

UDK 619

ISSN 1820-9955

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”  
Novi Sad

# Arhiv veterinarske medicine

Arh. vet. med.	vol. 1	br. 2	str. 1-100	Novi Sad, 2008.
----------------	--------	-------	------------	-----------------

СИР – Каталогизација у публикацији  
Библиотека Матице српске, Нови Сад

619

**Arhiv veterinarske medicine** / glavni i odgovorni urednik  
Branka Vidić. – Vol. 1, br. 2 (2008) – . – Novi Sad :  
Начни институт за ветеринарство „Нови Сад”, 2008 – . – 25 cm

Dva puta годишње.

ISSN 1820-9955

COBISS.SR-ID 235692807

**Arhiv veterinarske medicine**

vol. 1

br. 2

str. 1-100

Novi Sad, 2008.

---

<b>Milanov Dubravka, Ašanin Ružica, Vidić Branka, Petrović Jelena, Krnjajić D.:</b> Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima .....	3
<b>Petrović T., Lazić S., Lupulović Diana, Bugarski D., Đuričić Bosiljka:</b> Rezultati ispitivanja raširenosti BVDV infekcije u velikim i malim zapatima goveda na području južnobačkog i sremskog okruga .....	16
<b>Došen R., Prodanov Jasna, Pušić I., Stojanov I., Maljković M.:</b> Uticaj oboljenja respiratornog trakta na zaostajanje svinja u porastu.....	30
<b>Plavša Nada, Stojanov I., Milanov Dubravka, Petrović Jelena:</b> Američka kuga pčelinjeg legla - epizootiološka situacija i značaj ranog otkrivanja bolesti .....	41
<b>Milovanović A., Lazarević M., Kirovski Danijela, Jovičin M., Barna T.:</b> Titar antitela protiv antigena spermatozoidea bika u krvnom serumu krava i junica sa različitim brojem osemenjavanja .....	50
<b>Petrović Jelena, Čobanović Ksenija, Kovačević Mira, Ra tajac R.:</b> Kvalitativno određivanje rezidua antibiotika u mleku različitim skrining metodama i bio testom .....	57
<b>Mihaljev Ž., Živkov-Baloš Milica, Jakšić Sandra:</b> Mogućnost određivanja Vitamina B12 u vitaminskim predsmešama i dodacima hrani za životinje metodom AAS .....	64
<b>Stojanović Jelena, Petrović N., Savić Sara:</b> Značaj menadžmenta i ljudskih resursa u evaluaciji Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad” .....	69

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

**Uređivački savet:**

**Uređivački odbor:**

dr Branka Vidić, predsednik  
dr Sava Lazić, zamenik predsednika  
dr Mišo Hristovski, Makedonija  
dr Alnedina Zuh, 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

**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

# Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima

Dubravka Milanov,<sup>1\*</sup> Ružica Ašanin,<sup>2</sup> Branka Vidić,<sup>1</sup> Dejan Krnjajić,<sup>2</sup>  
Jelena Petrović<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad

<sup>2</sup> Fakultet veterinarske medicine, Beograd

## Kratak sadržaj

U svim prirodnim ekosistemima, uključujući i organizme ljudi i životinja, bakterije pokazuju tendenciju vezivanja za površine i formiranja struktura poznatih pod nazivom „biofilm”. Formiranje biofilma je genetski regulisan proces u životu bakterija, odigrava se u nekoliko faza i zahteva intercelularnu komunikaciju. U biofilm zajednici bakterije pokazuju drugačije osobine u odnosu na svoje slobodno suspendovane dvojnice, pre svega zbog drugačijeg profila transkripcije gena i povećane otpornosti na antibiotike i sredstva za dezinfekciju. Otkriće mikrobnih biofilmova menja pogled na život bakterija, na koje se sve manje gleda kao na jednoćelijske organizme, a sve više kao na višećelijske zajednice koje po nekim osobinama imitiraju primitivno eukariotsko tkivo. Poslednjih decenija beleži se porast infekcija izazvanih bakterijama koje stvaraju biofilmove, a koje odlikuje hronični tok i recidivirajući karakter. Konvencionalni metodi ubijanja bakterija antibioticima i biocidima uobičajeno su neefektivni kod bakterija organizovanih u biofilmu.

Ključne reči: bakterije, biofilm, infekcije

---

\* e-mail: dubravka@dubravka@niv.ns.ac.yu

# Biofilm – organisation of bacteria life in natural eco systems

Dubravka Milanov,<sup>1</sup> Ružica Ašanin,<sup>2</sup> Branka Vidić,<sup>1</sup> Dejan Krnjajić,<sup>2</sup>  
Jelena Petrović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

<sup>2</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Belgrad

## Abstract

In all natural ecosystems, including both humans and animals, bacteria show a tendency to bind on the surface and form a structure known as biofilm. Biofilm formation is a genetically regulated process in the life of bacteria and has several phases demanding intercellular communication. In biofilms bacteria express different characteristics comparing to their free suspended counterparts, due to different gene transcription profile and increased resistance towards antibiotics and disinfectants. Discovery of microbial biofilms has changed our understanding of bacteria, that are not viewed only as unicellular organisms, but more as a multi-cellular community that in some characteristics imitates primitive eukaryotic tissue. In the last decades there is an increasing evidence on infections caused by bacteria that form biofilms, and have a chronic course with possibility of recidives. Conventional methods of killing microbes by antibiotics and biocides is usually ineffective in bacteria organized in biofilms.

