morphology were observed (Fig. 2).

Fig. 2. Electron microscopy of viral isolate "Suhindol". With arrows are noted viral particles.



In molecular biological investigation the quantity of DNA obtained by Giagen columns varied between 163.5 ng/ μ l and 198.2 ng/ μ l. After using PCR master mix with the described program multiplication of gC gene was possible. Products with size 414 bp for all 5 caprine herpesviruses isolated in Bulgaria and for all reference strain from Europe and USA were obtained after performing PCR reaction (Fig. 3). There was not multiplication of genome of investigated IBR "Ozet" strain in using the same primers and procedure for PCR specificity.

Fig. 3.

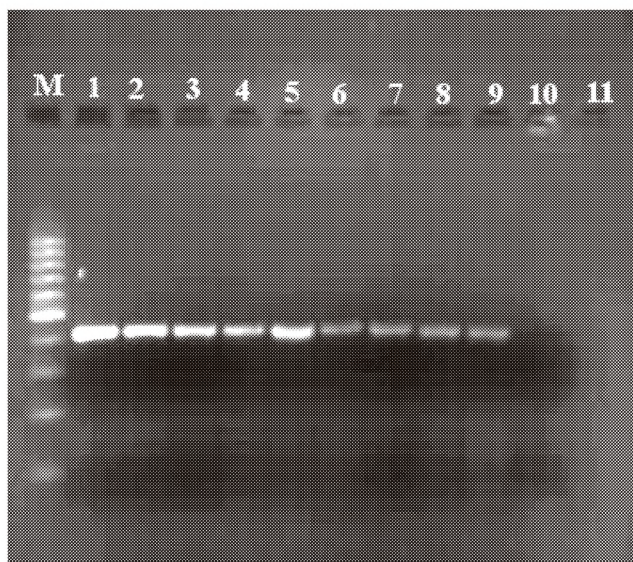


Fig. 3. Polymerase chain reaction of 5 Bulgarian isolates and reference CHV 1 strains. Lane M, 1-kb ladder as a size marker, lane 1-"Trojan", lane 2-"Suhindol", lane 3-"P. Bania", lane 4-"Kustendil", lane 5-"E/CH", lane 6-"McKercher", lane 7-"Sp-1", lane 8-"Sp-2", lane 9-"Biser", lane 10-"IBR-Ozet", lane 11-non infected cell culture -MDBK.

After serological investigation in five country regions from which the viruses were isolated an increase of antibody titers two and more $\log_2$ in paired sera was determined against referent E/CH strain (Fig. 4).

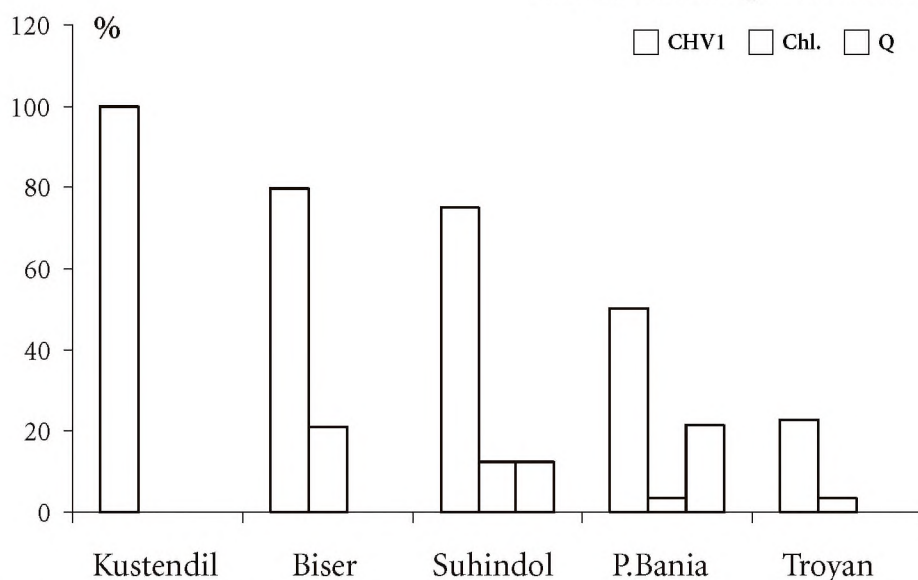


Fig. 4. Percent distribution of positive serum samples against referent E/CH strains and Chlamydomphilla and Q-fever in investigated flocks.

The highest percent positive sample in Kustendil (100%) followed by Biser (79.9%), Suhindol (75%), P. Bania (50%), and Troian (22.75%) were found (Fig. 4). The number of positive bucks increased after breeding campaign, and also the titer of antibodies was increased in comparison with antibody titers before the campaign. In some goats were determined repeating twice and three time heat especially in Troyan, Suhindol and P. Bania farms. Additionally titers against chlamidophilla pursue infection were determined for Troyan (3.44%), Suhindol (12.5%), P. Bania (3.57%), Biser (21%) and against coxiella burnety in Suhindol (12.5%) and P. Bania (21.42%) only.

DISCUSSION

Using the scheme (Buonavoglia et al., 1996) for exaltation of caprine herpesvirus 1 we succeed to isolate five CHV 1 strains from vaginal and preputial swabs. The virus isolated only from vaginal swabs, but not from nasal, rectal swabs and buffy coat. The isolation of goat and bucks viruses was possible with high DMSO doses between 3 and 9 days after finishing the treatment of positive for antibodies animals. Smaller DMSO doses were not enough for virus isolation.

The cytopatogenic effect in the adaptation and cultivation of strains was with mild changes with rounding of the cells after that the monolayer was destructed as described by Engels et al. (1983) changes. The grow rate of new isolated CHV 1 strains by us was more rapid in comparison with that of bovine herpesvirus 1 as Engels et al. (1983) established for CHV 1 strain. After latent period of 5 h exponential phases of virus growing 6 to 12 h after infection was observed. The cytopatic effect of isolated viral agents on cell cultures with rabbit and bovine origin was more diffuse than the

bovine herpesviruses. Most probably that is the results of higher citolitic properties of CHV 1 in comparison with BHV 1.

After treatment with JDUR and the applying of MVNT with hyperimmune sera from Switzerland against reference CHV 1 strain the viral titers were decreased with more than $2\text{-}4\log_2$. This is the evidence that the isolated viral agents were CHV 1. The complete suppression of viral growth after treatment with ether confirmed that the new isolated samples and reference controls are with lipids bilayers of membrane. This is supported by the fact that the heterologous Pi 3 virus is suppressed from a treatment with 20% ether. At lower and higher pH solutions the growth of viral isolates is also suppressed. The probable reason for this is the repression of contacts between viral antigens and cell receptors and the impossibility for entrance and multiplication of causative agents in cell cultures.

At electron microscopy studies viral agents with typical size and morphology for herpesviruses were determined.

The observed biological peculiarities of all 5 Bulgarian isolates by performed PCR reaction similar to reference CHV 1 strains E/CH and McKercher are the evidence that all five isolates are CHV 1 strain. This permit us to conclude that PCR reaction with the described primers and procedures can be used for rapid and exact diagnosis.

After investigation by MVNT of sera originating from animals in acute and convalescent period of the disease from the five farms we detected an increase in antibody titers with two and more logarithms against reference CHV 1 strain which is an indication for CHV 1 circulation in flocks. On some farms the established antibody titers were a result of single infection, while on other farms it was accompanied with chlamydothilla and q-fever infections. The disease elapsed more heavily in the presence of these accompanying infections and recovering period of animals was long lasting and often in next breeding season the breedings were hampered.

CONCLUSIONS

1. Isolation and adaptation of five goat herpesviruses were possible only after treatment with DMSO.
2. CHV 1 viral strains can be successfully adapted on primar and permanent cell culture of bovine origin.
3. Isolated viral agents have cultural, biochemical and morphological characteristics typical for CHV 1.
4. The amplicons of all virus strain after performed PCR assay have the same size and mobility as the reference CHV 1 strains.
5. Statistically significant increasing of MVNT antibody titers in recovaescent sera is the evidence for circulation of CHV 1 on goat farms.

LITERATURE

1. Berrious P. E., McKercher D.G.: Characterization of a caprine herpesvirus. *Am J Vet Res*, 36, 12, 1755-62, 1975.

2. Buddle B.M., Pfeffer A., Cole D.J.W., Pulford H.D., Ralston M.J.: A caprine pneumonia outbreak associated with caprine herpesvirus and *Pasteurella haemolytica* respiratory infection, *New Zealand Vet J*, 38, 28-31, 1990.
3. Buonavoglia, G., Tempesta, M., Cavalli, A., Voigt, V., Buonavoglia, D., Conserva, A., Corrente, M.: Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Comp Immunol, Microbio and Infect Diseases* 19, 257-281, 1996.
4. Chenier S, Montpetit C, Helie P.: Caprine herpesvirus-1 abortion storm in a goat herd in Quebec, *Can Vet J*, 45, 241-243, 2004.
5. Engels M., Gelderblom H., Darai G., Ludwig H.: Goat Herpesviruses: Biological and physicochemical properties, *J Gen Virol*, 64, 2237-2247, 1983.
6. Engels M, Loepfe E, Wild P, Schraner E, Wyler R.: The genome of caprine herpesvirus 1: genome structure and relatedness to bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol* 68, Pt 7, 2019-23, 1987.
7. Hecht P., Engels M., Loepfe E., Ackermann M.: Comparison of glycoprotein gC genes of bovine and caprine herpesviruses. In: Immunobiology of viral infections. Proceedings of the 3rd Congress of the European Society of Veterinary Virology, Interlaken, Switzerland, 147-152, 1995.
8. Horner G.W., Hunter R., Day A.M.: An outbreak of vulvovaginitis in goats caused by a caprine herpesvirus, *NZ Vet J*, 30, 150-152, 1982.
9. Metzler F., Engels M., Wild P., Bivetti A.: Herpesvirus – infection bei Zicklein in der Schweiz., *Schweiz Arch Tierheilk*, 121, 655-662, 1979.
10. Nixon P, Edwards S, White H.: Serological comparisons of antigenically related herpesviruses in cattle, red deer and goats. *Vet Res Commun.* 12, 4-5, 355-62, 1988.
11. Payment P., Trudel M.: Isolation and identification of viruses. In: Methods and techniques in Virology, New York: Marcel Dekker, 19-41, 1993.
12. Roperto F., Pratelli A., Guarino G., Ambrosio V., Tempesta M., Galati P., Iovane G., Buonavoglia C.: Natural caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) infection in kids, *J Comp Pathol*, 122, 298-302, 2000.
13. Saito, J.K., Gribble, D.H., Berrios, P.E., Knight, H.D., Mc Kercher, D.G.: A new herpes virus isolate from goats: preliminary report, *American Journal of Veterinary Research*, 35, 847-848, 1974.
14. Tarigan S., Webb R.F., Kirkland D.: Caprine herpesvirus from balanopostitis, *Austr Vet J*, 64, 321, 1987.
15. Tarigan S., Ladds P.W., Foster R.A.: Genital pathology of feral male goats. *Austr Vet J*, 67, 286-290, 1990.
16. Tisdall D.J., Bentley C.B., Collins D.M., Horner G.W.: New Zealand caprine herpesvirus: comparison with an Australian isolate and with bovine herpesvirus type 1 by restriction endonuclease analysis, *New Zealand Veterinary Journal*, 32, 99-100, 1984.
17. Uzal F.A., Woods L., Stillian M., Nordhausen R., Read D.H., Van Kampen H., Odani J., Hietala S., Hurley E.J., Vickers M.L., Gard S.M.: Abortion and ulcer-

ative posthitis associated with caprine herpesvirus-1 infection in goats in California, *J Vet Diagn Invest*, 16, 5, 478-484, 2004.

18. Whetstone C.A, Evermann J.F. Characterization of bovine herpesviruses isolated from six sheep and four goats by restriction endonuclease analysis and radioimmunoprecipitation. *Am J Vet Res*, 49, 6, 781-5, 1988.
19. Williams N.M., Vicker M.L., Tramontin R.R., Petrites-Murphy M.B., Allen G.P.: Multiple abortions associated with caprine herpesvirus infection in a goat herd, *J Am Vet Med Assoc*, 211, 89-91, 1997.

Primljeno: 20.11.2009.

Odobreno: 23.11.2009.

KONTAMINACIJA KLANIČNIH POVRŠINA I OPREME SA *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Snežana Ivanović*, Milenko Žutić, Oliver Radanović
Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Vojvode Toze 14, Beograd

Kratak sadržaj

Listerioza je infektivna bolest mnogih vrsta životinja i čoveka (zoonoza). Klinički se manifestuje u različitim oblicima, najčešće u vidu abortusa i meningitisa. Uzročnik bolesti je *Listeria monocytogenes*. To je ubikvitarna bakterija, ustanovljena kod preko 40 vrsta sisara, 20 vrsta ptica, više vrsta riba i insekata. Nakon inficiranja kod životinja se ne moraju javiti klinički simptomi i one se u klanicu otpremaju kao zdrave (inaparentna infekcija). Kada životinje, u ovom slučaju koze, dođu na klanje, sa njih se ne mora uzročnik preneti na meso ali se prenosi na opremu. U našem ispitivanju, nakon klanja klinički zdravih koza u klanici, neposredno posle klanja, uzorkovali smo 20 briseva sa kolica za prihvat iznutrica, pet briseva sa žleba noževa (između sečiva i drške) i dvadeset briseva sa poda. Nakon tri dana od momenta klanja, uzeti su ponovo brisevi sa poda (deset briseva sa različitih mesta) i sa dna kolica (20 briseva) u koja su bili prihvaćeni unutrašnji organi (creva i uterus). Brisevi su zasejani na selektivni, obogaćeni bujon koji je stavljen u frižider na temperaturu od 5-8°C. Treći i sedmi dan su bujoni presejani na krvni agar (5% ovčije krvi), Columbia (Himedia) i MacConkey agar (Biomedics) i inkubirani na temperaturi od 37°C tokom 24-48 h. Suspektne kolonije, sa krvnog i kolumbijskog agara, mikroskopski su kontrolisane i dalje radi dobijanja čiste kulture, rekultivisane na istu vrstu podloga. Za ispitivanje biohemijske aktivnosti korišćeni su komercijalni testovi. Za proveru identifikacije, primenjen je BBL Crystal G/P ID kit. Dobijeni su sledeći rezultati: iz dva brisa uzetih sa poda, jednog brisa sa noža i dva brisa sa kolica, izolovali smo *Listeriu monocytogenes*. Osim iz jednog brisa sa poda, svi sojevi *L. monocytogenes* izolovani su i iz bujona presejanih sedmog dana. *Listeria monocytogenes* je izolovana iz 2 brisa sa poda uzetih tri dana nakon klanja. Ovi sojevi su izolovani i iz bujona presejanih sedmog dana. Naš nalaz ukazuje na mogućnost posrednog prenošenja *Listeria monocytogenes* na meso.

Ključne reči: klanica, oprema, *Listeria monocytogenes*, meso, oboljenje, ljudi

* E-mail: snezaivanovic@gmail.com

CONTAMINATION OF SURFACES AND EQUIPMENT IN THE SLAUGHTERHOUSE WITH *LISTERIA* *MONOCYTOGENES*

Snežana Ivanović, Milenko Žutić, Oliver Radanović
Scientific Veterinary Institute of Serbia, Vojvode Toze 14, Belgrade

Abstract

Listeriosis is an infective disease of many animals and humans (zoonosis). Clinically it is manifested in various forms, mostly as abortion and meningitis. The cause is *Listeria monocytogenes*. It is an ubiquitous bacterium, found in over than 40 mammals, 20 bird species, several fish species and insects. After infection, clinical symptoms are sometimes not diagnosed and the animals arrive in slaughterhouse as healthy animals (unapparent infection). When animals, in this case goats, arrive for slaughter, the cause of the disease can be transmitted on the equipment and possibly on meat. In our examination, immediately after slaughter of clinically healthy goats, 20 swabs were taken from the bottom of trolleys for placing of the organs, 5 swabs from knives (between blade and grip) and 20 swabs from the floor. Three days after slaughter, 10 swabs were taken again from floor (from ten different places) and from the bottom of trollies (20 swabs) where the intestine and uterus were placed. The swabs were incubated in selective, enriched broth refrigerated at 5-8°C. On the third and seventh day they were inoculated on blood agar (5% sheep blood), Columbia (HiMedia) and MacConkey agar (Biomedics) and incubated under the temperature of 37°C for 24-48 hours. The suspect colonies from blood and Columbia agar were controlled microscopically and, because of getting pure culture, re-cultivated on the same media. For examination of biochemical activity, commercial tests were used. For the identification BBL Crystal G/P ID kit was used. *Listeria monocytogenes* was isolated from two floor swabs, one knife swab and from two swabs from trollies. Except the one from floor, each isolate of *Listeria monocytogenes* was isolated from the broth inoculated for seven days. *Listeria monocytogenes* was isolated from two floor swabs three days after slaughter. These isolates were isolated from the broth inoculated for seven days. Our finding shows the possibility of indirect transmission of *Listeria monocytogenes* on meat.

Key words: slaughter house, equipment, *Listeria monocytogenes*, meat, disease, humans

UVOD

Listerioza je infektivna bolest mnogih vrsta životinja i čoveka (zoonoza). Klinički se manifestuje u različitim oblicima, najčešće u vidu abortusa i meningitisa (Quinn i sar., 2000). Uzročnik bolesti je *Listeria monocytogenes*. To je ubikvitarna bakterija, ustanovljena kod preko 40 vrsta sisara, 20 vrsta ptica, više vrsta riba i insekata. Rezervoar infekcije u prirodi su glodari i ptice kod kojih su česte inaparentne infekcije i čije fekalije sadrže veliki broj uzročnika kojima kontaminiraju okolinu. Pored toga što se nalazi u životinjskom i ljudskom fecesu, uzročnik se može naći u otpadnim i površinskim vodama, tlu, biljkama, životinjskoj hrani, na zidovima i podovima objekata gde borave životinje. U zemljište uglavnom dospeva preko stajskog đubriva. Ova činjenica ukazuje da zemljište može predstavljati inicijalni faktor u procesu inficiranja životinja (Infectious Disease Epidemiology Section, Louisiana, 2004). Infekcija najčešće nastaje peroralno i pernazalno, a dokazana je infekcija duž ogranka nervusa trigeminusa. Patogeneza, a time i klinička slika, zavise umnogome od puta kojim su listerije prodrle u organizam i od mesta njihove lokalizacije.