Key words: bacteria, biofilm, infection

## UVOD

Naše razumevanje života bakterija uglavnom se bazira na saznanjima stečenim ispitivanjem čistih kultura bakterija koje rastu na podlogama bogatim hranljivim sastojcima. Karakteristike koje bakterije pokazuju dok rastu pod ovim uslovima svojstvene su njihovom planktonskom fenotipu. Izolacija bakterija iz njihovih prirodnih staništa i umnožavanje u čistoj kulturi, omogućilo je tokom proteklog stoljeća ispitivanje njihovih funkcionalnih i morfoloških karakteristika, identifikaciju nebrojenih vrsta i rasvetljavanje pojedinih aspekata patogeneze oboljenja izazvanih ovim vrstama mikroorganizama. Međutim, u svim prirodnim ekosistemima bakterije pokazuju tendenciju vezivanja za žive i nežive površine i formiranja struktura poznatih pod nazivom biofilm. Uklapljene u biofilm, bakterije se bitno razlikuju od svojih slobodno suspendovanih, planktonskih dvojnika i ova dva životna stila predstavljaju dva različita bakterijska fenotipa.

Još je van Leeuwenhoek 1684. godine zapazio mikroorganizme na površini zubne gleđi (*animacules in scurf on teeth*), što bi se moglo smatrati prvim otkrićem biofilma kojeg stvaraju mikroorganizmi. Izučavanje biofilmova praktično je započelo tek sa razvojem elektronske mikroskopije i fotomikroskopije visoke rezolucije, a prva istraživanja uglavnom su se bazirala na prirodne vodene ekosisteme, sisteme distribucije vode, tretmane otpadnih voda i dentalne plakove. Tokom poslednje dve decenije prihvaćena je hipoteza o značaju bakterija koje formiraju biofilm u etiologiji nekih hroničnih infekcija, pa se medicinska mikrobiologija nadovezala na istraživanja iz oblasti ekologije mikoorganizama i industrijske mikrobiologije. Time je prihvaćen koncept da bakterije slično rastu u svim ekosistemima, uključujući i žive organizme.

## DEFINICIJA BIOFILMA

Teoriju biofilma postavili su Costerton i sar. 1978. godine i definisali ga kao strukturnu zajednicu bakterijskih ćelija koje su vezane za nežive ili žive površine i uklopljene u polimerni matriks koji same produkuju. Donlan i Costerton su 2002. godine postavili novu, dopunjenu definiciju po kojoj je biofilm zajednica mikroorganizama koji su ireverzibilno vezani za površinu, međufazu ili nešto drugo, koji su uklopljeni u matriks ekstracelularne polimerne supstancije i koji pokazuju izmenjeni fenotip u odnosu na brzinu rasta i transkripciju gena.

## FORMIRANJE BIOFILMA

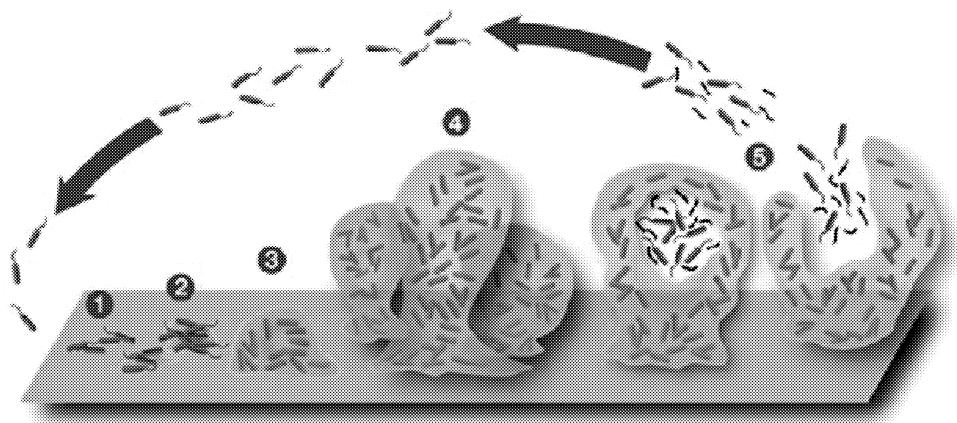
Biofilm može da se formira na svim biotskim i abiotiskim površinama koje su u kontaktu sa tečnostima, na površini mekih tkiva u organizmu, biljkama, mineralnim površinama, stenama u slatkim i slanim vodama, mlekovodima, naftnim cevima, biomedicinskim implantatima, kontaktnim sočivima, kao i voda/vazduh međufazi. Formiranje biofilma je složen proces koji se odigrava u nekoliko faza. Neki autori kondicioniranje površine smatraju prvim korakom u formiranju biofilma, iako on predstavlja interakciju površine i njene okoline, odnosno položenje organskih i neorganskih polimera iz tečnosti koje će omogućiti naknadno prikačivanje mikroorganizama. Adhezija bakterija, po McEldowney i Fletcher (1987) biće na taj način uslovljena kompatibilitetom makromolekula kondicionirane površine sa površinskim osobinama bakterije, što može ili da olakša ili da redukuje bakterijsku adheziju na supstrat. Odličan primer prirodnog kondicioniranja (preduslovljavanja) je *acquired pellicle* (stečena opnica) koja se razvija na zubnoj gleđi. Ona je sastavljena od albumina, lizocima, glikoproteina, fosfoproteina, lipida i tečnosti gingivalnih napuklina. Bakterije oralne šupljine koloniziraju ovu „opnicu“ kroz nekoliko sati ekspozicije. Mittelman (1998) navodi da u životu organizmu ulogu kondicioniranja površine imaju suze, pljuvačka, intravaskularna tečnost, respiratori sekreti i urin. Takođe, inicijalna populacija bakterija koja se već vezala za površinu deluje kao kondicioni sloj, jer može omogućiti sledećoj vrsti prikačivanje ćelijom na ćeliju.

Marshall i sar. (1971) su predložili dvostepeni, od vremena zavisni model adhezije morskih bakterija na staklenu površinu i on je generalno prihvaćen za sve oblike vezivanja bakterija na različite supstrate. Po ovom modelu, prvo se odigrava jedna prolazna, reverzibilna asocijacija između bakterije i površine, na koju se nadovezuje irreverzibilno vezivanje posredovano produkcijom ekstracelularne supstancije.

Prijanje i posledično vezivanje bakterija za površinu može biti aktivno ili pasivno, zavisno od ćelijske pokretljivosti. Pasivno vezivanje je uslovljeno gravitacionom silom, difuzijom i dinamikom tečnosti, dok na aktivno vezivanje utiču osobine ćelijske površine baterija, tj. flagele, pili, adhezini, proteini, kapsule i površinsko nanelektrisanje. Mittelman (1998) prvu fazu reverzibilnog vezivanja opisuje kao inicijalnu, slabu interakciju između bakterijske ćelije i supstrata posredovanu van der Waals i elektrostatickim silama, kao i hidrofobnim interakcijama. Ovu primarnu adheziju Dunne (2002) naziva fazom spajanja (*docking stage*).

U funkciji vremena veza između bakterija i supstrata jača, čineći vezivanje irreverzibilnim procesom. Ta druga faza, koju Dunne (2002) naziva i „fazom zaključavanja“ (*locking phase*), rezultat je produkcije ekstracelularne polimerne supstancije (EPS), glikokaliksa ili matriksa biofilma. Preko EPS-a bakterijsko vezivanje za supstrat uključuje sile kratkog dometa kao što su dipol-dipol interakcije, hidrogenске veze, jonsko i kovalentno vezivanje. Matriks biofilma je visoko hidriran i po svom sastavu on je predominantno voda. Kada je potpuno hidriran sadrži 85-95% vode, zatim polisaharide, proteine, fosfolipide, teihoičnu i nukleinske kiseline i druge polimere. Većinu matriksa biofilma čine šećeri: glukoza, galaktoza, manzoa, fruktoza, ramnoza, N-acetylglukozamin i drugi (<http://www.biofilm.org/>). Carpentier i Cerf (1993) opisuju EPS kao trodimenzionalno polje koje okružuje i usidrava za površinu vezane bakterije, sprečava isušivanje i obezbeđuje zaštitu stanovnika biofilma od pretnji kao što su biocidi, antibiotici, antitela, deterdženti, bakteriofagi ili predatori kao što su slobodno-živeće amebe i bela krvna zrnca.

Razvoj biofilma rezultat je adherencije novih planktonskih ćelija u kombinaciji sa kontinuiranim rastom već vezanih ćelija. Potencijal rasta jednog bakterijskog biofilma limitiran je raspoloživošću hraniva u neposrednoj okolini, perfuzijom ovih sastojaka do bakterijskih ćelija i uklanjanjem metaboličkih produkata. Ako su okolnosti povoljne za uspešan rast i aglomeraciju, biofilm se razvija u organizovanu strukturu i taj proces se naziva maturacija ili sazrevanje biofilma. Deibel i Schoeni (2003) procenjuju da se u uslovima kontinuiranog priliva hraniva, biofilm formira brzo i razmatra kao „zreo“ za 24 sata, a za više dana može nastaviti da raste do milimetarskih proporcija. Povremeno delovi biofilma mogu da skliznu sa površine zahvaljujući dinamici toka i efektu spiranja tečnosti, dejstvom hemikalija ili zbog promena uslova u biofilmu. Oslobođene bakterije mogu ostati u tečnosti kao kontaminanti ili se preneti do drugih lokacija gde će otpočeti ponovo formiranje biofilma. Neki autori čak planktonski fenotip bakterija smatraju samo mehanizmom za rasprostranjivanje.



Slika 1: Faze formiranja bifilma

1. Stadijum reverzibilnog vezivanja; 2. Stadijum ireverzibilnog vezivanja (produkcija EPS); 3. Umnožavanje bakterija; 4. Sazrevanje (maturacija) biofilma;
  5. Odvajanje delova biofilma.
- (izvor: [www.erc.montana.edu/biofilmbook/](http://www.erc.montana.edu/biofilmbook/))

Watnick i Kolter (2000), Deibel i Schoeni (2003) napominju da biofilm ne treba shvatiti kao nepokretnu gomilu ćelija, već kao jednu funkcionalnu životnu zajednicu koja jednom kada se formira, dalje živi svoj život i demonstrira visoku vrednost aktivnosti. Costerton i sar. (1995) i Trachoo i sar. (2003) zaključuju da zajednica biofilma pokazuje jednostavnu homeostazu, cirkulatorni sistem, izmenu genetičkog materijala i metaboličku kooperaciju. Zbog funkcionalne koordinacije, Costerton i sar. (1995) zreo biofilm upoređuju sa primitivnim eukariotskim tkivom.

## STRUKTURA ZRELOG BIOFILMA

Biofilmovi su u početku smatrani homogenim strukturama podjednake debljine, ali to u većini slučajeva nije tako. Termin „biofilm“ je neku ruku pogrešan naziv, zato što on nije kontinuiran monosloj površinske naslage. Struktura biofilma zavisi od unutrašnjih (genetskih) i spoljašnjih (fizičko-hemijskih) faktora. Struktura biofilma bitno zavisi od koncentracije hraniva, na osnovu čega su definisana tri razvojna modela (<http://www.ffos.hr/~gpalijan/Stranica02Frame-1>). Najjednostavniji biofilmovi nastaju na zubnim površinama u uslovima visoke, ali periodične koncentracije hraniva, kao jednolična prevlaka vančelijskog polimera u kome su bakterije različito raspoređene. Biofilmovi na zidovima vodovodnih cevi u uslovima niske koncentracije hranljivih sastojaka predstavljaju drugi razvojni model. Ovi biofilmovi se sastoje od mestimično razvijenih tornjeva EPS-a sa bakterijama koje se izdižu iz ravni tanke, jednolične prevlake. Treći model se razvija u uslovima stalne visoke koncentracije hraniva i smatra se najčešćim tipom razvoja biofilma. Prema ovom modelu, rastom mikrokolonija nastaju pečurkaste strukture od polimera i bakterija.