Pri peroralnoj infekciji uzročnik penetrira crevnu sluzokožu posle čega nastaje, ili inaparentna infekcija uz dugotrajno izlučivanje uzročnika fecesom, uzročnik se locira u različite organe ili se razvija septikemija. Septikemijski oblik sa meningitisom ili bez njega najčešće se javlja kod monogastričnih životinja i mladih preživara a posebno kod fetusa i mladunčadi. *Listeria monocytogenes* se često kod subkliničkih mastita izlučuje mlekom. Najčešće oboljevaju goveda, ovce, koze ali i svinje. Kad se listerioza pojavi kao enzootija, bilo na kojoj vrsti domaćih životinja, moguće je sa dosta tačnosti ustanoviti izvor infekcije, što je kod sporadičnih slučajeva vrlo teško.

U nekim slučajevima nakon infekcije kod životinja se ne pojavljuju klinički simptomi i takve se životinje u klanicu otpremaju kao zdrave (inaparentna infekcija). U tim slučajevima uzročnik se može preneti ne samo na meso nego i na opremu, zidove, podove, kecelje radnika, čizme i dr.

Oprema u klanici, ali i mlekaru, je brojna i različita: konvejeri, tankovi, mašine za hlađenje i zamrzavanje, skidanje kože, pribor za rezanje, sečenje, mašina za punjenje i pakovanje. Sva pomenuta oprema je složena, sa uzanim otvorima i dostupnim mestima za nečistoće ali nepristupačnim za pranje, čišćenje i dezinfekciju. Prema tome, nije iznenađujuće ako se *Listeria monocytogenes* nađe na opremi koja je oprana i dezinfikovana i tako naknadno kontaminira meso i proizvode od mesa. Neki serotipovi *Listeria monocytogenes* su uporni i na opremi mogu da opstanu nekoliko meseci ili godina (Rij i sar., 2003). To je verovatno posledica, u brojnim istraživanjima dokazane sposobnosti *Listeria monocytogenes* da formira biofilm (Milanov, 2009; Harvey, 2007).

Sposobnost bakterija da se pričvrste za određene površine i da stvaraju biofilme privukla je značajnu pažnju velikog broja istraživača u brojnim industrijama uključujući i prehrambenu. To se događa zahvaljujući sposobnosti bakterija da se zadržavaju na površinama i da stvaraju mikrokolonije. Pri tome flagele *Listeria monocytogenes* imaju značajnu ulogu (Todhanakasem 2008, Lemon 2007). Gotovo da

se može reći da sposobnost formiranja biofilma diktira novu koncepciju u razumevanju infektivnih oboljenja.

Listeria monocytogenes je mala, pokretljiva, gram-pozitivna bakterija. Ne stvara spore, visoko je otporna i ima štapičasti do kokobacilarni oblik. Optimalna temperatura rasta je od 30-37°C, ali zapravo može da raste na temperaturi od 4-44°C (Holt i sar., 1994). Može da preživi pasterizaciju na 71,6°C u trajanju 15 sekundi. *Listeria monocytogenes* raste u granicama pH između 4,3-9,6.

Ljudi se uglavnom inficiraju kada jedu hranu u kojoj se nalazi *Listeria monocytogenes*. U istraživanjima Ivanović i sar. (2006) dokazano je da se ova bakterija ne samo održava, već i razmnožava na temperaturi od +4 do +8°C i pH 6. Zato hrana koja se nalazi u frižideru može biti rizična za nastajanje infekcije.

Listeria monocytogenes se na ljude najčešće prenosi preko sira, naročito ako je pravljen od nekuvanog mleka, ali i nedovoljno kuvanog i pečenog mesa ali i preko mozga, svinjskog jezika u želudca i kuvanih kobasica.

Ako dospe u organizam čoveka *Listeria monocytogenes* može biti uzročnik invazivne i neinvazivne infekcije. Prema korišćenim literaturnim podacima, invazivna listerioza je retka, godišnje se javi kod 2-9 slučajeva na milion. Ona je jedna od snažnih infekcija prenetih hranom koja u približno 30% slučajeva završava smrću. Listeriozi su predisponirane imunokompromitovane osobe, kao što su oboleli od raka, alkoholičari, dijabetičari, HIV pozitivni, stare osobe, te trudnice i novorođenčad. Kao posledica infekcije sa listerijama, može se javiti oboljenje CNS, septikemija, abortus, infekcija novorođenčadi i dr. Vreme inkubacije kod invazivne listerioze je različito: od jednog dana do nekoliko nedelja.

Listeria monocytogenes može da izazove i kontaktni dermatitis koji je opisan kod veterinara i farmera. Valja napomenuti da ljudi mogu nositi *Listeria monocytogenes* u digestivnom traktu kao normalnu floru. I pored intenzivnih istraživanja o *L. monocytogenes* i listeriozi, još uvek nije poznata minimalna infektivna doza koja dovodi do oboljenja ljudi, nagoveštava se da je to individualna osobina (Autio, 2003). Teškoće u određivanju najmanje infektivne doze za ljude diktirane su u pojedinačnim slučajevima nepoznavanjem imuniteta domaćina i koncentracije patogena u konzumiranoj namirnici. Zbirni podaci sakupljeni nakon nekoliko većih epidemija listerioze upućuju da bi infektivna doza mogla biti vrednosti od 10^7 do 10^{11} CFU po gramu namirnice. Razvoj bolesti moguć je i nakon unosa nižih infektivnih doza. Iz tog razloga su, a zbog učestalosti pojavljivanja epidemija i specifičnih karakteristika ovog patogena, SAD i Novi Zeland odredile takozvanu „nultu toleranciju” za prisustvo *L. monocytogenes* u hrani spremnoj za konzumiranje. Hrana se smatra zaraženom ako se u uzorku od 25 g detektuje *L. monocytogenes*. Evropska unija podržava ovaj normativ procene rizika za meke sireve i pasterizovano mleko (ne sme se naći u 25 g uzorka) kao i za ostale proizvode od mleka (odsustvo u 1 g), a Australija za većinu namirnica spremnih za konzumiranje. Italija, uglavnom, koristi princip „nulte tolerancije” u proceni higijenske ispravnosti hrane kada je *L. monocytogenes* u pitanju (Vesković, 2005). U nastojanju da smanji i eliminiše prisustvo *L.*

monocytogenes u namirnicama, Američka agencija za hranu i lekove (Food and Drug Administration, FDA) je 2006. godine, prvi put odobrila korišćenje listeria specifičnih bakteriofaga kao aditiva mesnim prerađevinama koje se konzumiraju bez dodatne termičke obrade (FDA 2006).

Cilj našeg ispitivanja je bio da se utvrdi da li postoji kontaminacija klaničnih površina i opreme sa *Listeria monocytogenes* nakon klanja koza.

MATERIJAL I METODE

Nakon klanja klinički zdravih koza u klanici, neposredno posle klanja, uzorkovati 20 briseva sa kolica za prihvrat iznutrica, pet briseva sa žleba noževa (između sečiva i drške) i 20 briseva sa poda. Na nekoliko mesta na podu je posle klanja zapaženo prisustvo fecesa zaklanih životinja. Tri dana nakon klanja uzeli smo ponovo briseve sa poda (10 briseva sa različitih mesta) i sa dna kolica (20 briseva) u koja su bili prihvaćeni unutrašnji organi (creva i uterus). Površine sa kojih smo uzimali briseve nakon trećeg dana klanja su prethodno čišćene, prane i dezinfikovane.

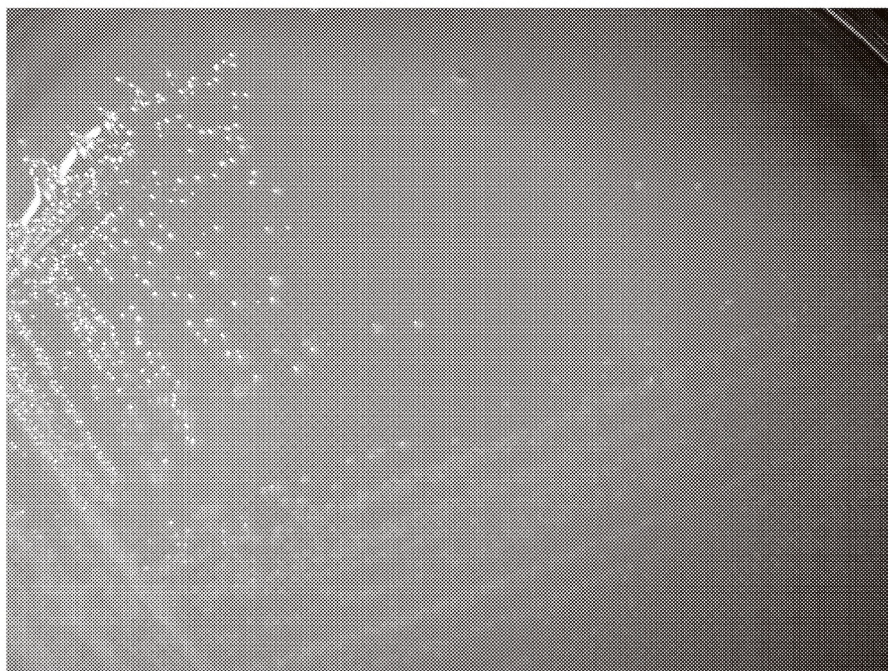
Brisevi su zasejani na selektivni, obogaćeni bujon (*Listeria enrichment broth* Himedia M888) koji je stavljen u frižider na temperaturu od 5-8°C. Treći i sedmi dan su bujoni presejani na krvni agar (5% ovčije krvi), Columbia (Himedia) i MacConkey agar (Biomedics) i inkubirani na temperaturi od 37°C tokom 24-48 h. Suspektne kolonije, sa krvnog i kolumbije agara, mikroskopski su kontrolisane i dalje radi dobijanja čiste kulture, rekultivisane na istu vrstu podloga.

Za ispitivanje biohemijske aktivnosti (oksidaza, VP, urea, Indol, glukoza, salicin, eskulin, manitol, redukcija nitrata, ramnoza i ksiloza) korišćeni su komercijalni testovi (HiMedia). Takođe je urađen test katalaze (ID color Catalase, bioMerieux), pokretljivost kulture na 25°C (api M Medium, bioMerieux) i CAMP test.

Za proveru identifikacije primenjen je BBL Crystal G/P ID kit (Becton Dickinson).

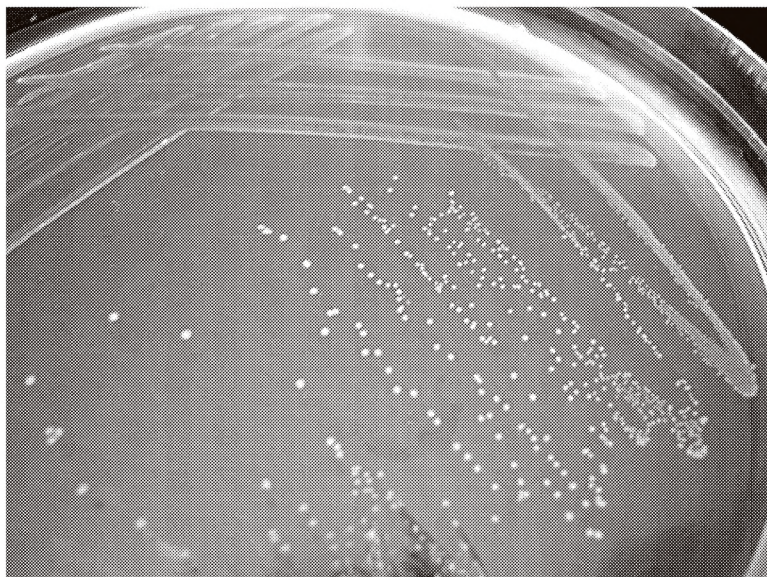
REZULTATI I DISKUSIJA

U našim ispitivanjima iz dva brisa uzetih sa poda, jednog brisa sa noža i dva brisa sa kolica, izolovali smo *Listeria monocytogenes*. Osim iz jednog brisa sa poda, svi sojevi *L. monocytogenes* izolovani su i iz bujona presejanih sedmog dana. *Listeria monocytogenes* je izolovana iz 2 brisa sa poda uzetih tri dana nakon klanja. Ovi sojevi su izolovani i iz bujona presejanih sedmog dana. Izrasle kolonije na krvnom agaru bile su sitne, konveksne, identičnog oblika, okružene uskom zonom β hemolize (slika 1).



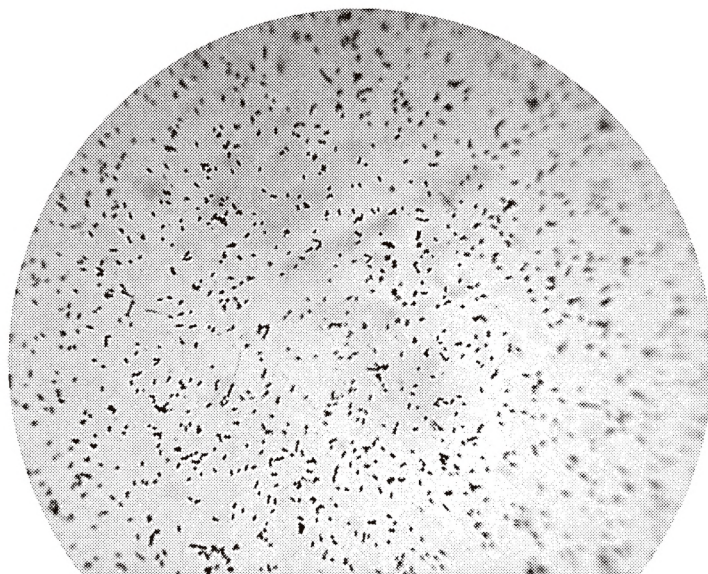
Slika 1. Izgled kolonija na krvnom agaru okružene uskom zonom β hemolize

Na Columbia agaru izrasla je kultura u vidu sitnih, transparentnih, sivkastih kolonija (slika 2).



Slika 2. Izgled kolonija na Columbia agaru

U mikroskopskom preparatu urađenom iz kulture, ustanovljeni su gram-pozitivni većinom pojedinačni štapići, rede kokobacilarni oblici (slika 3).



Slika 3. Mikroskopski preparat

U tabeli 1 su prikazani rezultati ispitivanja. Izrasle kolonije su pokazale hemolizu na krvnom agaru, pozitivnu katalaza a negativnu oksidaza reakciju. Kultura je bila pokretljiva na 25°C. Reakcija na VP, eskulin, glukozu, salicin, ramnozu bila je pozitivna a sa ureom, indolom, manitolom, ksilozom je bila negativna. Kultura nije izazvala redukciju nitrata. Pozitivan CAMP test ustanovljen je sa *Staphylococcus aureus* i negativan sa *Rhodococcus equi*.

Tabela 1. Kulturelno-fiziološke i biohemijske osobine izolovane *Listeria monocytogenes*

Hemoliza	+	Glukoza	+
Pokretljivost na 25°C	+	Salicin	+
Katalaza	+	Manitol	-
Oksidaza	-	Ramnoza	+
VP	+	Ksiloza	-
Urea	-	Nitrati	-
Indol	-	CAMP (sa <i>S. aureus</i>)	+
Eskulin	+	CAMP (sa <i>R. equi</i>)	-

Na osnovu rezultata provedenih analiza kultura je identifikovana kao *Listeria monocytogenes* što je u skladu sa njenim karakteristikama koje su opisali Quinn (2002) i Holt (1994). Identifikacija je potvrđena BBL Crystal GP ID kit.

Već je rečeno da su mnoge životinjske vrste prijemčive za listeriju i da se nakon inficiranja kod životinja ne moraju javiti klinički simptomi, te se one u klanicu otpremaju kao zdrave (inaparentna infekcija). Kada tako inficirana životinja dođe na klanje, uzročnik se može preneti na meso i opremu, zidove, podove, što potvrđuju naši rezultati. Oprema u klanici je brojna i različita, sa mestima pogodnim za održavanje nečistoće što otežava njeno pranje, čišćenje i dezinfekciju. To je i razlog da oprema i pribor mogu kod nepravilnog održavanja, naknadno kontaminirati meso i proizvode od mesa. Naši nalazi *Listeria monocytogenes* u brisevima, trećeg dana od momenta klanja, kada je prethodno izvršeno čišćenje, pranje i dezinfekcija u saglasnosti su sa saopštenjima Rij-a i sar. (2003), koji je saopštio da sojevi *Listeria monocytogenes* na opremi i priboru mogu opstati više meseci, pa i godina.

ZAKLJUČAK

Rezultati naših ispitivanja u saglasnosti su sa literaturnim podacima i ukazuju na mogućnost indirektnog puta prenosa *Listerije monocytogenes* na meso. Višegodišnja epizootiološko-epidemiološka istraživanja listerioze pokazuju da su osnovni vektori prenosa ovog patogena u lanac ljudske ishrane namirnice animalnog porekla. Posebno značajnom smatramo činjenicu da *L. monocytogenes* formira biofilm a poznata je prednost života u biofilmu, u smislu povećane otpornosti bakterija, i to ne samo prema antibioticima već i prema dezinficijensima i deterdžentima (Borucki, 2003). Prisustvo biofilмова u pogonima prehrambene industrije nesumnjivo predstavlja potencijalnu opasnost mikrobiološke kontaminacije proizvoda, opreme i prostora, bilo patogenim, bilo bakterijama koje dovode do kvarenja namirnica (Chmielewski, 2006). Svojom održivošću, prisustvo biofilмова može da dovede i do naknadne mikrobiološke kontaminacije što može dovesti do skraćanja roka trajanja namirnica, ali i širenja i prenosa patogena kao što je to slučaj sa *L. monocytogenes*. Mogućnost formiranja biofilma od strane *L. monocytogenes*, a i drugih bakterija, treba svakako imati na umu prilikom implementacije i održavanja HACCP sistema. Intenziviranjem prehrambene industrije raste i broj faktora rizika po bezbednost hrane. Stoga u svrhu prevencije posebnu pažnju treba posvetiti održavanju higijene opreme, pribora i prostorija u kojima se hrana proizvodi a sve u cilju zaštite zdravlja ljudi. Tome u prilog govori i činjenica da je već dugo radna sredina prepoznata kao potencijalni izvor zdravstvenog rizika. Pravilna procena uticaja radnog procesa na zdravlje, preduslov je za odgovarajuće preventivne aktivnosti i zaštitu zdravlja ljudi određenih zanimanja u konkretnom radnom procesu ali istovremeno i sprečavanje prenosa patogena putem hrane. Sve to ima poseban značaj i dimenziju u celokupnom tehnološkom procesu proizvodnje kvalitetne i zdravstveno bezbedne hrane (Moretro i sar., 2004).