Unutrašnjost presecaju tuneli koji se mestimično otvaraju na površini koja je izbrazdانا kanalima. Ovakva organizacija omogućava strujanje vode kroz čitav sloj čija debljina iznosi od par desetina do par hiljada mikrometara, i komunikaciju sa okolnom vodom koja donosi hraniva i odnosi metaboličke produkte. Svojim izgledom, zreli mikrobnii biofilmovi podsećaju na koralne grebene mora.

Direktna posmatranja živih biofilmova konfokalnom laser mikroskopijom, u rasponu od laboratorijski proizvedenih biofilmova jedne bakterijske vrste do kompleksnih biofilmova sastavljenih od većeg broja vrsta kakvi postoje u prirodnim ekosistemima, pokazala su da je osnovna biofilm struktura univerzalna i da su varijacije minorne. Ova tehnika u kombinaciji sa primenom fluorescentnih boja, kao što je na primer akridin-oranž, omogućuje istraživačima kvantifikaciju vijabilnih ćelija u biofilmu. Specifična antitela konjugovana fluorescentnim bojama omogućavaju identifikaciju određenih mikroorganizama u mešanoj biofilm zajednici. Lawrence i sar. (1991) su primenom ove metode i biofilmova *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* i *Vibrio parahaemolyticus*, kreirali sliku arhitekture biofilma koji postoji u prirodi, otkrićem jedne pečurkaste strukture sa tornjevima, postoljima i vodenim kanalima. U ovim studijama biofilm je proizведен u komorama sa kontinuiranim protokom tečnosti. Svaki biofilm je pokazao varijacije u dubini, u odnosu ćelijskog i nećelijskog materijala, visoku hidriranost i 73-98% nećelijskog materijala, uključujući vodene kanale i egzopolisaharide. Tolker-Nielsen i Molin (2000) navode da je svaka mikrobnia biofilm zajednica jedinstvene strukture, iako se neki strukturalni atributi razmatraju kao univerzalni. Arhitektura biofilma se menja u vremenu i prostoru, a njegova heterogena struktura sastoji se od mikrokolonija bakterija uklopljenih u EPS i odvojenih od drugih kolonija vodenim kanalima. U većini slučajeva baza biofilma je gusta, neprozirna, muljava struktura 5-10 µm debljine. Kolonije bakterija, oblika pečurke ili kupe, uzdižu se na visinu od 100-200 µm sa mrežom kanala kojima putuju voda, hranljive materije, enzimi, metaboliti i kiseonik.

## KARAKTERISTIKE I PREDNOSTI ŽIVOTA U BIOFILMU

### 1. Intercelularna komunikacija

Celije u biofilmu međusobno komuniciraju putem produkata koji su u stanju da difunduju iz jedne u drugu ćeliju. Regulacija ekspresije gena koja će rezultirati prelaskom ćelije iz planktonske faze u biofilm, čvrsto je povezana sa vanćelijskom koncentracijom ovih signalnih molekula (autoinducera). Inicijacija ekspresije gena tek pri graničnoj koncentraciji međućelijskih signalnih molekula (autoinducera) naziva se eng. *quorum sensing*. Ova pojava prvi put je otkrivena početkom sedamdesetih godina prošlog veka kod morske simbiotske svetleće bakterije *Vibrio fischeri*. U početku se smatralo da je takav mehanizam svojstven samo regulaciji bioluminiscencije ovih vibriona, a kasnije je utvrđena veza između mehanizama koji regulišu pojavu bioluminiscencije i formiranja biofilma. Danas je poznato da autoindukcija pri postignutom „kvorumu“ tj. graničnoj koncentraciji autoinducera,

reguliše i procese sinteze antibiotika, ekspresije faktora virulencije, adsorpcije egzogene DNA, konjugacije, kretanja, rasta, stvaranja spora, toksina i dr. Intercelularno signaliziranje je kritičan faktor u diverzitetu i distribuciji bakterija u multi-species biofilmu.

Postoje dva osnovna tipa autoinducerskih molekula. Kod gram pozitivnih bakterija to su kratki peptidni lanci, a gram negativne bakterije koriste acil-homoserin laktone (AHL). Ista bakterija može da sintetiše različite AHL. Te bakterije mogu „osećati“ ne samo gustinu sopstvene, već i drugih populacija bakterija u svom okruženju. Neke biljke stvaraju i otpuštaju u svoju okolinu materije koje inhibiraju sistem autoindukcije, onemogućavajući na taj način razvoj biofilma na svojoj površini. Ovi hemijski signali (bakterijski analozi hormonima) mogli bi biti potencijalno mesto delovanja u razvoju strategije borbe protiv bakterijskih biofilmova.

## **2. Ekspresija gena specifičnih za biofilm (biofilm fenotip)**

Vezivanjem za površinu kod bakterija dolazi do izmenjene ekspresije gena u odnosu na planktonsku populaciju, što je od presudnog značaja za proces formiranja biofilma i njegovu struktturnu i funkcionalnu organizaciju. *Pseudomonas aeruginosa* pokazuje *up*-regulaciju gena *algC* tokom minuta od adhezije na čvrstu površinu. Ovaj gen kontroliše enzim *phosphomannomutase* koji je uključen u sintezu egzopolisaharida *alginate*. *Pseudomonas aeruginosa* u biofilmu prosečno za četiri puta povećava transkripciju *algC* gena u poređenju sa planktonskim ćelijama. Prigent-Combaret i sar. (1999) su kod biofilm vezanih ćelija *Escherichia coli* ustanovili smanjenu sintezu flagelina i povećanu produkciju jednog egzopolisaharida - kolanične kiseline (*colanic acid*). Becker i sar. (2002) su kod ćelija *Staphylococcus aureus*-a u biofilmu potvrdili *up*-regulaciju četiri gena koji kodiraju sintezu enzima uključenih u glikolizu ili fermentaciju. Pretpostavka je da *up*-regulacija nastaje zbog deficitita kiseonika u biofilmu, čime se favorizuju procesi fermentacije. Hausner i Wuertz (1999) ističu da je jedna od važnih prednosti života u biofilmu ubrzana vrednost konjugacije koja je potpomognuta fizičkom blizinom ćelija. Biofilm je perfektn milje za horizontalni transfer genetičkog materijala i nastanak patogena sa novim faktorima virulencije i rezistencijom na antibiotike.

## **3. Povećana rezistencija bakterija u biofilmu**

Važna prednost života u biofilmu je povećana otpornost bakterija na antibiotike i dezinficijense. Kako navode Mah i O'Toole (2001), bakterije u biofilmu pokazuju za 10-1000 puta veću rezistenciju na efekat antimikrobnih agenasa uključujući i antibiotike, a Donlan and Costerton (2002) izveštavaju o izvanrednoj biofilm rezistenciji na baktericidni efekat jona metala kao što su bakar i srebro. U radovima i revijama na temu biofilm rezistencije autora Costerton i sar. (1999), Lewis (2001), Mah i O'Toole (2001), Maira-Litran i sar. (2000), moguće je naći listu faktora koji se razmatraju kao odgovorni. Oni uključuju smanjen prodor antimikrobnih sredstava u biofilm, smanjenu brzinu (vrednost) rasta i ekspresiju mogućih gena rezistencije.

Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) leka je ona koncentracija koja rezultira smanjenjem broja živih bakterija  $\leq 99,9\%$  preko noći u okolnostima rasta i praktično je rezonovanje da je ubijanje većine patogena isto tako dobro kao i ubijanje svih. Preostale perzistere treba da eliminiše imunološki sistem. Perzistirajuće bakterije će postati problem *in vivo* samo u slučajevima kada imunološki sistem nije operativan. Costerton i sar. (1999) smatraju da su perzisteri u biofilmu potpuno zaštićeni fizičkom barijerom matriksa od efektora imunološkog sistema organizma domaćina, tj. ekstracelularna polimerična supstancija štiti bakterije biofilma od opsonizacije i fagocitoze. Kada se prekine terapija, perzisteri će ponovo formirati biofilm koji će proizvoditi nove planktonske ćelije, a one vratiti simptome bolesti. Sa obzirom da je za obnovu biofilma uništenog antibakterijskim sredstvom dovoljno manje od 1% početne populacije, „žilavost“ biofilmova postaje jasnija. Biofilm infekcije se zato upoređuju sa infekcijama planktonskim ćelijama u odsustvu imunog odgovora.

Bakterijski biofilmovi su nađeni na mnogim medicinskim uređajima, uključujući intravenozne katetere, medicinske implantate, kontaktna sočiva, intraokularna sočiva, materijal za šivenje i druga pomoćna medicinska sredstva. Mah i O'Toole (2001) navode da je 65% nozokomijalnih infekcija vezano za bakterijske biofilmove, a Zegans (2002) da je oko 56% kornealnih ulkusa (u USA) direktna posledica nošenja kontaktnih sočiva. Biofilmovi su odgovorni za bolesti čija je delimična lista prikazana u Tabeli 1.

**Tabela 1:** Neke infekcije/oboljenja ljudi izazvane bakterijama koje formiraju biofilm

Infekcije, obolenja	Bakterijske vrste u biofilmu
Zubni karies	Gram pozitivne koke
Periodontitis	Gram-negativna anaerobna oralna flora
Otitis media	Sojevi <i>Haemophylus influenzae</i>
Koštano-mišićne infekcije	Gram-pozitivne koke
Infekcije žučnih puteva	Enterične bakterije ( <i>E. coli</i> )
Osteomyelitis	Različite bakterijske i glijivice vrste
Prostatitis	<i>E. coli</i> i druge gram-negativne bakterije
Endocarditis	<i>Streptococcus spp. grupe viridans</i>
Cystic fibrosis pneumonia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> i <i>Burkholderia cepacia</i>
Nozokomijalne infekcije (upotreba pomoćnih medicinskih uređaja)	
Pneumonije (odelenja intenzivne nege)	Gram-negativni štapići
Infekcije rana (ušivanje)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Infekcija očiju (kontaktna sočiva)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> i gram pozitivne koke
Urinarne infekcije (kateterizacija)	<i>Escherichia coli</i> i druge gram-negativne vrste
Peritonitis (peritonealna dijaliza)	Različite vrste bakterija i glijivica
Intrauterine infekcije (prenete instrumentima)	<i>Actinomyces israelii</i> i druge vrste

Entotrahealna intubacija	Različite vrste bakterija i plesni
Centralni venski kateteri	<i>S. epidermidis</i> i druge vrste
Mehaničke srčane valvule	<i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>
Ortopedske intervencije	<i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>

Costerton 2001.

Za neke infekcije životinja se takođe smatra da su u osnovi izazvane bakterijskim biofilmovima: mastitis (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*), pneumonija (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*), abscesi jetre (*Fusobacterium necrophorum*), limfadenitis (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Streptococcus* spp.), enteritis (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp.) i infekcije rana (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Melchior i sar. (2006) smatraju da je slab efekat primene antibiotika u lečenju infekcija mlečne žlezde izazvanih *Staphylococcus aureu*-om, u vezi sa sposobnošću ove bakterije da formira biofilm. Mikroskopski pregled tkiva mlečne žlezde kod akutne i hronične infekcije sa *Staphylococcus aureus* pokazuje da su ove bakterije locirane na epitelnim ćelijama u alveolama i mlečnim kanalima u formi nakupina, grozdova, a ove bakterijske aglomeracije mogu da se zapaze već 24 h posle intramamarne infekcije. Vaseduvan i sar. (2003) su kod sojeva *Staphylococcus aureus* izolovanih iz mleka krava sa mastitisom ustanovili visoku prevalenciju gena koji su neophodni za formiranje biofilma.