LITERATURA

1. Autio T.: Tracing the sources of *Listeria Monocytogenes* contamination and listeriosis using molecular tools. Academic disertation, Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland, 2003.
2. Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F., Call D.R.: Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*, *Apl Envir Microbiol*, 69, 12, 7336-7342, 2003.
3. Chmielewski R.A.N., Frank J.F.: Biofilm formation and control in food processing facilities, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 1, 22-32, 2006.
4. FDA Approval of *Listeria*-specific Bacteriophage Preparation on Ready-to-Eat (RTE) Meat and Poultry Products. U Washington D. C., S. Food and Drug Administration, 2006. <http://www.cfsan.fda.gov/dms/opabacqa.html>.)
5. Harvey J., Keenan K.P., Gilmour A: Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains *Food Microbiology*, 24, 4, 380-392, 2007.
6. Holt J.G., Noel R., Krieg P., Sneath H. A., Staley J. T., Stanley T. W.: Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams& Wilkins, 1994.
7. Infectious Disease Epidemiology Section: Office of Public Health, Louisiana, Dept of Health&Hospitals, 2004.
8. Ivanović S., Žutić M., Radanović O., Puškarica M.: Slaughterhouse as reservoir of *Listeria monocytogenes* Proceedings of 5th International symposium on biocides in public health and environment, 5th International symposium on antisepsis, disinfection and sterilization, Belgrade conference on vector control in urban environments, Belgrade, 2006, 126-128.
9. Lemon K.P., Higgins D.E, Kolter R.: Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol.*, 189, 12, 4418-24, 2007.
10. Milanov D., Ašanin R., Vidić B., Krnjaić D., Petrović J., Savić S.: Scanning electron microscopy of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces, *Acta Veterinaria*, 59, 4, 423-435, 2009.
11. Moretro T., Langsrud S.: *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments, *Biofilm*, 1-2, 107-121, 2004.
12. Reij M. W., Aantrekker E.D.: Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 1-11, 2003.
13. Todhanakasem T., Young G.M.: Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *J Bacteriol. Sep*, 190, 17, 6030-4, 2008.
14. Vesković S.: Uticaj bakteriocina *Leuconostoc mesenteroides* E 131, *Lactobacillus sakei* I 154 na *Listeria Monocytogenes* u toku proizvodnje sremske kobasice. Magistarska teza. Zemun, Poljoprivredni fakultet, 2005.
15. Quinn P.J.: Veterinary Microbiology and Microbial Disease. London, Blackwell Science Ltd, UK, 2002.

16. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR Clinical Veterinary Microbiology, London, Mosby, 2000.

Istraživanje je vršeno u okviru projekta TP 20005 „Unapređenje proizvodnih svojstava i kvaliteta mesa koza i jaradi u ekološkom sistemu gajenja” koji finansira Ministarstvo za nauku Republike Srbije.

Primljeno: 19.11.2009.

Odobreno: 20.11.2009.

UTICAJ PRIRODNO POVIŠENOG NIVOA URANIJUMA I RADIJUMA U TLU NA ANIMALNU PROIZVODNJU PREŽIVARA NA PODRUČJU LIVNA

Nedžad Gradašćević*, Lejla Saračević, Davorin Samek, Anto Mihalj
Katedra za radiobiologiju i biofiziku Veterinarskog fakulteta Univerziteta u
Sarajevu, Zmaja od Bosne 90, 71 000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Kratak sadržaj

U radu je istraživana uticaj viših nivoa uranijuma i radijuma u tlu na nivoe aktivnosti i radijaciono-higijensku ispravnost animalnih proizvoda preživara sa područja Livna. Područje Livanjskog polja leži na ugljenom sloju u kome su zabeleženi nešto viši nivoi uranijuma i radijuma u odnosu na ostale ugljeve korišćene u Bosni i Hercegovini. Kao rezultat mešanja ugljenog matriksa i tla, na ovom području izmerena je nešto viša prosečna vrednost apsorbovane doze zračenja na 1 metar iznad tla (144 nGy h) u odnosu na druge lokalitete u Bosni i Hercegovini. Najviše prosečne aktivnosti ^{238}U i ^{226}Ra u uzorcima animalnih proizvoda preživara izmerene su u uzorcima ovčijeg sira ($0,070 \text{ Bq kg}^{-1}$ za ^{238}U i $0,207 \text{ Bq kg}^{-1}$ za ^{226}Ra), dok su nivoi ova dva radionuklida u ostalim animalnim proizvodima preživara bili približno jednaki sa rasponima $0,016\text{--}0,046 \text{ Bq kg}^{-1}$ za ^{238}U i $0,028\text{--}0,080 \text{ Bq kg}^{-1}$ za ^{226}Ra . Nivoi ^{40}K kretali su se u rasponu prosečnih vrednosti za animalne proizvode ($31,2\text{--}86,4 \text{ Bq kg}^{-1}$). Procenjena godišnja efektivna doza ingestijom animalnih proizvoda preživara za odraslu populaciju na ovom području iznosila je približno $0,064 \text{ mSv}$ sa najvišim doprinosom dozi od ^{40}K (96,4%). Na osnovu dobijenih rezultata, animalni proizvodi preživara ovoga područja mogu se, sa radijaciono-higijenskog aspekta, smatrati ispravnim za ljudsku upotrebu.

Ključne reči: radijaciono-higijenska ispravnost, godišnja efektivna doza ingestijom, animalni proizvodi preživara

* E-mail: nedžad.gradascevic@vfs.unsa.ba

THE IMPACT OF INCREASED NATURAL BACKGROUND OF SOIL ON THE ANIMAL PRODUCTION OF RUMINANTS IN THE REGION LIVNO

Nedžad Gradašćević, Lejla Saračević, Davorin Samek, Anto Mihalj
Department of Radiobiology and Biophysics, Veterinary Faculty,
University of Sarajevo, *Zmaja od Bosne 90, Sarajevo, Bosna i Hercegovina*

Abstract

In this paper, the impact of increased levels of uranium and radium in soil on the levels of activity and radiation-hygienic validity of animal products of ruminants was investigated.

Region around Livno town is placed on coal layer with the increased levels of uranium and radium compared with other coals used in Bosnia and Herzegovina. As a result of mixing between coal matrix and soil, increased value of average absorbed dose rate at 1 m above the ground (144 nGy h^{-1}) was measured. The highest average value of ^{238}U and ^{226}Ra in the samples of animal products of ruminants was measured in the samples of sheep cheese (0.070 Bq kg^{-1} for ^{238}U and 0.207 Bq kg^{-1} for ^{226}Ra). The levels of these two radionuclides in the rest of animal product of ruminants were approximately similar and ranged $0.016\text{--}0.046 \text{ Bq kg}^{-1}$ for ^{238}U and $0.028\text{--}0.080 \text{ Bq kg}^{-1}$ for ^{226}Ra . Levels of K were in the range of average values for animal products ($31.2\text{--}86.4 \text{ Bq kg}^{-1}$). Calculated annual effective dose by ingestion of the animal products of ruminants were approximately 0.064 mSv with the highest dose contribution of ^{40}K (96.4%). On the base of obtained results, animal products of ruminants produced in observed region, can be considered as valid for human consumption from radiation-hygienic aspect.

Key words: radiation-hygienic validity, annual effective dose by ingestion, animal products of ruminants.

UVOD

Razvoj različitih tehnologija u oblasti industrijske i poljoprivredne proizvodnje rezultirao je narušavanjem prirodne ravnoteže i distribucije većine prirodnih radionuklida u životnoj sredini što za posledicu ima, pored ostalog, i koncentrisanje radionuklida u površnim slojevima tla i njihovo uključivanje u lanac ishrane ljudi i životinja. U novije vreme u naučnim i stručnim krugovima je uvedena terminološka

odrednica *tehnološki povišena prirodna radioaktivnost* (engl. **Technologically Enhanced Naturally Occurring Radioactive Materials**, skr. **TENORM**) koja označava pojavu povišene prirodne radioaktivnosti nastale kao rezultat ljudskih aktivnosti tokom kojih je došlo do premeštanja prirodnih radionuklida iz izvornih staništa i njihovog koncentrisanja u užem području životne sredine čoveka. Različitost tehnoloških procesa koji se koriste u tzv. **NORM** industrijama rezultiraće koncentrisanjem prirodnih radionuklida u različitim medijima što je od velike važnosti za definisanje glavnih puteva širenja polutanata u životnoj sredini.

Konvencionalnim rudarenjem koje podrazumeva podzemne jame i površinske kopove proizvodi se otpad u vidu prekrivke, mineralizovanog otpada i jalovine koja u većini slučajeva sadrži niske do srednje visoke nivoe radionuklida iz serija uranijuma i torijuma koji uglavnom ostaje na lokaciji rudnika.

Pri pregledu literature vezane za istraživanja radioaktivnosti u okruženju rudnika može se zapaziti da većina studija uticaja rudnika uranijuma i torijuma koincidira sa studijama na mestima prirodno povišenog nivoa uranijuma i radijuma. Zajednička karakteristika ovih studija su i merenja nivoa kontaminacije vegetacije kao i procene doza ingestijom poljoprivrednih i animalnih proizvoda. U studiji izvedenoj u Kirgistanu (Vandenhove i sar., 2006) utvrđeni su povišeni nivoi uranijuma i radijuma u uzorcima tla, trave i poljoprivrednih i animalnih proizvoda koji su rezultirali prosečnom godišnjom efektivnom dozom ingestijom od 22 mSv za odraslu populaciju u okruženju uranijumskog rudnika. Američki autori (Lapham i sar., 1989) utvrdili su povišene nivoe ^{226}Ra i ^{210}Po u jetri i bubrezima krava uzgajanih u neposrednom okruženju uranijumskog rudnika. Obzirom na nisko procentualno učešće ovih proizvoda u ukupnoj godišnjoj konzumaciji populacije Novog Meksika, zaključeno je da povišeni nivoi pomenutih radionuklida ne doprinose u značajnoj mjeri povišenju ukupne efektivne doze ingestijom.

U radu bosanskih autora (Saračević i sar., 2009) prikazani su rezultati projekta **”Procena okolišnog rizika pri upotrebi radioaktivno kontaminiranog industrijskog otpada”** izvedenog unutar 6. okvirnog programa Evropske komisije. U radu je istraživao uticaj povišenih aktivnosti uranijuma i radijuma u uglju rudnika „Tušnica” kod Livna na životnu sredinu i populaciju u neposrednom okruženju kao i profesionalno izlaganje rudara. Najviša godišnja efektivna doza utvrđena je za rudare koji rade u kopu mrkog uglja i iznosila je 0,616 mSv dok je procenjena godišnja efektivna doza ingestijom poljoprivrednih i animalnih proizvoda iznosila 0,412 mSv godišnje za odraslu populaciju. Utvrđene doze nisu prekoračivale granične vrednosti navedene u izveštaju UNSCEAR-a (UNSCEAR 2000). U istraživanju nisu utvrđeni značajno povišeni nivoi uranijuma i radijuma u poljoprivrednim i animalnim proizvodima.

MATERIJAL I METODE RADA

Rudnik mrkog uglja „Tušnica-Drage” je rudnik sa površinskim kopom smeštenim u podnožju planine Tušnice u jugozapadnom delu opštine Livno. Pored

nalazišta mrkog uglja u sastav rudnika ulazi i površinski kop lignita „Table” koji je smešten u samome Livanjskom polju. U prethodnoj studiji izvedenoj na ovome području (Saračević i sar., 2009) ugalj iz rudnika mrkog uglja površinskog kopa „Drage” pokazao je povišene nivoe prirodnih radionuklida ^{238}U i ^{226}Ra . Rudnik je smešten u stočarskom području sa nekoliko seoskih domaćinstva u neposrednoj blizini rudnika. U seoskim domaćinstvima ugalj je korišćen za zagrevanje prostorija, a pepeo uglja je uglavnom upotrebljavan za fertilizaciju oranica. Takođe je utvrđeno da se u ovom području sloj uglja nalazi ispod same površine tla. U području Potkraj u kojem ugljeni sloj leži blizu površine tla smešteno je nekoliko seoskih domaćinstava koja se u većoj ili manjoj mjeri bave poljoprivrednom i stočarskom proizvodnjom.

Merenja brzine apsorbovane doze gama zračenja vršena su pomoću dozimetra tipa Berthold Model LB 123 na 1 metar iznad tla sa statističkom greškom merenja od 10%. Koordinate mernih tačaka su utvrđivane pomoću GPS uređaja Magellan explorer 600. Za prikaz rezultata korišćen je geografski informacioni sistem MapInfo Professional.

Uzorkovanje tla i animalnih proizvoda preživara hrane vršeno je, u skladu sa postavkama istraživanja, u bližem i daljem okruženju rudnika „Tušnica-Drage”. Priprema uzorka za gama-spektrometrijska merenja obuhvatala je sušenje, homogenizaciju i prosejavanje uzorka tla i mineralizaciju zbirnih uzoraka animalnih proizvoda preživara na 400°C .

Gamaspektrometrijska merenja vršena su na vertikalnom koaksijalnom HPGe POP-TOP detektoru p-tipa, proizvođača „ORTEC”, model „GEM 30P4” sa relativnom efikasnošću 30% i rezolucijom 1,85 keV-a na 1,33 MeV-a.

Aktivnosti ispitivanih radionuklida (^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra i ^{40}K) utvrđene su iz njihovih gama linija i gama linija njihovih potomaka. Specifična aktivnost ^{238}U izračunavana je iz ^{234}Th na energiji 63 keV-a i $^{234\text{m}}\text{Pa}$ na energiji 1001 keV-a. Aktivnost ^{232}Th izračunavana je iz potomaka ^{228}Ac na energijama 911 keV-a i 967 keV-a i ^{208}Tl na energijama 583 keV-a i 2614 keV-a. Aktivnost ^{226}Ra obračunavana je iz energija ^{214}Pb na 239 keV-a i 295 keV-a i energijama ^{214}Bi na 609 keV-a i 1764 keV-a. Aktivnosti kalijuma dobijene su iz njegove gama linije na energiji 1461 keV-a. Rezultati su izražavani sa nivoom pouzdanosti 95%. Kao dodatna metoda za proveru rezultata pri merenju niskih aktivnosti korišćena je metoda komparativnog merenja sa standardnim uzorkom poznatih niskih aktivnosti. U tu svrhu je korišćen standardni uzorak IAEA-414.

Obračun godišnje efektivne doze ingestijom animalnih proizvoda vršen je prema preporukama Međunarodne agencije za atomsku energiju (IAEA, 1996). Obrazac za efektivnu ekvivalentnu dozu od određenog radionuklida dat je izrazom:

$$E_x = A_x \cdot m \cdot \text{DCF}_x$$

Gde je:

E_x - efektivna doza za ispitivani radionuklid;

A_x - specifična aktivnost ispitivanog radionuklida u animalnom proizvodu;

m - masa (volumen) namirnice konzumirana tokom godine (kg ili L);

DCF_x – doza konverzioni faktori (nSv/Bq).

REZULTATI I DISKUSIJA

Prostorna raspodela brzina apsorbovanih doza zračenja na 1 metar iznad tla na području opštine Livno u okolini rudnika mrkog uglja „Tušnica-Drage” prikazana je kartografski na slici 1.

Slika 1. Brzine apsorbovanih doza zračenja na 1 m iznad tla u okolini rudnika „Tušnica – Drage”

Na lokalitetu Livno–Drage apsorbovana doza zračenja izmerena je na 65 tačaka a izmerene vrednosti su se kretale u rasponu 96–500 nGy h⁻¹. Statistička analiza dobijenih rezultata pokazala je srednju vrednost od 144 nGy sat⁻¹ sa standardnom devijacijom od 51,3 što je ukazalo na neujednačenu distribuciju brzina doza. Najviše vrednosti brzine doze izmerene su na površinskom kopu rudnika (500 nGy h⁻¹), a najniže na tačkama udaljenim od smera pružanja ugljenog sloja (105 nGy h⁻¹).

Za utvrđivanje aktivnosti ispitivanih radionuklida u tlu uzimani su uzorci tla sa pašnjaka iz užeg i šireg okruženja rudnika „Tušnica-Drage”, a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 1.