Poslednje dve decenije istraživački naporci usmereni su na razvoj strategije kontrole i prevencije formiranja biofilma i razvoj novih metoda za procenu efikasnosti antibakterijskih tretmana. Visoke doze antimikrobnih agenasa potrebne za uklanjanje biofilm vezanih bakterija iz okruženja su nepoželjne i nisu u saglasnosti sa propisima o zaštiti životne sredine, kao što su i medicinski neprihvatljive, jer bi primena doze potrebne za ubijanje biofilm-bakterija bilo ubijanje pacijenta. Zbog toga se nove strategije zasnivaju na boljem razumevanju bakterijskog vezivanja, rasta i odvajanja od supstrata i hitno su potrebne medicini i većini industrija (<http://www.erc.montana.edu>).

## LITERATURA

1. Becker P., Hufnagle W., Peters G., Herrmann M., Detection of different gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis, *Appl Environ Microbiol*, 67, 2958-65, 2002.
2. Carpentier B. and Cerf O., Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry, *J Appl Bacteriol*, 75, 499-511, 1993.
3. Costerton JW., Geesey GG., Cheng KJ., How bacteria stick, *Sci Am*, 238, 86-95, 1978.

4. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Koreber D.R., Lappin-Scott H.M., Microbial biofilms, *Annu Rev Microbiol*, 49, 711-45, 1995.
5. Costerton JW., Stewart PS., Greenberg EP., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284, 1318-22, 1999.
6. Costerton JW., Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection, *TRENDS in Microbiology*, 9, 2, 50-3, 2001.
7. Deibel V. and Schoeni J., Biofilms: Forming a Defense Strategy for the Food Plant, *Food Safety magazine*, 2003, Izvor: <http://www.foodsafetymagazine.com>.
8. Donlan R.M. and Costerton J.W., Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2, 167-93, 2002.
9. Dunne Jr W.M., FOCUS, Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2, 155-66, 2002.
10. Hausner M. and Wuertz S., High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis, *Appl Environ Microbiol*, 65, 3710-3, 1999.
11. Lawrence J.R., Korber D.R., Hoyle B.D., Costerton J.W., Caldwell D.E., Optical sectioning of microbial biofilms, *J Bacteriol*, 173, 6558-67, 1991.
12. Lewis K., MINIREVIEW Riddle of Biofilm Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 4, 999-1007, 2001.
13. Mah T.F.C. and O'Toole G., Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *TRENDS in Microbiology*, 9, 1, 34-9, 2001.
14. Maira-Litran T., Allison D.G., Gilbert P., An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multi-drug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms, *J Antimicrob Chemother*, 45, 789-95, 2000.
15. Marshall K.C., Stout R., Mitchell R., Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces, *Journal of General Microbiology*, 68, 337-48, 1971.
16. McEldowney S. and Fletcher M., Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surface, *Arch Microbiol*, 148, 57-62, 1987.
17. Melchior M.B., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J., Biofilms: A role in recurrent mastitis infections?, *The Veterinary Journal*, 171, 398-407, 2006.
18. Mittelman M.W., Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations, *J Dairy Sci*, 81, 2760-4, 1998.
19. Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C., Lejeune P., Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 181, 5993-6002, 1999.
20. Tolker-Nielsen T., Molin S., Spatial organization of microbial biofilm communities, *Microb Ecol*, 40, 75-84, 2000.
21. Trachoo N., Biofilms and the food industry, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 25, 6, 807-15, 2003.

22. Vaseduvan P., Nair M.L., Annamalia T., Venkitanarayanan K.S., Phenotypic and genotypic characterisation of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation, *Veterinary Microbiology*, 92, 179-85, 2003.
23. Watnick P, Kolter R, 2000, Biofilm, City of Microbes, *Journal of Bacteriology*, 182, 10, 2675-9.
24. Zegans M., The role of bacterial biofilms in ocular infections, *DNA and Cell Biology*, 21, 5-6, 415-20, 2002.

Primljeno: 02.02.2009.

Odobreno: 03.03.2009.



# Rezultati ispitivanja raširenosti BVDV infekcije u velikim i malim zapatima goveda na području Južnobačkog i Sremskog okruga

Tamaš Petrović,<sup>1\*</sup> Sava Lazić,<sup>1</sup> Diana Lupulović,<sup>1</sup> Dejan Bugarski,<sup>1</sup>  
Bosiljka Đuričić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Rumenački put 20, Novi Sad

<sup>2</sup>Fakultet veterinarske medicine, Bul. oslobođenja 18, 11000 Beograd

## Kratak sadržaj

Bovina virusna dijareja (BVD) je virusno oboljenje goveda koje je značajno rašireno u celom svetu. Procenat seropozitivnih jedinki, naročito u zemljama sa intenzivnim stočarstvom se kreće od 60-90%. Na našim epizootiološkim područjima, kao i onim u okruženju, ova infekcija je prvi put opisana od strane Đuričkovića i saradnika 1966. godine na osnovu kliničke slike i patomorfološkog nalaza, a serološki je potvrđena od strane Cvetnića i saradnika 1968. godine. U poslednjih nekoliko godina je izvršen veći broj seroloških ispitivanja prisustva BVDV infekcije na našim područjima. Radi utvrđivanja raširenosti BVDV infekcije u velikim i malim zapatima na području Južnobačkog i Sremskog okruga, tokom 2004. godine su sprovedena ispitivanja prisustva virus neutralizacionih antitela u krvnim serumima priplodnih mlečnih goveda starijih od 6 meseci. U tu svrhu je od goveda iz malih zapata ispitano 7577 uzoraka krvnih serumi, od čega 3457 uzoraka potiču od goveda iz Južnobačkog (26,31% ukupne populacije iz svih 9 opština), a 4120 uzoraka potiče od goveda iz Sremskog okruga (25,17% ukupne populacije iz svih 8 opština). Ispitivanjem su na ovaj način obuhvaćene životinje iz svih naseljenih mesta (156) na ispitivanom području. Iz velikih zapata goveda je ispitano 3019 uzoraka krvnih serumi, od čega 2721 uzoraka potiču od goveda iz 18 velikih zapata Južnobačkog (38,65% ukupne populacije u zapatima), a 298 uzoraka potiče od goveda iz 4 velika zapata Sremskog okruga (29,22% ukupne populacije u zapatima). Ispitivanjima su na ovaj način obuhvaćene životinje iz svih 22 velikih zapata na tom području. Virus neutralizacioni test (VN) je izvođen po standardnoj proceduri opisanoj u "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals" Office International des Epi-

\* e-mail: tomy@niv.ns.ac.yu

zooties (2004), uz korišćenje manjih modifikacija. Za izvođenje testa je upotrebljen NADL soj BVD virusa i kultura ćelija MDBK. Serum su ispitivani u dvostrukim razređenjima od 1:2 do 1:512. Prisustvo virus neutralizacionih antitela za NADL soj BVDV je ustanovljen u 1833 (24,19%) uzoraka iz malih zapata goveda. Od ovog broja, u Južnobačkom okrugu je utvrđeno 1082 (31,30%), a u Sremskom okrugu 751 (18,53%) seropozitivnih životinja. Najveći procenat seropozitivnih životinja u Južnobačkom okrugu je utvrđen u opštini Titel (68,07%), a najmanji u opštini Bački Petrovac (6,63%), dok je u Sremskom okrugu najveći procenat seropozitivnih životinja utvrđen u opštini Beočin (34,16%), a najmanji u opštini Irig (7,62%). Posmatrajući po naseljenim mestima, procenat seropozitivnih životinja na BVD virus se kretao od 0%, odnosno gde nisu utvrđene seropozitivne životinja, do 86,67% (Krnjčevci). Prisustvo virus neutralizacionih antitela za NADL soj BVDV je ustanovljen u 1667 (55,22%) uzoraka iz velikih zapata goveda. Od ovog broja, u velikim zapatima sa područja Južnobačkog okruga je utvrđeno 1500 (55,13%), a u velikim zapatima sa područja Sremskog okruga 167 (56,04%) seropozitivnih životinja. Prevalenca seropozitivnih životinja u velikim zapatima sa područja Južnobačkog okruga je varirala od 0% (5 velikih zapata) do 96,61%. Visoka prevalenca (70%) je utvrđena u 7 od 18 ispitanih zapata. Prevalenca seropozitivnih životinja u velikim zapatima sa područja Sremskog okruga je varirala od 0% (1 veliki zapat) do 96,96%. Visoka prevalenca (70%) je utvrđena u 2 od 4 ispitanih zapata. Ustanovljene varijacije u procentu seropozitivnih životinja u pojedinim područjima i zapatima goveda su verovatno bila rezultat porekla životinja i načina poslovanja, odnosno kretanja životinja u zapatu u smislu, pre svega uvođenja novih grla u zapat, a samim tim unošenja virusa i izbijanja učestalih BVDV infekcija u njima. Titar VN antitela se kod jednog broja životinja, naročito u pojedinim područjima i zapatima kretao do i preko 1:512 što je direktno ukazivalo na trenutno ili skorašnje prisustvo BVDV infekcije u njima. Utvrđen visok procenat seropozitivnih životinja (70%) u 9 velikih zapata goveda je verovatno rezultat nekontrolisanog kretanja životinja, unošenja BVD virusa i učestalog izbijanja BVDV infekcije u tim zapatima, a istovremeno ukazuje I na verovatno prisustvo perzistentno inficiranih jedinki u tim zapatima. Dobijeni rezultati ispitivanja ukazuju na značajnu raširenost BVD infekcije na ispitanim područjima. Istovremeno, ova raširenost nije ujednačena, ukazujući na postojanja područja u kojima infekcija nije prisutna ili je prisutna samo sporadično.

Ključne reči: BVDV, VN test, seroprevalenca

## Abstract

Bovine viral diarrhoea (BVD) is a worldwide viral cattle disease. Percentage of seropositive animals, especially in the countries with intensive cattle breeding ranges from 60-90%. This infection on our epizootiology area, as well as on area in our surrounding, was for the first time described by Đuričković et al. (1966) based on clinical pictures and pathomorphological findings. This was proved by antibody detection by