Tabela 1. Aktivnosti ²³⁸U, ²³²Th, ²²⁶Ra i ⁴⁰K u uzorcima tla (Bq kg⁻¹ suhog tla) sa područja Livna (dubina 0-15 cm)

Lokalitet	²³⁸ U	²³² Th	²²⁶ Ra	⁴⁰ K
Podhum 1	37,31 ± 4,07	63,25 ± 1,46	124,53 ± 2,99	340,32 ± 34,2
Podhum 2	25,35 ± 2,93	45,75 ± 1,88	118,69 ± 2,97	362,18 ± 35,9
Potkraj 1	26,29 ± 2,70	49,67 ± 1,68	108,15 ± 2,70	304,17 ± 30,1
Potkraj 2	50,17 ± 5,62	65,75 ± 1,64	121,08 ± 2,91	430,21 ± 42,8
Potkraj 3	71,05 ± 7,39	49,94 ± 1,65	161,77 ± 3,72	359,59 ± 35,7
Podkraj 4	164,73 ± 13,51	25,95 ± 1,38	223,37 ± 5,02	157,36 ± 16,1
Potkraj 5	92,44 ± 9,15	63,58 ± 1,91	148,47 ± 3,16	436,8 ± 43,1
Potkraj 6	71,99 ± 7,42	70,24 ± 1,97	181,18 ± 4,89	463,8 ± 45,8
Potkraj 7	104,31 ± 11,58	53,61 ± 1,34	162,86 ± 3,93	327,21 ± 32,3
Deponija	65,54 ± 6,69	66,28 ± 1,69	113,36 ± 3,63	422,28 ± 42,0
<i>Srednja</i>	70,92	55,40	146,35	360,40
<i>Minimum</i>	25,35	25,95	108,15	157,36
<i>Maksimum</i>	164,73	70,24	223,37	422,28
<i>SD</i>	42,21	13,33	36,64	88,90

Na lokalitetu Livna zabeležene su više prosečne vrednosti uranijuma i naročito radijuma u uzorcima tla u odnosu na ostale lokalitete u Bosni i Hercegovini. Visoke standardne devijacije rezultata ukazale su na neravnomernu distribuciju ispitivanih radionuklida sa izuzetkom torijuma. Prva tri uzorka potiču sa tačaka uzorkovanja udaljenih od rudnika 2-5 km, dok je uzorkovanje ostalih uzoraka vršeno u smeru pružanja ugljenog sloja.

Najviše prosečne aktivnosti ^{238}U i ^{226}Ra u tlu utvrđene su u području Potkraj. Uzorci tla van ovog područja (Podhum) pokazali su niže nivoe ^{238}U koji su se kretali od 25,4–37,3 Bq kg⁻¹ tla. Povišeni nivoi prirodnih radionuklida u tlu sa lokaliteta Potkraj posledica su izlaska ugljenog sloja na površinu tla tog područja i njegovog mešanja sa zemljom. Poznato je da veći deo Livanjskog polja leži na sloju uglja koji u području Potkraj pokazuje visoke nivoe aktivnosti ^{238}U (623 Bq kg⁻¹) i ^{226}Ra (1191 Bq kg⁻¹) zabeležene od drugih autora (Saračević i sar., 2009). Međutim, u uzorcima tla sa područja Podhum koje se nalazi van potencijalnog uticaja rudnika, nivoi ^{226}Ra bili su takođe relativno visoki sa rasponom vrednosti 118,7-124,5 Bq kg⁻¹. Ovaj nalaz je ukazao da veći dio Livanjskog polja pokazuje povišene nivoe ^{226}Ra u tlu najverovatnije usled mešanja ugljene i krečnjačke formacije koja se nalazi u podlozi ovog područja. Nivoi ^{232}Th i ^{40}K u uzorcima tla bili su u okviru prosečnih svetskih vrednosti (UNSCEAR 2000). Uticaj samog rudnika na tlo u okruženju bio je minimalan u kontekstu činjenice da čitavo područje leži na sloju uglja sa višim nivoima uranijuma i radijuma. Značajniji rizik po životnu sredinu zasnivao se na činjenici da se ovaj ugalj često koristi za zagrevanje lokalnih domaćinstava, te da se pepeo i ugalj koriste za fertilizaciju oranica na kojima se uzgajaju različiti usevi.

Tabela 2. Prosečne vrednosti ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra i ^{40}K (Bq kg^{-1} i Bq L^{-1}) u animalnim proizvodima preživara sa osnovnim statističkim parametrima.

Radionuklid	Mleko kravlje	Sir kravljji	Mleko ovčije	Sir ovčiji	Meso goveđe	Meso ovčije
^{238}U	$0,016 \pm 0,006$	$0,046 \pm 0,019$	$0,018 \pm 0,007$	$0,070 \pm 0,030$	$0,020 \pm 0,008$	$0,017 \pm 0,007$
Min. – maks.	0,012–0,0200	0,020 – 0,070	0,015 – 0,020	0,050 – 0,080	0,016–0,023	0,011–0,024
SD	0,004	0,027	0,010	0,015	0,050	0,006
^{232}Th	$0,002 \pm 0,001$	$0,010 \pm 0,003$	$0,003 \pm 0,001$	$0,011 \pm 0,003$	$0,002 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$
Min. – maks.	0,002 - 0,003	0,007 - 0,015	0,001–0,004	0,009–0,013	0,002–0,002	0,001–0,003
SD	6 E-04	0,004	0,002	0,002	7 E-04	0,0013
^{226}Ra	$0,049 \pm 0,150$	$0,080 \pm 0,024$	$0,032 \pm 0,010$	$0,207 \pm 0,060$	$0,039 \pm 0,012$	$0,028 \pm 0,009$
Min.-maks.	0,040 – 0,060	0,060 – 0,100	0,022–0,045	0,190–0,230	0,027–0,060	0,030 – 0,050
SD	0,008	0,020	0,016	0,020	0,350	0,011
^{40}K	$53,0 \pm 6,4$	$47,5 \pm 5,7$	$46,4 \pm 5,6$	$31,2 \pm 3,8$	$83,9 \pm 9,1$	$86,4 \pm 9,2$
Min. – maks.	46,6 – 67,0	30,3 – 58,9	39,2 – 51,2	27,3 – 34,9	74,1 – 96,9	78,1 – 95,9
SD	9,6	15,2	6,4	3,8	11,8	6,6

U tabeli 2. prikazane su prosečne vrednosti ^{238}U , ^{232}Th , ^{226}Ra i ^{40}K u uzorcima animalnih proizvoda preživara sa rasponima i standardnim devijacijama dobijenih vrednosti. Dobijeni rezultati ukazali su na blago povišene nivoe ^{238}U i ^{226}Ra u uzorcima animalnih proizvoda preživara u odnosu na vrednosti navedene u izveštaju UNSCEAR-a (UNSCEAR 2000). Razlog tome bili su povišeni nivoi ova dva radionuklida u tlu ispitivanog područja. Međutim, dobijene vrednosti ukazale su takođe na nelinearan transfer pomenutih radionuklida iz tla u animalne proizvode preživara u poređenju sa nekim drugim područjima Bosne i Hercegovine. U studiji izvedenoj u okolini termoelektrane Kakanj (Samek-a i sar., 2009) prosečni nivoi ^{238}U i ^{226}Ra u tlu (41 Bq kg^{-1} za ^{238}U i 27 Bq kg^{-1} za ^{226}Ra) rezultirali su nivoima ova dva radionuklida u animalnim proizvodima preživara koji su se kretali u rasponu $0,010\text{--}0,025 \text{ Bq kg}^{-1}$ za ^{238}U i $0,025\text{--}0,053 \text{ Bq kg}^{-1}$ za ^{226}Ra . Obzirom na više nivoe pomenutih radionuklida u tlu sa područja Livna u odnosu na područje Kaknja, nivoi aktivnosti u uzorcima animalnih proizvoda iz Livna nisu bili značajnije povišeni što je ukazalo na slabiju biološku iskoristljivost ispitivanih radionuklida sa područja Livna.

U tabeli 3. date su vrednosti efektivnih godišnjih doza ingestijom animalnih proizvoda preživara sa osnovnim podacima potrebnim za njihov obračun (prosečne aktivnosti radionuklida u ispitivanim uzorcima, prosečna godišnja konzumacija animalnih proizvoda preživara i doza konverzioni faktori (DCF) za prevođenje aktivnosti u efektivnu dozu ingestijom).

Tabela 3. Godišnje efektivne doze od ingestije animalnih proizvoda preživara za odraslu populaciju na području Livna (nSv)

Animalni Proizvod	Aktivnost (Bq kg ⁻¹ ili L ⁻¹)				Konzumacija (kg godišnje)	DCF * (nSv/Bq)				Efektivna godišnja doza (nSv)				Ukupna godišnja efektivna doza (nSv)
	²³⁸ U	²³² Th	²²⁶ Ra	⁴⁰ K		²³⁸ U	²³² Th	²²⁶ Ra	⁴⁰ K	²³⁸ U	²³² Th	²²⁶ Ra	⁴⁰ K	
Kravlje mleko	0,016	0,002	0,049	52,9	70	45	220	280	6,2	50	31	960	22959	24000
Ovčije mleko	0,018	0,003	0,032	46,4	3	45	220	280	6,2	2	27	863		894
Kravlji sir	0,046	0,010	0,080	47,5	10	45	220	280	6,2	21	22	224	2945	3212
Ovčiji sir	0,066	0,010	0,200	31,2	3	45	220	280	6,2	9	7	168	580	764
Govedina	0,02	0,002	0,039	83,9	50	45	220	280	6,2	45	22	546	26009	26622
Ovčetina	0,017	0,002	0,028	86,4	15	45	220	280	6,2	12	7	118	8035	8172
UKUPNO					151					139	91	2042	61392	63664

Na lokalitetu Livna utvrđena godišnje efektivna doza ingestijom animalnih proizvoda preživara iznosila je približno 0,064 mSv (tabela 3). Najveći doprinos dozi dolazio je od ⁴⁰K (96,4%) dok su od radionuklida uranijumovog niza u efektivnoj godišnjoj dozi učestvovali i ²²⁶Ra (3,2%) i ²³⁸U (0,2%). Učešće torijuma u godišnjoj dozi ingestijom animalnih proizvoda preživara iznosilo je 0,14%. U godišnjoj efektivnoj dozi ingestijom pored animalnih proizvoda učestvuju i doze od konzumiranja poljoprivrednih proizvoda i vode. Kako u ovom istraživanju nije vršeno ispitivanje nivoa u poljoprivrednim proizvodima i vodi za piće namenjenoj ljudima ocenu nivoa je moguće izvesti iz podataka datih u poslednjem izveštaju UNSCEAR-a (UNSCEAR 2000). Prema tom izveštaju animalni proizvodi u prosečnom godišnjem obroku odraslih individua učestvuju sa 15% ili 155 kg godišnje. Anketom dobijeni podaci o konzumiranju animalnih proizvoda preživara sa ispitivanih područja pokazali su da se animalni proizvodi preživara na ovim područjima konzumiraju u godišnjoj količini od 151 kg što odgovara godišnjoj konzumaciji navedenoj u izvještaju UNSCEAR-a. Takođe, sastav i odnosi ostalih komponenti obroka navedenih u izveštaju UNSCEAR-a odgovaraju prosečnom obroku na području BiH. U sastav obroka za odrasle osobe ulazi takođe i prosečna godišnja konzumacija vode od 500 litara. Ako se uzme da dobijena vrednost godišnje efektivne doze utvrđene na području Livna od 0,064 mSv iznosi 15% ukupne doze ingestijom, onda se obračunom na ukupni obrok koji uključuje poljoprivredne proizvode i vodu dobije vrednost od 0,426 mSv godišnje. Ovaj rezultat je u veoma dobroj saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Saračević i sar., 2009), koji su u istraživanju na području Livna dobili vrednost od 0,412 mSv godišnje obračunato na ukupni godišnji obrok. Dobijene vrednosti uklapaju se u raspon vrednosti ponuđenih u navedenom izvještaju UNSCEAR-a (0,2–0,8 mSv godišnje) za ukupnu godišnju efektivnu dozu ingestijom mada su nešto više od prosečnih vrednosti od 0,3 mSv navedenih u istom izveštaju. Razlog tome bili su nešto viši nivoi radijuma i uranijuma u uzorcima animalnih proizvoda preživara sa ovoga područja. Uzrok viših nivoa aktivnosti prirodnih radionuklida u uzorcima animalnih proizvoda preživara kao i posledičnoj dozi ingestijom ovih proizvoda bio je prirodno povišeni sastav uranijuma i radijuma na tom području. Uticaj rudnika u tom smislu bio je bez

značaja obzirom da su više vrednosti u animalnim proizvodima dobijene i u uzorcima van uticaja rudnika. Značajniji uticaj bi se mogao pojaviti u slučaju intenzivnijeg spaljivanja uglja u domaćinstvima i industriji usled koncentrisanja aktivnosti u pepelu. Obzirom da dobijena vrednost leži u rasponu ponuđenih vrednosti UNSCEAR-a za godišnju efektivnu dozu ingestijom, uzorci animalnih proizvoda preživara sa ovog lokaliteta se mogu smatrati radijaciono-higijenski ispravnim za ljudsku upotrebu.

ZAKLJUČAK

Prosečna brzina apsorbovane doze zračenja i prosečne aktivnosti ispitivanih radionuklida u uzorcima tla izmerene u okruženju površinskog kopa rudnika mrkog uglja „Tušnica-Drage” ukazale su na povišene nivoe uranijuma i radijuma u podlozi ovoga područja. Povišeni nivoi uranijuma i radijuma u animalnim proizvodima preživara nisu rezultirali značajnijim povišenjem godišnje efektivne doze ingestijom ovih proizvoda za odraslu populaciju. Dobijeni rezultati ukazali su na nisku biološku iskoristljivost ispitivanih radionuklida koja je rezultirala zadovoljavajućim radijaciono-higijenskim statusom animalnih proizvoda ovoga područja. Aktivnosti rudnika mrkog uglja „Tušnica-Drage” nisu pokazale značajan uticaj sa aspekta radijaciono-higijenske ispravnosti animalnih proizvoda preživara u neposrednom okruženju.

ZAHVALNICA

Veći dio ovog rada realizovan je u okviru projekta „Procjena okolišnog rizika pri upotrebi radioaktivno kontaminiranog industrijskog otpada”, skraćenica „INTAILRISK” finansiranog unutar FP6 Programa Evropske komisije (Ugovor br. INCO-CT-2004-509214).

LITERATURA

1. IAEA: International Basic Safety Standards for Protection against Ionising Radiation and for the Safety of Radiation Sources, Safety Series No. 115, IAEA, Vienna, 1996.
2. Lapham, S.C., Millard, J.B., Samet, J.M.: Health implications of radionuclide levels in cattle raised near U mining and milling facilities in Ambrosia Lake, New Mexico. *Health Physics* 56,327–340, 1989.
3. Samek, D., Saračević, L., Gradašćević, N., Mihalj, A.: Technologically enhanced natural radioactivity in vicinity of the Coal Burning Power Plant Kakanj, BiH, Radioprotection, *EDP Sciences*, Vol 44, n° 5, 759-764., 2009.
4. Saračević L., Samek, D., Mihalj, A., Gradašćević N.: The natural radioactivity in vicinity of the brown coal mine Tusnica-Livno, BiH, Radioprotection, *EDP Sciences*, Vol 44, n° 5, 315-320, 2008.

5. UNSCEAR: Sources and Effects of Ionizing Radiation, Report to the General Assembly with Scientific Annexes, UN, New York, 2000.
6. Vandenhove, H., Sweck, L., Mallants, D., Vanmarcke, H., Aitkulov, A., Sadyrov, O., Savosin, M., Tolongutov, B., Mirzachev, M., Clerc, J.J., Quarch, H., Aitaliev, A.: Assessment of radiation exposure in the uranium mining and milling area of Mailuu Suu, Kyrgyzstan, *Journal of Environmental Radioactivity*, 88, 118-139, 2006.

Primljeno: 02.11.2009.

Odobreno: 17.11.2009.

RADIOEKOLOŠKI MONITORING U SRBIJI

Gordana Pantelić*, Vedrana Vuletić, Maja Eremić-Savković,

Ljiljana Javorina, Irena Tanasković

Institut za medicinu rada Srbije "Dr Dragomir Karajović", Deligradska 29, Beograd

Kratak sadržaj

Radioekološki monitoring životne sredine obuhvata merenje specifične aktivnosti radionuklida u uzorcima iz životne sredine koji su relevantni za ekspoziciju stanovništva, prvenstveno u vazduhu, vodi za piće, životnim namirnicama, i u nekim tipičnim predstavnicima flore i faune sa svojstvima bioindikatora radioaktivne kontaminacije (sposobnost koncentrisanja radionuklida). Cilj monitoringa je: a) da se blagovremeno otkrije i identifikuje uzrok bilo kog nekontrolisanog izvora zračenja ili radioaktivnog zagađenja; b) da se izvrši procena stvarnog ili mogućeg izlaganja kritične grupe ili stanovništva radioaktivnim materijama u životnoj sredini zbog korišćenja bilo kog izvora zračenja; c) da se kontinuirano vodi evidencija nivoa radioaktivnosti u životnoj sredini; d) da se u svim slučajevima proverí da li su ispunjeni važeći zakonski propisi i druga ograničenja; i e) da se o svemu informiše javno mnjenje. Prema ukupnim rezultatima merenja različitih uzoraka sa teritorije Republike Srbije u periodu od 1986. do 2008. godine, može se zaključiti da su se nivoi aktivnost prirodnih i veštačkih (dugoživećih) radionuklida (černobiljskog porekla) kretali u niskim, tolerantnim i prihvatljivim nivoima.

Ključne reči: monitoring, ^{137}Cs i ^{90}Sr

* E-mail: gpantelic@nadlanu.com

RADIECOLOGICAL MONITORING IN SERBIA

Gordana Pantelić, Vedrana Vuletić, Maja Eremić-Savković,
Ljiljana Javorina, Irena Tanasković
Institute for Occupational Health Clinical Centre for Serbian "Dr Dragomir
Karajović", Deligradska 29, Beograd

Abstract

Radio-ecological monitoring of the environment encompasses the measures of specific radionuclide activity in the samples from the environment that is relevant for the exposure of inhabitants, first of all in air, drinking water, food and in some typical representatives of flora and fauna with characteristic features of radioactive contamination (the ability of radionuclide to concentrate). The aim of monitoring is: a) timely detection and identification of all uncontrolled radiation sources or radiation contamination; b) assessment of real and possible exposure of the critical group or inhabitants to radioactive matters in the environment due to use of any radiation sources; c) keep the record on the radioactivity level in the environment; d) check if all the legislative regulations and other restrictions are fulfilled; e) inform the public. According to the final results of measuring different samples from the territory of the Republic of Serbia in the period 1986 to 2008, it may be concluded that the level of natural and artificial (long-lived) radionuclides (originating from Chernobyl) was low, in tolerant and acceptable levels.

Key words: monitoring, ^{137}Cs and ^{90}Sr

UVOD

Radi preventivne zaštite zdravlja stanovništva i čovekove sredine od štetnog dejstva jonizujućeg zračenja, više od pola veka se u Institutu za medicinu rada i radio-lošku zaštitu "Dr Dragomir Karajović" sprovodi sistematsko ispitivanje kontaminacije radioaktivnim materijama različitih uzoraka iz životne sredine.

U vazduhu se konstantno nalaze radionuklidi kosmičkog porekla, kao što je ^7Be , prirodni radionuklidi, članovi radioaktivnih nizova i ^{40}K . Čovek svojim aktivnostima može značajno da izmeni prirodne izvore jonizujućeg zračenja (sagorevanjem uglja, upotrebom mineralnih đubriva, ispitivanjem nuklearnog naoružanja, municija sa osiromašenim uranijumom, havarijama na nuklearnim istraživačkim i energetskim reaktorima, primenom radioaktivnih izotopa u privredi, medicini). U slučaju nuklearnog akcidenta može doći do emisije radioaktivnih gasova i aerosola u atmosferu koji nošeni vazдушnim strujama u veoma kratkom vremenskom periodu prelaze velike udaljenosti. Nakon nuklearne nesreće u Černobilu u 1986. godini u svim

segmentima životne sredine povećao se nivo aktivnost dugoživećih radionuklida fisionog porekla, pre svega ^{137}Cs i ^{90}Sr .

Glavni putevi ekspozicije stanovništva potiču od inhalacije, ingestije i od spoljašnjeg ozračenja od radionuklida iz vazduha i deponovanih na zemljištu, tako da monitoring radioaktivnosti u životnoj sredini obuhvata sistem vertikalne analize: **vazduh - padavine - zemljište - vode - biljke - životinje - čovek**. Ispitivanje sadržaja radionuklida vrši se u vazduhu, zemljištu, građevinskom materijalu, rekama, jezerima, čvrstim i tečnim padavinama, vodi za piće i ljudskoj i stočnoj hrani. Program obuhvata različita radiometrijska merenja u uzorcima iz životne sredine:

- a) merenje jačine apsorbovane doze gama zračenja u vazduhu;
- b) gamaspektrometrijska ispitivanja;
- c) određivanje specifične aktivnosti ^{90}Sr ;
- d) merenje koncentracije radona.

Vrsta uzoraka, način i frekvencija uzorkovanja, kao i metode merenja propisane su domaćim propisima („Sl. list SRJ”, 1997) i preporukama Međunarodne agencije za atomsku energiju („IAEA”, 1989).

MONITORING

Radioekološki monitoring životne sredine obuhvata merenje specifične aktivnosti radionuklida u uzorcima iz životne sredine koji su relevantni za ekspoziciju stanovništva.

Monitoring životne sredine omogućava utvrđivanje da li je ispuštanje radioaktivnosti u okolinu u skladu sa propisanim granicama za vreme normalnog rada nuklearnih postrojenja i ostalih postrojenja koja koriste radioaktivni materijal. Takođe omogućava procenu uticaja ispuštene radioaktivnosti na životnu sredinu i na zdravlje stanovništva. Ako se pojave neplanirana ispuštanja ili akcidenti koji dovode do toga da radioaktivnost u životnoj sredini prelazi dozvoljene granice, upozoravaju se nadležne institucije radi pokretanja postupka zaštite životne sredine i stanovništva od štetnog dejstva jonijuzujućeg zračenja.

Zbog načina i brzine širenja fisionog materijala vazduhom, kontrola radioaktivnosti u vazduhu je važan deo monitoringa radioaktivnosti kako u normalnim, tako i u akcidentnim situacijama. Jačina apsorbovane doze gama zračenja u vazduhu je prvi indikator eventualnog radiološkog ili nuklearnog incidenta ili akcidenta. Osnovno zračenje koje se registruje u normalnim uslovima potiče od kosmičkog zračenja i prirodnih radionuklida, a zavisi i od geologije terena i nadmorske visine mernog mesta, te je karakteristično za određenu teritoriju. Jačina apsorbovane doze se kontinuirano prati na teritoriji Republike Srbije sistemom rane najave radijacionog akcidenta. Ovaj sistem čini devet umreženih detektora jačine apsorbovane doze gama zračenja u vazduhu sa kojih se podaci prikupljaju svakih pola sata. Detektori su postavljeni na Paliću, u Novom Sadu, Beogradu, Vinči, Kladovu, na Zlatiboru, u Nišu, Vranju i Kosovskoj Mitrovici. Podaci o jačini apsorbovane doze

gama zračenja u vazduhu na teritoriji Republike Srbije su dostupni javnosti preko internet stranice Ministarstva zaštite životne sredine (www.ekoplan.gov.rs).

Radionuklidi se iz atmosfere uklanjaju suvom depozicijom ili padavinama. Na taj način se količina radionuklida u atmosferi smanjuje, ali dolazi do kontaminacije površinskih slojeva flore, faune i tla, te je neophodna kontrola radioaktivnosti čvrstih i tečnih padavina. Kontaminacijom zemljišta, vodenih površina i biljnih vrsta radionuklidi ulaze u lanac ishrane i postaju potencijalni izvor interne kontaminacije ingestijom (faune i humane populacije).

Radioaktivnost zemljine kore nastaje i od uticaja prirodnih radioaktivnih elemenata koji se nalaze u zemljištu, stenama, vodi, vazduhu i živim organizmima. Najznačajniji prirodni izvor gama zračenja su radionuklidi koji pripadaju radioaktivnim serijama ^{238}U , ^{235}U , ^{232}Th , kao i ^{40}K .

Čovek svojim aktivnošću može u bitnoj meri da izmeni prirodne izvore jonizujućeg zračenja. Do kontaminacije biosfere, samim tim i zemljišta dolazi prilikom ispitivanja nuklearnog oružja, kao posledice havarije u nuklearnim elektranama, primenom radioaktivnih izotopa u privredi, medicini, u toku prerade i obogaćivanja urana.

Zemljište predstavlja osnovni supstrat iz kojeg kreće migracija radionuklida u biljke, odakle ovi preko biljne ishrane dospevaju do čoveka ili životinja. Vrsta zemljišta utiče na raspodelu radionuklida u samom zemljištu i na transfer istih u biljke. Migracija radionuklida u zemljištu zavisi od: a) brojnih ekoloških činilaca; i b) osobina zemljišta - *fizičko-hemijska svojstva* (sadržaj organske materije, pH vrednost, mineraloški sastav), *struktura* (mehanički sastav, poroznost), *vodni režim* (sadržaj vode, nivo podzemnih voda), *agrotehničke mere* (obrađa, đubrenje) i slično.

U poljoprivrednoj proizvodnji koja se najvećim delom odvija na slobodnom prostoru, biljke usvajaju radionuklide iz zemljišta i vazduha, a time se radiokontaminacija prenosi u lanac ishrane. Biljke usvajaju radionuklide, translociraju, uključuju u metabolizam i akumuliraju na isti način kao i neaktivne izotope istih elemenata. Usvajanje radionuklida može da se odvija na dva načina: a) pomoću nadzemnih organa (listova i cveta); i b) korena, pri čemu se javlja konkurencija u inkorporaciji od strane biljaka, kada su u pitanju joni sličnih fizičkih i hemijskih osobina (kalijum-cezijum, kalcijum-stroncijum). Pojedine radionuklide biljke transportuju u nadzemne organe (pšenica - ^{90}Sr ^{137}Cs), a neke zadržavaju u korenu. Kako biljke zauzimaju ključno mesto u lancu ishrane kod životinja i ljudi, neophodna je permanentna kontrola sadržaja radionuklida u njima radi kontrole i zaštite zdravstvenog statusa.

Mleko i mlečni proizvodi su veoma značajni u ljudskoj ishrani. Zbog toga, u slučaju nuklearnih nesreća i radioaktivne kontaminacije životne sredine, mleko predstavlja značajan put unosa radionuklida u ljudski organizam.

Na osnovu rezultata merenja aktivnosti ^{137}Cs i ^{90}Sr u hrani i godišnje potrošnje različitih prehrambenih proizvoda po stanovniku, može se odrediti efektivna doza zračenja od unosa ovih radionuklida ingestijom (Pantelić i sar., 2005).

METODE ISPITIVANJA

Merenje ukupne alfa i beta aktivnosti vrši se na niskofonskom $\alpha\beta$ - proporcionalnom gasnom brojaču PIC-WPC-9550 proizvođača Protean Instrument Corporation. Brojač koristi u procesu rada smešu gasova 10% metana i 90% argona. Nivo osnovnog beta zračenja 0,5 imp/min. Prečnik planšete je 5 cm. Efikasnost brojača za alfa zračenje je 33% a za beta zračenje iznosi 47%, i određena je pomoću standarda ^{241}Am i ^{90}Sr respektivno. Relativna greška pripreme uzorka i merenja je $\pm 10\%$. U procesu merenja se koristi računarski program *Vista 2000* nabavljen od proizvođača uređaja.

Gamaspektromerijska merenja vrše se na tri čista germanijumska detektora firme EG&G „ORTEC”. Detektori su povezani sa višekanalnim analizatorom (8192 kanala) istog proizvođača i sa odgovarajućom računarskom opremom. Energetska kalibracija, kao i kalibracija efikasnosti detektora, obavlja se pomoću radioaktivnih standarda nabavljenih od Amershama ili od Czech Metrological Institute.

Radiohemijska metoda odvajanja ^{90}Sr zasniva se na oksalatnom izdvajanju Ca i Sr, žarenju do oksida i korišćenju aluminijuma kao povlačivača za ^{90}Y . Ravnoteža se uspostavlja za 18 dana, nakon čega se ^{90}Y izdvaja na povlačivaču $\text{Al}(\text{OH})_3$, koji se zatim žari do oksida koji se nakon toga meri na $\alpha\beta$ brojaču.

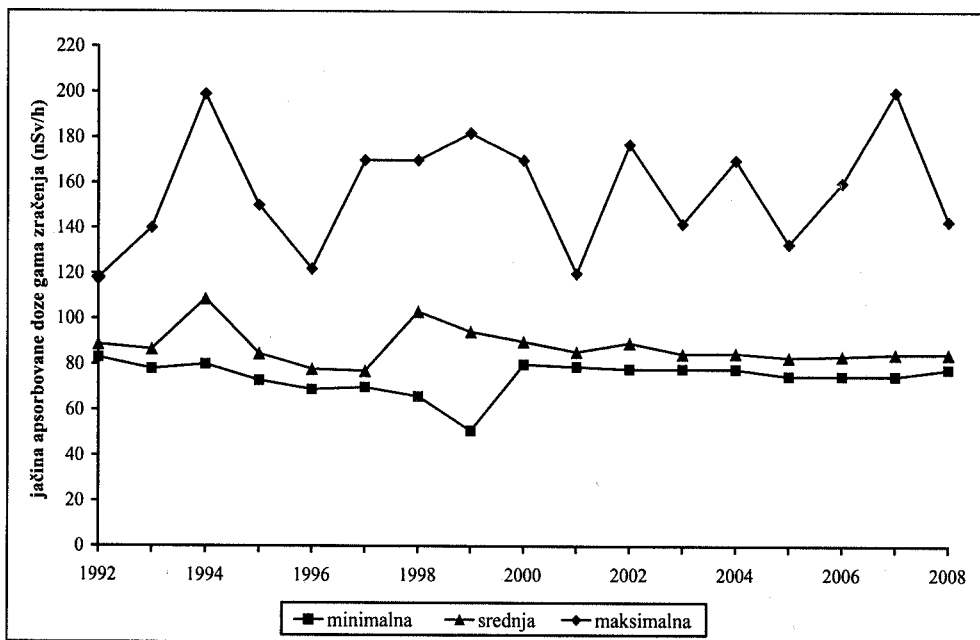
REZULTATI

Rezultati ispitivanja se objavljuju u godišnjim izveštajima Instituta za medicinu rada i radiološku zaštitu “Dr Dragomir Karajović” (ELABORACIJA, 1995, 1996, 1997, ..., 2008). Rezultati merenja uzoraka iz Beograda, Obrenovca i Lazarevca mogu se naći na sajtu Sekretarijata za zaštitu životne sredine grada Beograda (www.eko.bg.gov.yu). U ovom radu je prikazan samo deo rezultata koji se dobijaju kroz monitoring program u Srbiji.

U tabeli 1 su prikazane srednje mesečne vrednosti jačine apsorbovane doze gama zračenja u mestima koja su uključena u sistem rane najave nuklearnog akcidenta u Srbiji. Ovi rezultati su u skladu sa višegodišnjim merenjima u Beogradu (grafik 1).

Tabela 1: Srednje mesečne vrednosti jačine apsorbovane doze gama zračenja u Srbiji za 2008. god.

Mes.	Beograd	Vinča	Kladovo	Novi Sad	Palić	Zlati-bor	Niš	Vranje	K.Mitrovica
Jan.	84,8	133,6	87,9	117,6	104,6	110,1	107,8	132,3	124,5
Feb.	83,4	137,6	92,1	119,2	105,4	112,1	109,5	133,7	125,4
Mar.	84,5	137,7	92,5	120,8	106,4	115,4	110,8	134,6	126,5
Apr.	85,5	138,1	93,3	122,7	106,2	115,2	110,5	133,8	126,6
Maj	84,3	141,6	93,8	123,5	107,6	115,2	111,9	138,4	127,5
Jun	84,7	140,7	93,4	123,2	107,4	115,2	113,2	137,5	128,7
Jul	85	137,2	95,6	124,6	108,3	116,1	113,5	139,0	129,6
Avg.	85,5	138,3	96,5	126,6	110,1	116,2	114,4	140,9	130,2
Sep.	85,2	137,9	97,2	124,8	110,3	119,0	113,6	138,4	129,5
Okt.	84,1	134,3	95,2	121,9	108,9	115,2	113,4	137,0	128,1
Nov.	85	135,7	96,9	123,9	110,8	114,7	114,4	137,5	129,4
Dec.	83,8	132,1	96,7	120,6	107,5	114,0	110,7	133,4	126,2



Grafik 1 : Minimalne, srednje i maksimalne vrednosti jačina apsorbovane doze gama zračenja u Beogradu

Gamaspektrometrijska analiza kompozitnih mesečnih uzoraka vazduha u Beogradu, Nišu i Paliću, kao i padavina u Beogradu, Nišu, Zaječaru, Kragujevcu, Zlatiboru, Paliću i Novom Sadu, pokazuje prisustvo radionuklida prirodnog porekla u niskim nivoima. Aktivnost ^{137}Cs i ^{90}Sr u ovim uzorcima je takođe niska poslednjih 10 godina (ELABORACIJA, 1995, 1996, 1997, ..., 2008).

Aktivnost prirodnih radionuklida u zemljištu ne razlikuje se mnogo za različite ispitivane regione u Srbiji. Odnos aktivnosti ^{238}U i ^{235}U u merenim uzorcima odgovara njihovom odnosu u prirodnom uranu. Prisustvo osiromašenog urana u zemljištu na teritoriji Republike Srbije iznad 43 paralele (regioni Beograda, Niša, Užica, Zaječara, Golupca, Novog Sada i Subotice) nije utvrđeno u dosadašnjim merenjima. Rezultati merenja na 4 lokaliteta na jugu Srbije (Pljačkovica, Borovac, Bratoselce i Reljan) ukazuju na visoke kontaminacije zemljišta u mikrolokacijama, na mestima gde su pronađena zrna od osiromašenog uranijuma (Pantelić i sar., 2006). Aktivnost ^{238}U u uzorcima zemljišta bila je veoma visoka, tako da je bilo neophodno da se pristupi uklanjanju preostalih projektila i dekontaminacija ovih terena, što je i učinjeno u periodu 2003-2006. godina. Merenja izvršena nakon dekontaminacije pokazala su da je ona uspešno izvršena (ELABORACIJA, 1995, 1996, 1997, ..., 2008).

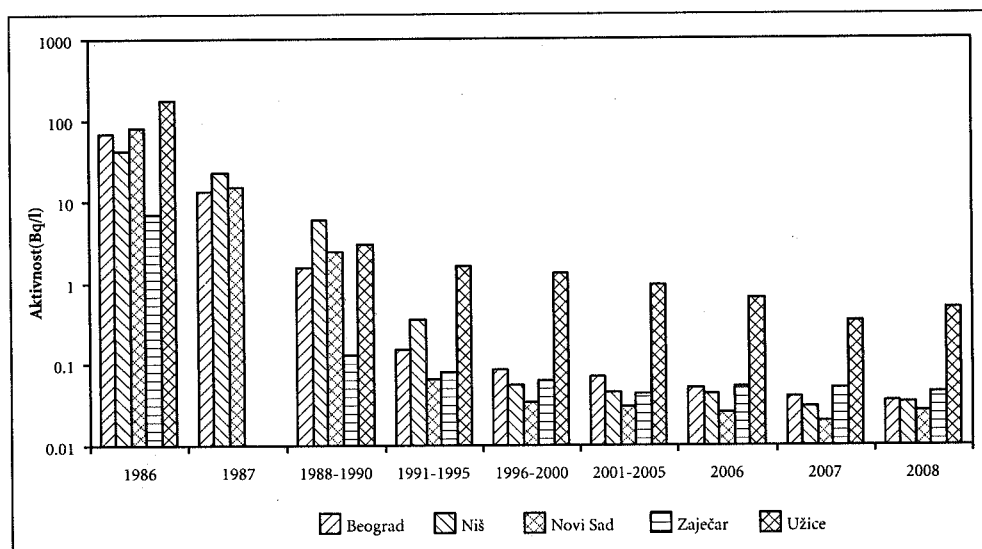
Zbog dugog vremena poluraspada ^{137}Cs i ^{90}Sr njihova aktivnost u zemljištu je još uvek značajna (Pantelić i sar., 2006). U tabeli 2 dati su rezultati merenja neobrađivog zemljišta sa dubine 0-5 cm u poslednje 2 godine.

Kod kultivisanih biljaka (povrće, voće, žitarice) zbog niskih koeficijenata prelaska ovih radionuklida iz zemljišta u biljke (ELABORACIJA, 1995, 1996, 1997, ..., 2008), aktivnost u biljnim kulturama je veoma niska u poslednjih 10 godina. Rezultati gamaspektrometrijske analize u prehrambenim proizvodima iz poljoprivrednih kombinata i individualne proizvodnje pokazuju značajno niske nivoe aktivnosti ^{137}Cs u uzorcima povrća, voća, mesa, žitarica i drugim prehrambenim proizvodima, tako da je poslednjih godina u većini namirnica ova aktivnost ispod 1 Bq/kg.

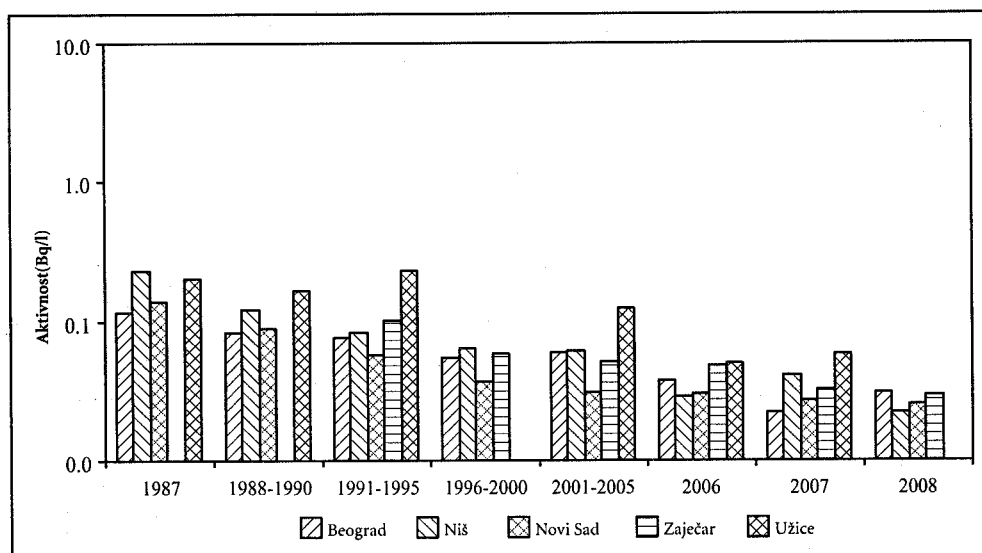
Tabela 2: Aktivnost radionuklida u zemljištu na teritoriji Srbije u 2007. i 2008. Godini (uzorci neobradivog zemljišta sa dubine 0-5 cm)

Lokacija		^{40}K (Bq/kg)	^{137}Cs (Bq/kg)	^{232}Th (Bq/kg)	^{226}Ra (Bq/kg)	^{238}U (Bq/kg)	^{235}U (Bq/kg)
Beograd	Min.vr.	527	2	31,8	39,2	23,7	1,8
	Sr.vr.	682 ± 62	23 ± 21	44,4 ± 5,3	47,5 ± 7,5	44,4 ± 7,4	2,2 ± 0,3
	Maks.vr.	938	63,7	58,9	61,3	65,4	2,8
Lazarevac	Min.vr.	674	0,8	53,8	51,5	49,7	2,4
	Sr.vr.	718 ± 45	17,7 ± 18,4	58,0 ± 3,3	56,4 ± 3,2	65 ± 11	3,0 ± 0,5
	Maks.vr.	770	34,9	62,6	60,4	80	3,5
Obrenovac	Min.vr.	622	0,8	54,7	53,9	42	2,5
	Sr.vr.	703 ± 82	31 ± 19	59,0 ± 3,1	64,2 ± 6,1	54,8 ± 9,1	2,9 ± 0,3
	Maks.vr.	804	48,7	62,2	69	69	3,2
Vojvodina	Min.vr.	312	1,5	28	26,2	29	1,2
	Sr.vr.	470 ± 90	5,8 ± 2,5	40,9 ± 6,3	41,0 ± 7,7	46 ± 16	1,9 ± 0,4
	Maks.vr.	612	7,9	48,8	48,8	73	2,6
Centralana Srbija	Min.vr.	179	11,9	17,6	20,2	37,9	1
	Sr.vr.	457 ± 192	62 ± 77	29,7 ± 9,4	27,0 ± 6,6	42,6 ± 4,9	1,3 ± 0,3
	Maks.vr.	606	176,4	40	34,3	48	1,7
Zapadna Srbija	Min.vr.	161	67	7,4	11	23	0,5
	Sr.vr.	255 ± 141	114 ± 49	30 ± 27	29 ± 23	36 ± 16	1,3 ± 1,0
	Maks.vr.	417	164,4	59,7	54,8	53	2,5
Istočna Srbija	Min.vr.	285	14,4	14,9	21,3	24	1
	Sr.vr.	415 ± 73	56 ± 44	26 ± 14	31 ± 16	27,9 ± 2,7	1,4 ± 0,6
	Maks.vr.	545	117	45,5	54,4	30	2,3
Južna Srbija	Min.vr.	480	1,4	30,6	31,6	24	1,5
	Sr.vr.	542 ± 87	12,0 ± 2,7	40,5 ± 9,7	40,0 ± 4,4	37 ± 14	1,8 ± 0,1
	Maks.vr.	603	29,3	46,7	50,8	43,9	2,3
Banje u Srbiji	Min.vr.	370	12,6	27,7	28,3	9,4	1,3
	Sr.vr.	518 ± 131	24 ± 15	39 ± 10	35,3 ± 7,2	40 ± 19	1,8 ± 0,4
	Maks.vr.	735	51,5	49,6	47,6	58	2,2

Aktivnost radionuklida veštačkog porekla (^{137}Cs i ^{90}Sr) u uzorcima mleka povećala se nakon Černobiljskog akcidenta. Međutim, njihova aktivnost je svake godine u stagnaciji, tako da je već nekoliko godina nakon akcidenta aktivnost ^{137}Cs bila ispod 10 Bq/l (grafik 2), a aktivnost ^{90}Sr ispod 0,1 Bq/l (grafik 3).



Grafik 2: Srednje godišnje vrednosti aktivnosti ^{137}Cs u mleku



Grafik 3: Srednje godišnje vrednosti aktivnosti ^{90}Sr u mleku

Na osnovu rezultata merenja specifične aktivnosti ^{137}Cs i ^{90}Sr u uzorcima hrane izračunat je ukupan godišnji unos ovih radionuklida putem ishrane, kao i efektivna doza zračenja za stanovništvo od tih radionuklida unetih ingestijom (tabela 3). Efektivna doza zračenja za stanovništvo od ^{137}Cs ili ^{90}Sr unetog ingestijom je značajno ispod preporučene godišnje granice primljene doze za pojedinca iz stanovništva.

Tabela 3: Unos ^{137}Cs i ^{90}Sr putem ishrane i efektivna doza zračenja za stanovništvo od tih radionuklida unetih ingestijom

Godina	Unos ^{137}Cs Bq/godina	Efektivna doza od unosa ^{137}Cs ingestijom mSv	Unos ^{90}Sr Bq/godina	Efektivna doza od unosa ^{90}Sr ingestijom mSv
1986	47310	0,662	718,5	0,02012
1987	11782	0,164	175,1	0,00490
1988	826,6	0,011	86,2	0,00241
1989	940,5	0,013	93,4	0,00261
1990	357,7	0,005	102,8	0,00288
1991	123,0	0,0017	85,5	0,00239
1992	112,0	0,0015	99,3	0,00279
1993	74,19	0,001	54,4	0,00152
1994	38,65	0,0005	39,2	0,00110
1995	41,26	0,0006	89,9	0,00252
1996	44,20	0,0006	37,6	0,00105
1997	21,01	0,0003	-	-
straight 1998	44,60	0,00058	29,6	0,00083
1999	27,53	0,00036	31,8	0,00089
2000	44,79	0,00058	53,1	0,00149
2001	42,77	0,00056	34,7	0,00097
2002	32,97	0,00043	40	0,00109
2003	34,85	0,00045	69	0,00137
2004	33,98	0,00044	53	0,00148
2005	33,55	0,00044	25,4	0,00071
2006	34,25	0,00045	26,1	0,00073
2007	33,76	0,00044	52,1	0,00146
2008	23,88	0,00031	16,5	0,00046

ZAKLJUČAK

Prema ukupnim rezultatima merenja radioaktivnosti životne sredine, metodologijom vertikalne analize uzoraka na teritoriji Republike Srbije u zadnjoj deceniji prošlog veka i prvoj deceniji novog milenijuma, može se zaključiti: a) da se aktivnost prirodnih radionuklida i dugoživećih radionuklida veštačkog porekla (uglavnom od černobiljskih padavina), u različitim vrstama uzoraka, kretala u niskim nivoima; b) Izračunata efektivna doza zračenja koja potiče od veštačkih radionuklida unetih ingestijom, značajno je ispod preporučene godišnje granice primljene doze za pojedinca iz stanovništva, a koja iznosi 1 mSv/god i odnosi se na zbir odgovarajućih doza od spoljašnjeg izlaganja i očekivane efektivne doze unutrašnjeg izlaganja od izvora zračenja veštačkog porekla, za period od godinu dana.

LITERATURA:

1. Odluka o sistematskom ispitivanju sadržaja radionuklida u životnoj sredini, *Sl. list SRJ*, 45, 1997.
2. IAEA: Measurement of radionuclides in food and the environment, A Guide-book, Technical Report Series No. 295, Vienna, 1989
3. Pantelić G., Javorina Lj., Tanasković I., Vuletić V., Eremić-Savković M.: Monitoring radioaktivnosti životne sredine i procena efektivne doze zračenja za stanovništvo Srbije koja potiče od unosa ^{137}Cs i ^{90}Sr ingestijom. U: Zbornik radova, XXIII simpozijum društva za zaštitu od zračenja Srbije i Crne Gore, Donji Milanovac, 89-96, 2005.
4. Pantelić G., Eremić-Savković M., Vuletić V.: Ispitivanje zemljišta u okviru programa monitoringa radioaktivnosti životne sredine u Srbiji. U: Mirjana Stojanović, urednik, Kontaminacija zemljišta Srbije radionukleidima i mogućnost njihove remedijacije, Beograd: ITNMS, 141-164, 2006.
5. Radioaktivnost životne sredine u Srbiji, Beograd: Institut za medicinu rada i radiološku zaštitu „Dr Dragomir Karajović”, 1995-2008.

Primljeno: 15.11.2009.

Odobreno: 23.11.2009.

UTVRĐIVANJE DIROFILARIOZE PASA PRIMENOM ELISA METODA I MODIFIKOVANOG KNOTT-OVOG TESTA

Sara Savić^{1*}, Živoslav Grgić¹, Biljana Vujkov², Ivan Fenjac³,
Dušan Pajković⁴ Marina Žekić¹,

¹ Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Rumenački put 20, Novi Sad

² Veterinarska ambulanta „Bilja i Olja”, Drage Spasić 2a, Novi Sad

³ Veterinarska ambulanta „Pedigre”, Krilova 3, Novi Sad

⁴ Vojska Srbije, Novi Sad

Kratak sadržaj

Dirofilarioza pasa je parazitsko oboljenje, čiji je uzročnik je *Dirofilaria immitis* ili *Dirofilaria repens*. Može se javiti kao kožni ili kao srčani oblik bolesti. Srčana forma oboljenja često se naziva i bolest „srčanog crva”, jer odrasli oblici jedne od dirofilarija parazitira u srcu. Tokom poslednjih pet godina više slučajeva dirofilarioze prijavljeno je na nekoliko regiona Srbije (Dimitrijević, 1999; Savić-Jevđenić i sar., 2004). Na početku su dirofilarije bile otkrivane samo kao usputni nalaz tokom obdukcije, a u poslednje dve godine sve više je zahteva za dokazivanje dirofilarioze kod živih pasa. Kliničku sliku kod pasa obolelih od dirofilarioze čine povremeni kašalj, apatija, poremećaj disanja, poremećaj srčanog rada, mršavljenje i brzo zamaranje psa. Pojava simptoma zavisi od jačine infekcije, a izraženost kliničke slike zavisi od aktivnosti psa. Dijagnostika dirofilarioze se može vršiti pregledom iz krvi pomoću modifikovanog Knott-ovog testa ili nekom od seroloških metoda. Materijal za rad je predstavljala krv 45 pasa koji potiču iz regiona gde je tokom prethodnih godina utvrđeno prisustvo dirofilarija kod pasa, uglavnom prilikom obdukcije, kao i od pasa koji su imali kliničke simptome i bili upućeni na analizu od strane veterinara ili samih vlasnika. Metode korišćene za analiziranje krvi pasa su modifikovani Knott-ov test za dokazivanje mikrofilarije u punoj krvi i ELISA test. Od 35 ispitivanih pasa bez kliničkih simptoma, kod 4 psa je utvrđeno prisustvo antigena *Dirofilaria immitis* u krvnom serumu, što čini 11% ispitivanih pasa. Ispitivanjem 10 pasa sa kliničkim simptomima kašljanja, otežanog disanja, apatije i brzog zamaranja, kod 8 pasa je utvrđeno prisustvo mikrofilarija u cirkulaciji (ELISA test) i dokazano prisustvo antigena *D. immitis*. Kod dva psa, terapija je bila uspešna.

Ključne reči: dirofilarioza pasa, dijagnostika, terapija

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

DETERMINATION OF CANINE DIROFILARIASIS BY ELISA METHOD AND MODIFIED KNOTT'S TEST

Sara Savić^{1**}, Živoslav Grgić¹, Biljana Vujkov², Ivan Fenjac³,
Dušan Pajković⁴ Marina Žekić¹

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

² Veterinary ambulance "Bilja i Olja", Drage Spasić 2a, Novi Sad

³ Veterinarska ambulance "Pedigre", Krilova 3, Novi Sad

⁴ The Army of Serbia, Novi Sad

Abstract

Canine dirofilariasis is a parasitic disease. The causative agent is *Dirofilaria immitis* or *Dirofilaria repens*. It may appear as skin or as a heart disease. The heart form of the disease is often named "heartworm" disease, because the adult parasites live in the heart. In the last five years, several cases of dirofilariasis have been reported (Dimitrijević, 1999; Savić-Jevđenić et al., 2004). At the beginning dirofilariasis was discovered only as a by-the-way finding during autopsy, but last two years there were more requests for examination of dirofilariasis in alive dogs. Clinical symptoms in dogs with dirofilariasis are occasional coughing, apathy, breathing difficulties, heart failure, progressive loss of weight and rapid fatigue. The variety of symptoms depends on the intensity of infection, and the symptoms depend on the activity of a dog. For the diagnostics of dirofilariasis, the modified Knott's test or another serology methods may be used. In our research we used 45 blood samples, taken from the dogs in the region where dirofilariasis was detected mostly through autopsy, but also from the dogs with clinical symptoms in which cases the owners or veterinarians had sent the samples for analysis. The modified Knott's test was used for proving microfilaria in full blood and ELISA test was applied for detection of *D. immitis* antigen. Out of 35 examined dogs with no clinical symptoms, in 4 dogs the presence of antigene *Dirofilaria immitis* was detected in blood sera, which is 11% of the examined dogs. The examination of 10 dogs with clinical symptoms (coughing, difficult breathing, apathy and rapid fatigue) showed the presence of microfilaria in circulation (ELISA test) and the presence of antigen *D. immitis* in 8 dogs. Therapy was successful in two cases.

Key words: canine dirofilariasis, diagnostics, therapy

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

UVOD

Dirofilarioza pasa je parazitsko oboljenje, a uzročnik je *Dirofilaria immitis* ili *Dirofilaria repens*. Može se javiti kao kožni ili kao srčani oblik bolesti. Srčana forma oboljenja se često naziva i bolest „srčanog crva”, jer odrasli oblici jedne od dirofilarija parazitira u srcu. Za postojanje i širenje ovog oboljenja je neophodno prisustvo komaraca, jer bez njih ne može da se odvije kompletan životni ciklus dirofilarija. Simptomi dirofilarioze su nespecifični – kašalj, gubitak apetita, gubitak glasa, mršavljenje, umor, krvarenje iz nosa, otežan rad srca, hematurija i sl. kod srčane forme oboljenja, dok su kod kožne forme promene na koži u vidu ranica, čvorića, gubitka dlake na oštećenim mestima i pojava svraba.

Kao posledica klimatskih promena tokom poslednjih decenija, kao i sve slobodnijeg transporta pasa i mačaka po Evropi, nastala je pojava dirofilarioze, zajedno sa drugim vektor prenosivim bolestima, na sve većem geografskom području. Stalnim porastom srednje godišnje temperature, predviđa se da su letnje temperature dovoljne da se obezbedi inkubacija dirofilarija u komarcima, čak i na većim nadmorskim visinama, odnosno da će se dirofilarioza pojavljivati i u područjima gde je ranije nije bilo (Genchi i sar., 2009).

Tokom poslednjih pet godina više slučajeva dirofilarioze je prijavljeno na teritoriji Srbije. Na početku su dirofilarije bile otkrivane samo kao usputni nalaz tokom obdukcije, a u poslednje dve godine sve više je zahteva za dokazivanje dirofilarioze kod živih pasa. Prva informacija o postojanju dirofilarioze na prostorima Srbije je objavljena 1999. godine (Dimitrijević, 1999). Od tada, svake godine je sve više prijavljenih slučajeva pasa sa dirofilariozom. Takođe, na području Vojvodine prijavljeni su prvi slučajevi dirofilarioze 2003. godine (Tasić i sar., 2003). Nakon toga, rađeno je više ispitivanja u različitim delovima Vojvodine, mnogo češće kod živih pasa, tako da su veterinari i vlasnici pasa postali svesni prisustva ove bolesti na našem području.

Kliničku sliku nije moguće primetiti kod svih inficiranih pasa. Ima slučajeva kada su psi potpuno bez simptoma. Uglavnom, kliničku sliku kod pasa obolelih od dirofilarioze čine povremeni kašalj, apatija, tahipneja, dispneja, mršavljenje i brzo zamaranje psa. Klinička slika zavisi od jačine infekcije, a izraženost kliničke slike zavisi od aktivnosti psa. Klinički simptomi se lakše primeće i izražajni su kod radnih pasa i lovnih pasa tokom vršenja aktivnosti, nego kod kućnih pasa, pogotovo onih koji su inače slabo aktivni.

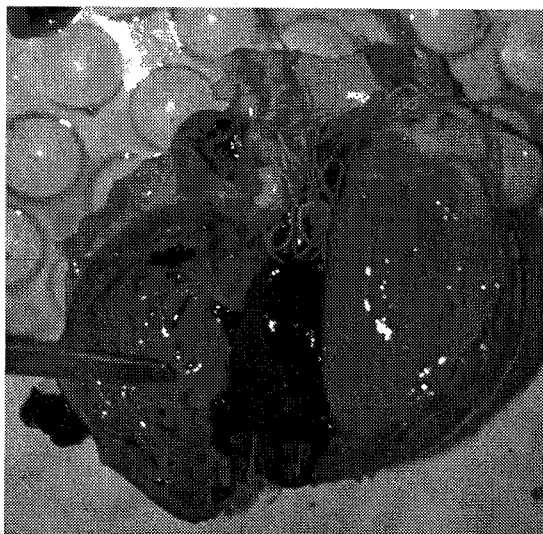
Dijagnostika dirofilarioze se može vršiti dokazivanjem uzročnika u krvi primenom modifikovanog Knott-ovog testa ili dokazivanjem antigena. Pregledom krvi Knott-ovim testom se otkrivaju mikrofilarije u cirkulaciji, dok se ELISA testom otkrivaju specifična antitela protiv dirofilarija u krvnom serumu i kada razvojnih oblika više nema u cirkulaciji.

Terapija dirofilarioze nije jednostavna, jer primena lekova nosi određeni rizik za psa, zbog načina aplikacije i eventualnih propratnih dejstava leka, koja mogu dovesti do komplikacija koje ugrožavaju život psa. Preparati za terapiju dirofilarioze su skupi i nisu svi dostupni na domaćem tržištu lekova. Kod pasa koji imaju kliničke simpto-

me vezane za respiratorni trakt (pneumonitis) treba najpre davati antiinflamatorne doze kortikosteroida, pre terapije protiv odraslih oblika parazita. Pacijentima se određuje strogo mirovanje, najbolje u kavezu, u vremenu od 4 do 6 nedelja, nakon terapije protiv odraslih oblika parazita (adulticidna terapija). Kod blagih infekcija, prognoza može biti dobra, dok kod težih slučajeva oboljenja sa teškom pulmonarnom tromboembolijom ili kongestivnom manom srca, prognoze su nepovoljne i nepredvidive. Prevencija dirofilarioze je moguća upotrebom preparata kao što je melarsomin (Melarsomine), koji se aplikuje u dve doze. Ovaj preparat je adulticid i prema literaturnim podacima efikasnost je i do 96% (Hoch i Strickland, 2008).

MATERIJAL I METODE

Materijal: Kao materijal koristili smo uzorke krvi 45 pasa koji potiču iz regiona gde je prethodnih godina utvrđeno prisustvo dirofilarija kod pasa, nakon obdukcije, kao i od pasa koji su imali kliničke simptome dirofilarioze i bili upućeni na analizu od strane veterinara ili samih vlasnika.



Slika 1 – Prisustvo odraslih oblika dirofilarija u srcu psa.

Tokom perioda 2006. i 2007. godine, analizirano je 45 pasa sa teritorije Novog Sada i okoline. Od toga 35 pasa su bili bez kliničkih simptoma i poticali su sa područja u kojima je ranije utvrđeno prisustvo dirofilarioze pasa. Ostalih 10 pasa su imali kliničke simptome u vidu otežanog disanja, kašljanja i lakog zamaranja pri radu i svi su aktivno učestvovali u lovu.

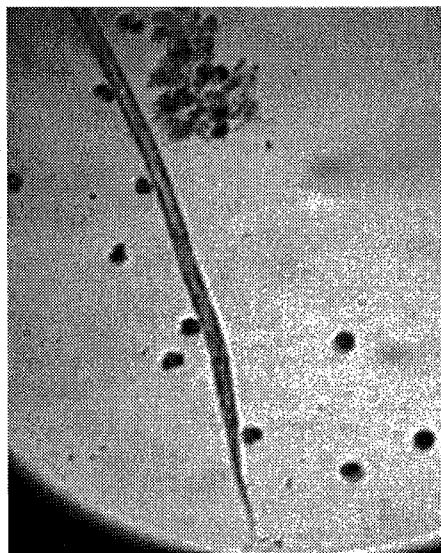
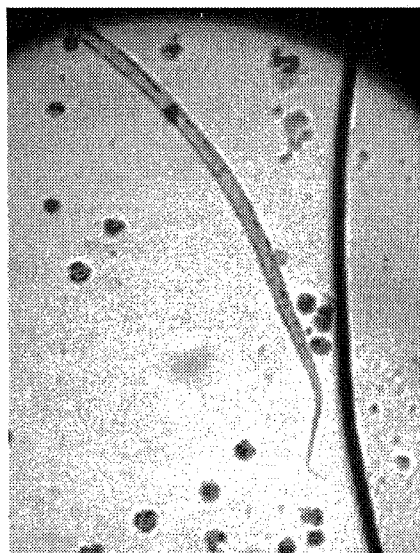
Metod: Analiza krvi pasa je rađena pomoću dva metoda i to su modifikovani Knott-ov test za dokazivanje mikrofilarije u punoj krvi i ELISA test (Canine Heartworm Antigen test kit, IDEXX Laboratories) za detekciju antigena *Dirofilaria immitis* u serumu ili plazmi pasa.

REZULTATI I DISKUSIJA

Ispitivanjem 35 pasa bez kliničkih simptoma prisustvo antigena *Dirofilaria immitis* u krvnom serumu utvrđeno je kod 4 životinje, odnosno 11% pasa. Kod 10 pasa sa kliničkim simptomima kašlja, otežanog disanja, apatije i brzog zamaranja, kod 8 je utvrđeno prisustvo mikrofilarija u cirkulaciji, odnosno nalaz Knott-ovim testom je bio pozitivan. Primenom ELISA testa, takođe je kod istih 8 pasa sa kliničkim simptomima utvrđen antigen *D. immitis*. Kod dva psa sa kliničkim simptomima primenom oba metoda dobijen je negativan nalaz.

Kod 2 pasa, od ukupno 8, kod kojih je utvrđeno prisustvo *D. immitis* je sprovedena terapija. Prvo je primenjena makrofilaricidna (adulticidna), a zatim mikrofilaricidna terapija. Lečenje je vršeno tokom dve etape – uništavanje odraslih odlika i uništavanje mikrofilarija. Kao adulticid korišćen je melarsomin dihidrohlorid 2,2 mg/kg, koji je davan dva puta u razmaku od mesec dana. Aplikacija preparata je vršena duboko u leđnu muskulaturu pod pravim uglom i takva način nosi određeni rizik za pojavu otoka, bola, apscesa, crvenilo, šok. U slučaju ovakvih propratnih pojava treba dati daksametazon odmah nakon davanja terapije. Pas mora apsolutno da miruje 4-6 nedelja nakon terapije, zbog mogućnosti da se odrasli oblici dirofilarija otpuste sa srčanog zida i izazovu pojavu embolije, pa se preporučuje boravak psa u kavezu. Terapija protiv mikrofilarija sastojala se od mesečne doze milbemicin oksima u dozi 0,5 mg/kg.

Kontrolni pregled krvi pasa na prisustvo mikrofilarija, vršen je pet meseci nakon primene terapije i tada nije utvrđeno prisustvo larvi u cirkulaciji Knott-ovim testom. Međutim, primenom ELISA testa u uzorcima krvnog seruma pasa 5 meseci nakon



Slika 1 – Mikroskopski izgled *Dirofilaria immitis*,
modifikovanom metodom po Knott-u.

terapije dobijen je pozitivan nalaz na prisustvo antigena *D. immitis*, odnosno dokazano je prisustvo antigena *D. immitis* u krvi ispitivanih pasa.

Za dijagnostiku dirofilarioze u slučaju postojanja mikrofilarioze, modifikovan Knott-ov test se pokazao kao pouzdana i precizna metoda u ovom istraživanju. Kod prisustva odraslih oblika u srcu, a u slučaju nemogućnosti detekcije mikrofilarija u cirkulaciji, ELISA test je dijagnostički metod izbora, što je u skladu sa nalazima drugih autora (Baneth, 2006).

Kada se radi o terapiji dirofilarioze, autori navode da je moguća samo mikrofilaricidna terapija, ili adulticidna i mikrofilaricidna terapija, u zavisnosti od korištenih preparata. U terapiji dirofilarioze se mogu koristiti preparati ivermektina, mikso-dektina, milbemicina (Baneth i sar., 2006). Bazzocchi i saradnici, kao i Atkins su radili terapiju dirofilarioze ivermektinom u kombinaciji sa doksiciklinom i dobili zadovoljavajuće rezultate. Prema njihovom istraživanju, efekat kombinacije ova dva leka (ivermektin 6µg/kg p/o kao nedeljna doza i doksiciklin 10mg/kg na dan, p/o više nedelja) je bio opadanje broja mikrofilarija u cirkulaciji, kao i adulticidni efekat. Ukupan efekat kombinacije leka je bio mnogo veći od efekta pojedinačnog davanja jednog i drugog preparata. Aplikacija ovih preparata je jednostavna, međutim davanje antibiotske terapije traje više meseci (Atkins, 2006; Bazzocchi i sar., 2008). Terapija melarsomin dihidrohloridom u kombinaciji sa milbemicin oksimom se pokazala kao efikasna u praksi i u ovom istraživanju, uz opreznost prilikom aplikacije preparata.

ZAKLJUČAK

Ispitivanjem 35 pasa bez kliničkih simptoma, prisustvo antigena *Dirofilaria immitis* u krvnom serumu utvrđeno je kod 4 životinje, odnosno 11% pasa. Kod 10 pasa sa kliničkim simptomima kašlja, otežanog disanja, apatije i brzog zamaranja, kod 8 je utvrđeno prisustvo mikrofilarija u cirkulaciji, odnosno nalaz Knott-ovim testom je bio pozitivan. Primenom ELISA testa, takođe je kod istih 8 pasa sa kliničkim simptomima utvrđen antigen *D. immitis*.

Knott-ov test i ELISA test su zadovoljavajući dijagnostički metod za postavljanje objektivne dijagnoze kod dirofilarioze pasa. Ukoliko su prisutne mikrofilarije u cirkulaciji, Knott-ovim testom se one nesumnjivo potvrđuju. Ako postoje samo odrasli oblici dirofilarija u srcu, prisustvo antigena se utvrđuje ELISA testom.

Terapija kod dirofilarioze nije jednostavna, od postupka primene lekova, kada je neophodna velika preciznost, do pojave neželjenih reakcija kod pasa. Terapija je efikasna i kod su kod pasa prisutni i odrasli i larveni oblika *D. immitis* i kompletna je ako ispoljava dejstvo protiv oba oblika parazita. Uklanjanjem samo mikrofilarija iz cirkulacije smanjuje se mogućnost širenja dirofilarioze. Nakon terapije, pse treba posmatrati još neko vreme (više meseci) radi provere efekata terapije.

Kod pasa koji imaju kliničke simptome u vidu otežanog disanja, prekomernog zamaranja i kašlja, veterinari u praksi počeli su da obraćaju pažnju na mogućnost

pojave dirofilarioze i ovo oboljenje više nije nepoznanica ni veterinarima ni vlasnicima pasa.

Dijagnostička ispitivanja na dirofilariozu su potrebna, pre svega, kod pasa sa kliničkim indikacijama i na prostorima gde postoje uslovi za širenje infekcije. Terapija je potrebna kod svakog dijagnostikovanog slučaja oboljenja i uspešno se primenjuje i u drugim zemljama i kod nas.

LITERATURA

1. Atkins C., Paul M.: Heartbreakers: Dodging the difficulties of *Dirofilaria immitis*. In: Proceedings of the North American Veterinary conference, Volume 20, Florida, small animal edition, 1017-1019, 2006.
2. Baneth G.: Two causes of canine and feline dirofilariasis. In: Proceedings of 2006 World Congress WSAVA/FECAVA, 481, 2006.
3. Bazzocchi C., Mortarino M., Grandi G., Kramer L.H., Genchi C., Bandi C., Genchi M., Sacchi L., McCall J.W.: Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs, *International Journal for Parasitology* 38, 1401-1410, 2008.
4. Dimitrijević S.: Dirofilarioza ante portas. U: Zbornik radova prvog savetovanja Clinica Veterinaris, 58, 1999.
5. Savić-Jevđenić S., Vidić B., Grgić Ž., Milovanović A.: Brza dijagnostika dirofilarioze pasa u regionu Novog Sada, *Veterinarski glasnik* 58, 5-6, 693-698, 2004.
6. 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.
7. Hoch H., Strickland K.: Canine and feline dirofilariasis: prophylaxis, treatment and complications of treatment, *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarians*, 30, 3, 146-51, 2008.
8. Genchi C., Rinaldi L., Mortarino M., Genchi M., Cringoli G.: Climate and dirofilaria infection in Europe, *Veterinary Parasitology* 163, 4, 286-92, 2009.

Primljeno: 02.11.2009.

Odobreno: 23.11.2009.

VALIDACIJA METODE TOTALNOG SAGOREVANJA ZA ODREĐIVANJE SIROVIH PROTEINA U HRANI ZA ŽIVOTINJE

Sandra Jakšić^{1*}, Željko Mihaljev¹, Milica Živkov-Baloš¹, Zoran Mašić²

¹Naučni institut za veterinarstvo «Novi Sad», Novi Sad, Rumenački put 20

²Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Kratak sadržaj

Sadržaj sirovih proteina je jedan od najvažnijih parametara kvaliteta hrane za životinje. Za određivanje ukupnih proteina Kjeldalova metoda je najpoznatija i najzastupljenija. Međutim, metoda totalnog sagorevanja, poznatija kao Dumasova, takođe je priznata kao standardna metoda. U ovom radu prikazan je model validacije Dumasove metode totalnog sagorevanja za određivanje sadržaja sirovih proteina na instrumentu Elementar-Rapid N. Validacija je obuhvatala određivanje linearnosti, granice detekcije, tačnosti i preciznosti, po zahtevu standarda. U procesu validacije su korišćene standardne supstance, a rezultati su obrađeni odgovarajućim statističkim metodama u programu Microsoft Excel. Ispitani parametri validacije pokazali su da testirana metoda može biti korišćena za pouzdano određivanje sadržaja ukupnog azota (proteina) u uzorcima hrane za životinje.

Ključne reči: sirovi proteini, metod totalnog sagorevanja, validacija, hrana za životinje

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

VALIDATION OF TOTAL COMBUSTION METHOD FOR CRUDE PROTEINS DETERMINATION IN ANIMAL FEED

Sandra Jakšić¹, Željko Mihaljev¹, Milica Živkov-Baloš¹, Zoran Mašić²
¹Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad, Rumenački put 20
²Faculty of Agriculture, Novi Sad

Abstract

Crude proteins content is one of the most important parameters of animal feed quality. For total proteins determination Kjeldahl method is the most known and most used. However, total combustion method, well-known as Dumas, is also recognized as standard method. In this paper the model of Dumas validation for total combustion method on the instrument Elementar- Rapid N is shown. The validation involves determination of linearity, detection limit, accuracy and precision, as the standard required. In validation procedure standard substances were used and the results were processed with suitable statistics methods in Microsoft Excel. Examined validation parameters show that the tested method can be used for accurate determination of total nitrogen (protein) determination in animal feed samples.

Key words: crude proteins, total combustion method, validation, animal feed

UVOD

Proteini su veoma važni sastojci hrane za životinje. Sadržaj sirovih proteina se izražava kao ukupan sadržaj azota pomnožen sa odgovarajućim faktorom i kao takav predstavlja važan parametar kvaliteta hrane. Postoje različite metode za određivanje sirovih proteina, a najčešće primenjivane su: IR metode, UV-vidljiva spektroskopija i instrumentalne tehnike bazirane na Kjeldalovoj i Dumasovoj metodi (McClements, 2003). Za koju metodu će se laboratorija odlučiti zavisi od vrste uzoraka, broja uzoraka i raspoloživih sredstava.

Za određivanje organskog azota najčešće se koristi Kjeldalova metoda, čije su modifikacije usvojene i kao standardne AOAC metode za različite vrste uzoraka (AOAC, 1998). Još jedna, dugo poznata metoda za određivanje različitih elemenata (ugljenik, vodonik, azot i sumpor) u različitim uzorcima jeste metoda totalnog sagorevanja (Dumasova). I ova metoda je priznata kao standardna od strane nekoliko organizacija (AOAC, 1998; ICC, 2000). Metoda se sastoji u sagorevanju uzorka u

atmosfera bogatoj kiseonikom, pri visokoj temperaturi i analiziranju dobijenih gasova u tri faze (ICC, 2000; Elementar, 2008):

1. sagorevanje: oksidacija pomoću kiseonika na oko 1000°C, i uz pomoć bakar-oksida;
2. redukcija i adsorpcija: proizvodi sagorevanja: ugljen-dioksid, voda, azot-dioksid i azot se dovode u stanje ravnoteže. Prevođenjem preko zagrejanog bakra redukuje se azot dioksid do azota, a adsorpcijom se uklanjaju ugljen-dioksid i voda;
3. kvantifikacija: ukupan azot se meri pomoću detektora termičke provodljivosti.

U laboratoriji za ispitivanje hrane za životinje odlučili smo se za primenu Dumasove metode, zbog njene brzine i jednostavnosti. U literaturi postoji nekoliko istraživanja – međulaboratorijskih ispitivanja koje porede Kjeldalovu i metodu totalnog sagorevanja za određivanje azota u uzorcima hrane za životinje. Svi autori se slažu u tome da su rezultati dobijeni Dumasovom metodom nešto viši, ali da standardna greška srednje vrednosti nije značajno različita, odnosno da metoda totalnog sagorevanja može zameniti Kjeldalovu metodu (Simonne i sar, 1997; Etheridge i sar., 1998; Marco i sar., 2002; Sader i sar., 2004; Miller i sar., 2007; Sebecic i Balenovic 2001; Schuster i sar., 1991).

U ovom radu su prikazani rezultati validacije metode totalnog sagorevanja za određivanje sirovih proteina u hrani za životinje. Naime, u standardu nije dat detaljan postupak rada, već samo mogućnost upotrebe instrumenta koji radi na principu ove metode i kojim se postižu zahtevane performance. Iz tog razloga cilj validacije metode je dokumentovanje saglasnosti testirane metode sa standardnom AOAC Official Method 990.03 Protein (Crude) in Animal Feed Combustion Method, odnosno AOAC Official Method 992.23 Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds Generic Combustion Method (AOAC, 1998).

MATERIJAL I METODE RADA

Validovana je metoda totalnog sagorevanja za određivanje sirovih proteina pomoću aparata Rapid N, Elementar, Germany (Elementar, 2008).

Postupak validacije je izveden prema Priručniku za kurs Validacija mernih metoda, Saveza hemijskih inženjera, a koji je zasnovan na zahtevima i uputstvima internacionalnih standarda (Kostić i Rakićević, 2009).

Zahtevi za izvođenje metode su prikazani u tabeli 1, a odnose se na performance metode zadate u standardu AOAC 990.03, odnosno AOAC 992.23 (AOAC, 1998).

Tabela 1: Zahtevi za izvođenje metode

Opseg	0,2-20 % N
Linearnost	Određena pomoću teoretskog sadržaja N u organskoj supstanci čistoće 99,9%
Tačnost	$\pm 0,15$ očekivane teoretske vrednosti sa standardnom devijacijom $\leq 0,15$, određeno pomoću nikotinske kiseline, lizin hidrohlorida ili triptofana
Preciznost	RSD $\leq 2,0\%$ za 10 uzastopnih određivanja N

Dnevna kalibracija aparata u cilju određivanja dnevnog faktora je izvršena pomoću asparaginske kiseline 99,8% (Sigma-Aldrich).

Limit detekcije je određen merenjem šest ponavljanja slepe probe, Sn-folije za pakovanje uzoraka koja ne sadrži azot (Elementar, Germany).

Pri postupku validacije, čiji je plan dat u tabeli 2, korišćene su sertifikovane hemikalije odgovarajuće čistoće. Za određivanje linearnosti korišćena je standardna kalibraciona supstanca etilendiamin tetrasirćetna kiselina (EDTA, 100,2%, Molar Chemicals) u količini 20-300 mg. Tačnost je određena određivanjem sadržaja azota u standardnoj supstanci L-Triptofan 99,9% (Sigma-Aldrich).

Preciznost je određena iz 10 uzastopnih određivanja azota u uzorku potpune smeše za piliće.

Tabela 2: Plan rada

Dani	Akcije
Dan 1	Određivanje granice detekcije
Dan 2	Određivanje linearnosti
Dan 3	Određivanje tačnosti
Dan 4	Određivanje preciznosti i tačnosti
Dan 5	Određivanje linearnosti

REZULTATI RADA I DISKUSIJA

Primenjena procedura određivanja granice detekcije dala je rezultate prikazane u tabeli 3. Iz dobijenih rezultata, za šest merenja i $t_{0,95} (6-1) = 2,015$, izračunata je standardna devijacija (SD) i granica detekcije, koja iznosi 0,058% N.

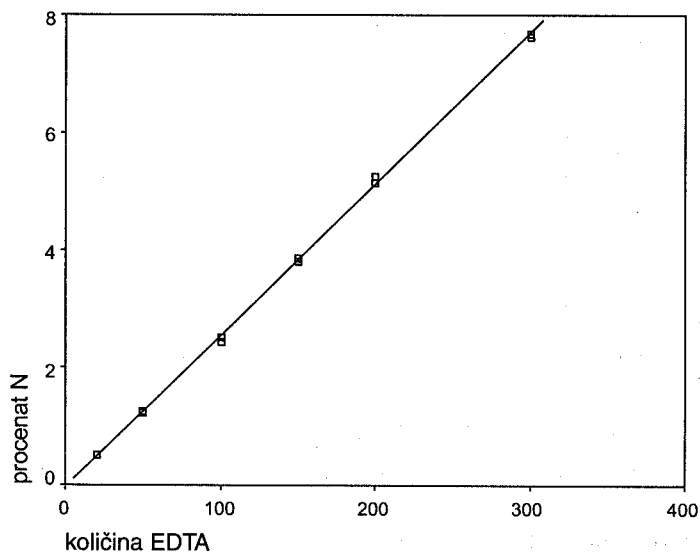
Tabela 3: Rezultati određivanja % N u slepoj probi

Br. merenja	% N
1.	0,006
2.	0,036
3.	0,013
4.	0,013
5.	0,017
6.	0,002
SD	0,012

Rezultati merenja sadržaja N u EDTA dati su u tabeli 4 i na osnovu njih je grafički prikazana linearnost određivanja na grafikonu 1:

Tabela 4: Određivanje sadržaja N u EDTA

Br. određivanja	Količina EDTA (mg)	% N
1.	20	0,5
2.	20	0,509
3.	50	1,257
4.	50	1,224
5.	100	2,512
6.	100	2,448
7.	150	3,798
8.	150	3,86
9.	200	5,256
10.	200	5,142
11.	300	7,636
12.	300	7,682



Grafikon 1. Linearnost određivanja N u EDTA.

Primenjena procedura određivanja linearnosti (Kostić i Rakićević, 2009), pomoću programa Microsoft Excel (opcije Tools/Data Analysis/Regression) dala je rezultate prikazane u tabeli 5:

Tabela 5. Linearnost određivanja %N

Regression Statistics						
Multiple R	0,9997					
R Square	0,9995					
Adjusted R Square	0,9994					
Standard Error	0,0607					
Observations	12					
ANOVA						
	df	SS	MS	F	Significance F	
Regression	1	70,7945	70,7945	19234,8036	9,32454E-18	
Residual	10	0,0368	0,0037			
Total	11	70,8313				
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%
Intercept	-0,0355	0,0308	-1,1517	0,2762	-0,1042	0,0332
X Variable 1	0,0258	0,0002	138,6896	9,32454E-18	0,0253	0,0262

Testiranje linearnosti kalibracione krive vršili smo izračunavanjem testirane vrednosti Zl, pomoću podataka iz tabele 5, a hipoteza «kalibraciona kriva je linearna» se prihvata, jer je testirana vrednost Zl manja od granične vrednosti za 95% fraktila od F, tj. 2,04,53.

U cilju utvrđivanja tačnosti metode, urađeno je pet uzastopnih određivanja sadržaja N u standardnoj supstanci triptofanu u dva dana (tabela 6).

Tabela 6: Određivanje sadržaja N u triptofanu

Br. određivanja	%N (I dan)	%N (II dan)
1.	13,644	13,720
2.	13,428	13,631
3.	13,469	13,369
4.	13,488	13,452
5.	13,429	13,560

Primenjena procedura (Kostić i Rakićević, 2009) određivanja tačnosti na osnovu podataka iz tabele 6, i nominalne vrednosti sadržaja N u triptofanu (13,71%), dala je sledeće rezultate: maks efikasnost (Recovery) 100%, odnosno, min efikasnost 97%, što znači da je tačnost određivanja 97-100%, istinitost 99% ($X_{sr} = 13,519\%$), a odstupanje (Bias) 1%.

Primenjena procedura (Kostić i Rakićević, 2009) određivanja preciznosti na osnovu podataka iz tabele 6 pomoću programa Microsoft Excel (opcije Tools/Data Analysis/Anova Single Factor) dala je rezultate prikazane u tabeli 7. Na ovaj način došli smo do sledećih podataka o preciznosti metode: Standardna devijacija unutar grupe iznosi $S_w = 0,087\%$, standardna devijacija između grupa $S_b = 0,078$, a ukupna standardna devijacija je $Stot = 0,117\%$

Tabela 7: Preciznost određivanja triptofana

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Row 1	2	27,364	13,682	0,002888		
Row 2	2	27,059	13,5295	0,0206045		
Row 3	2	26,838	13,419	0,005		
Row 4	2	26,94	13,47	0,000648		
Row 5	2	26,989	13,4945	0,0085805		
		xsr	13,519			
		Sx	0,09959982			
		Sx ²	0,00992013			
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0,079361	4	0,01984025	2,62986798	0,158752494	5,192163144
Within Groups	0,037721	5	0,0075442			
Total	0,117082	9				

U tabeli 8 prikazani su rezultati 10 uzastopnih određivanja sadržaja N, odnosno sirovih proteina u potpunoj smeši za ishranu pilića. Dobijena relativna standardna devijacija (RSD) zadovoljava zahtev standarda te je preciznost određivanja zadovoljavajuća.

Tabela 8: Određivanje sadržaja N u potpunoj smeši za ishranu pilića

Br. odred.	%N	% proteina
1.	3,916	24,478
2.	3,686	23,035
3.	3,898	24,363
4.	3,829	23,929
5.	3,824	23,897
6.	3,750	23,436
7.	3,705	23,158
8.	3,825	23,908
9.	3,897	24,355
10.	3,830	23,937
Xsr	3,805	23,780
Sx	0,076	0,475
RSD %	1,999	1,999

ZAKLJUČAK

Dobijeni eksperimentalni rezultati određivanja linearnosti, granice detekcije, tačnosti i preciznosti ukazuju da je validovana metoda primenjiva za određivanje sirovih proteina u uzorcima hrane za životinje. Metoda se pokazala kao jednostavna, brza i praktična, obzirom na činjenicu da zahteva malu količinu uzorka i da analiza jednog uzorka traje 3 minuta.

Metoda može biti korišćena za određivanje sadržaja proteina u stočnoj hrani, u skladu sa sledećim kartonom metode.

NAUČNI INSTITUT ZA VETERINARSTVO NOVI SAD	IZVEŠTAJ O VALIDACIJI METODE Naziv metode: Određivanje sadržaja proteina u hrani za životinje	Datum: 22.06.2009.
NIV-NS	Odeljenje za ispitivanje hrane za životinje	

KARTON METODE	
Naziv metode: Određivanje sadržaja proteina u hrani za životinje	Datum izrade izveštaja: 22.06.2009.
Ispitivani parametar: Azot	Izveštaj izradio: mr Sandra Jakšić
Vrsta uzorka: Hrana za životinje	
Princip metode:	Merenje sadržaja azota i preračunavanje na sadržaj proteina u skladu sa AOAC Official Method 990.03 Protein (Crude) in Animal Feed Combustion Method, odnosno, AOAC Official Method 992.23 Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds Generic Combustion Method.
Kratak opis validacije:	Metoda je validovana određivanjem linearnosti (6 nivoa koncentracije), granice detekcije (6 određivanja) tačnosti (standardna supstanca, određivanje u duplikatu u 5 serija) i preciznosti (1 prirodni uzorak, određivanje u 10 uzastopnih merenja).
Rezultati validacije	
Opseg	0,5-20 %
Linearni opseg	0,5-7,5 %
Granica detekcije	0,06%
Efikasnost	97-100%
Ponovljivost	0,09%
Standardna devijacija između grupa	0,08%
Standardna devijacija	0,12%
Ispitivanje izvršio:	mr Sandra Jakšić
Arhiva (oznaka sobe, registratora):	Validacija metoda, soba 503
Odobrio	mr Željko Mihaljev
Datum :	22.06.2009.

LITERATURA

1. AOAC INTERNATIONAL, 1998.
2. Elementar, Rapid N Cube, Condensed Manual, Germany, 2008.
3. Etheridge R.D., Pesti G.M., Foster E.H.: A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. *Animal Feed Science and Technology* 73, 21-28, 1998.
4. ICC Standard No. 167: Determination of crude protein in grain and grain products for food and feed by the Dumas Combustion Principle, 2000. <http://www.icc.or.at/methods3.php#ICC109>
5. Kostić N., Rakićević M.: Priručnik za kurs Validacija mernih metoda, Beograd, Savez hemijskih inženjera, 2009.

6. Marco A., Rubio R., Compano R., Casals I.: Comparison of the Kjeldahl method and a combustion method for total nitrogen determination in animal feed. *Talanta* 57, 1019-1026, 2002.
7. McClements D.J.: Analysis of Food Products (Food Science 581), 2003 <http://www-unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Proteins.html>.
8. Miller E.L., Bimbo A.P., Barlow S.M., Sheridan B.: Repeatability and reproducibility of determination of the nitrogen content of fishmeal by the combustion (Dumas) method and comparison with the Kjeldahl method: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 90, 6-20, 2007.
9. Sader A.P.O., Oliveira S.G., Berchielli T.T.: Application of Kjeldahl and Dumas combustion methods for nitrogen analysis. *Archives of Veterinary Science* 9, 73-79, 2004.
10. Schuster M., Morwarid M., Sattes H.: Dumas combustion method for estimating protein content of feeds. Umweltaspekte der Tierproduktion. 103.VDLUFA Kongress, Ulm, 16/21. September 1991.
11. Sebecic B., Balenovic J.: Rapid ecologically acceptable method for wheat protein content determination - Comparison of methods. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 97, 221-225, 2001.
12. Simonne A.H., Simonne E.H., Eitenmiller R.R., Mills H.A., Cresman III C.P.: Could the Dumas Method Replace the Kjeldahl Digestion for Nitrogen and Crude Protein Determinations in Foods? *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 73, 39-45, 1997.

Primljeno: 28.10.2009.

Odobreno: 23.11.2009.

UPUTSTVO AUTORIMA ZA PRIPREMANJE RUKOPISA

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

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

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

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

Opšta uputstva

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

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

Naslovna strana

Na prvoj stranici treba napisati sledeće:

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

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

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

Kratak sadržaj

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

Pisanje teksta

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

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

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

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

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

Poglavlja rada

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

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

Materijal i metode rada. U ovom poglavlju treba opisati uslove pod kojima su ogleđi 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 epizootološkom 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. 021/4895-392, fax. 021/518-544,
e-mail: arhiv@niv.ns.ac.yu

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 Ž.: Mesto i uloga terenskog veterinara u epizootiološkom radu. U: Dragiša R.Trailović, urednik, Zbornik radova, X regionalno savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja, 1-5. septembar, Kragujevac, Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2008, 75-82

Note

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

Address of the journal

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad
Rumenački put 20, tel. 021/4895-392, fax. 021/518-544,
e-mail: arhiv@niv.ns.ac.yu

Arhiv veterinarske medicine
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”
Novi Sad

Uređivački savet:

dr Branka Vidić, predsednik
dr Sava Lazić, zamenik predsednika
dr Mišo Hristovski, Makedonija
dr Alnedina Zuho, Federacija BiH
dr Nedelcho Nedelchev, Bugarska
dr Georgije Darabuš, Rumunija
dr Drago Nedić, Republika Srpska, FBiH
dr Dragan Rogan, Kanada
dr Zoran Mašić
dr Maja Velhner
dr Dušan Orlić

dr Milovan Jovičin
dr Slavica Košarčić
dr Mira Kovačević
dr Dragica Stojanović
dr Milica Živkov-Baloš
dr Miloš Kapetanov
dr Nada Plavša
dr Jelena Petrović
dr Tamaš Petrović
dr Igor Stojanov

Uređivački odbor:

Glavni i odgovorni urednik:

dr Branka Vidić, naučni savetnik

Uredništvo:

dr Sava Lazić, zamenik urednika
dr Dušan Orlić, zamenik urednika
dr Drago Nedić, Republika Srpska, FBiH
dr Dragan Rogan, Kanada
dr Maja Velhner
dr Milovan Jovičin
dr Slavica Košarčić
dr Mira Kovačević
dr Dragica Stojanović

Lektor i prevod na engleski jezik: mr Lidija Orčić

Tehnički sekretar: Vera Prokić

Časopis se objavljuje dva puta godišnje. Tiraž 150 primeraka

Adresa uredništva:

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, 21000 Novi Sad, Rumenački put 20

Tel. 381(0) 21 4895392

E-pošta: arhiv@niv.ns.ac.yu

Žiro račun: 355-1006444-18 Vojvođanska banka,

matični broj: 08608857, PIB 100236555

Arhiv veterinarske medicine

vol. 2

br. 2

str. 1-96

Novi Sad, 2009.

Angel Mortrovski, Nedelcho Nedelchev, Stoil Karadzhov

Infektivne bolesti u industrijskoj proizvodnji svinja u Bugarskoj. 3

Živoslav Grgić, Branka Vidić, Sara Savić, Aleksandar MilovanovićIspitivanje prisustva infekcije sa *brucella ovis* (ovine epididimitis) kod ovaca 17**Raiko Peshev, Ivo Sirakov, Nedelcho Nedelchev, Stoil Karadzhov**

Etiološko i molekularno-biološko istraživanje kozijeg herpesvirusa 1 izolovano u Bugarskoj. 27

Snežana Ivanović, Milenko Žutić, Oliver RadanovićKontaminacija klaničnih površina i opreme sa *Listeria monocytogenes*. 39**Nedžad Gradašević, Lejla Saračević, Davorin Samek, Anto Mihalj**

Uticaj prirodno povišenog nivoa uranijuma i radijuma u tlu na animalnu proizvodnju preživara na području Livna. 49

Gordana Pantelić, Vedrana Vuletić, Maja Eremić-Savković,**Ljiljana Javorina, Irena Tanasković**

Radioekološki monitoring u Srbiji. 59

Sara Savić, Živoslav Grgić, Biljana Vujkov, Ivan Fenjac, Dušan Pajković,**Marina Žekić**

Utvrđivanje dirofilarioze pasa primenom elisa metoda i modifikovanog knott-ovog testa. 71

Sandra Jakšić, Željko Mihaljev, Milica Živkov-Baloš, Zoran Mašić

Validacija metode totalnog sagorevanja za određivanje sirovih proteina u hrani za životinje 79