Cvetnić et al. (1968). In the last few years a large number of serology examination was done on the presence of BVDV infection in our area. In 2004 an examination on virus neutralisation antibodies in sera of breeding dairy cattle older than 6 months was carried for the purpose of determining the prevalence of BVDV infection in large and small herds in Southern Bačka and Srem districts. There were 7577 sera samples from small herds, out of which 3457 were from Southern Bačka (26.31% out of total population in all 9 municipalities), and there were 4120 samples from Srem district (25.17% out of total population in all 8 municipalities). The examination included the animals from all settlements (156). From large cattle herds there were 3019 sera samples, out of which 2721 were from 18 large farms in Southern Bačka (38.65% out of total population), and 298 from 4 large farms in Srem district (29.22% out of total population). This examination encompassed animals from 22 large farms on this area. Virus neutralisation test (VN) was carried out according to the standard procedure described in "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals" Office International des Epizooties (2004) with slight modifications. For test NADL strain of BVD virus and MDBK cell culture were used. The sera were examined in double dilution from 1:2 to 1:512. Virus neutralisation antibodies for NADL strain BVDV were detected in 1833 (24.19%) in the samples from small herds. Out of this number there were 1082 (31.30%) seropositive animals from Southern Bačka and 751 (18.53%) from Srem district. The largest number of seropositive animals in Southern Bačka district were detected in Titel municipality (68.07%) and the lowest in Bački Petrovac municipality (6.63%). In Srem district the largest number of seropositive animals was in Beočin municipality (34.16%) and the lowest in Irig municipality (7.62%). When comparing all the settlements, the percentage of BVDV seropositive animals ranged from 0% (i.e. settlements with no seropositive animals) up to 86.67% (Krњeševci). Virus neutralisation antibodies for BVDV NADL strain were detected in 1667 (55.22%) samples from large cattle herds. Out of this number there were 1500 (55.13%) seropositive animals from Southern Bačka, and 167 (56.04%) seropositive animals from Srem district. The prevalence of seropositive animals in large herds from Southern Bačka district ranged from 0% (5 large herds) up to 96.61%. High prevalence (70%) was detected in 7 out of 18 examined herds. The prevalence of seropositive animals originating from large herds in Srem district ranged from 0% (1 large herd) to 96.96%. High prevalence (70%) was detected in 2 out of 4 examined herds. Detected variation in the percentage of seropositive animals in some areas and herds most probably is the result of animal origin and management on the farms, i.e. movement of animals with introduction of new animals into a herd, what also means that the virus enters into a herd and outbreaks of BVDV infection occur. The titre of VN antibodies in a certain number of animals, especially on certain areas and in some herds ranged up to 1:512 and even more, what was a clear indication of current or recent presence of persistently infected animals in these herds. High percentage of seropositive animals (70%) in 9 large herds most probably is the result of uncontrolled animal movement, entering of BVD virus and frequent outbreaks of

BVDV infections in these herds, but this also indicates probable presence of persistently infected animals in the herds. The obtained results point on high prevalence of BVD infection in the examined area. This prevalence is not equal, what point on existence of areas where the infection is not present, or is present only sporadically.

Key words: BVDV, VN test, seroprevalence

## UVOD

Bovina virusna dijareja - bolest sluznica (BVD/MD) je virusno oboljenje goveda koje je značajno rašireno u celom svetu, a postaje i sve značajnije oboljenje za naše stočarstvo. U razvijenim zemljama procenat serološki pozitivnih goveda se kreće između 60-90%. Ova virusna infekcija predstavlja stalnu nepoznanicu kako za veterinarne kliničare, tako i naučne radnike i ako je prošlo više decenija od prvog opisa oboljenja od strane Olafsona i saradnika 1946. godine.

Uzročnik bolesti je jedan od najmanjih RNA virusa, svrstan u rod *Pestivirusus* i familiju *Flaviviridae*. Shodno promenama koje izaziva na kulturi ćelija, virus se javlja u dva biotipa: nacitopatogenom (ncp) i citopatogenom (cp). Necitopatogeni biotip virusa je „normalna” forma virusa u kojoj je on zastupljen u prirodi, dok se za cp biotip smatra da nastaje mutacijom iz ncp virusa u perzistentno inficiranoj (PI) životinji. Do sada je poznato da se BVD virus javlja u dva genotipa: BVDV-I i BVDV-II. Genotip II BVD virusa je dijagnostikovan krajem 80-tih i početkom 90-tih godina. Necitopatogeni sojevi ovog genotipa BVD virusa uzrokuju teže kliničke simptome sa izraženim krvarenjima i većim mortalitetom inficiranih životinja u odnosu na one koje izazivaju sojevi BVDV I genotipa.

Najznačajniji izvor infekcije su perzistentno inficirana i bolesna goveda, a mogu biti i druge prijemčive vrste. Infekcija BVD virusom, osim kod goveda, javlja se kod ovaca, svinja, koza i divljih preživara. Između goveda, ovaca i svinja zabeležene su i unakrsne infekcije. Ove životinje mogu biti i rezervoari virusa, a samim tim i izvor infekcije. Infekcija ljudi BVD virusom je povezana sa malformacijama novorođenčadi, pre svega u vidu mikroencefalije, kao i neobjašnjеним prolivima kod dece.

Infekcija BVD virusom se karakteriše širokim spektrom kliničkih manifestacija uključujući: subkliničku infekciju, prolaznu groznicu, goveđu virusnu dijareju, leukopeniju i imunosupresiju, respiratorne poremećaje, pad mlečnosti, izostanak i smanjenu koncepciju plotkinja, probleme upornog povadjanja, rani embrionalni mortalitet, dugi servis periodi, rađanja mrtve teladi sa kongenitalnim malformacijama, abortuse i mumifikacije, imunotoleranciju i perzistentnu infekciju, kao i akutnu i hroničnu bolest sluznica. Najveće štete koje BVDV infekcija nanosi govedarstvu su direktnе posledice transplacentarne infekcije, kao rezultat fetalnih uginuća, kongenitalnih malformacija, neonatalnog i postnatalnog mortaliteta uključujući i bolest sluznica, slab rast i performanse preživelih životinja (Roeder i Harkness, 1986). Ekonomski gubici prouzrokovani BVDV infekcijom mogu se ispoljavati u zapatu goveda i nekoliko godina nakon infekcije. Iz svega iznetog

proističe značaj koji BVD ima u stočarstvu, naime BVDV infekcija se smatra trećom bolesti po ekonomskom značaju u govedarstvu odmah iza kuge goveda i slinavke i šap.

U poslednjih nekoliko godina je izvršen veći broj seroloških ispitivanja prisustva BVDV infekcije na našim područjima. U periodu od 1999. do 2001. godine izvršena su prva preliminarna ispitivanja prisustva virus neutralizacionih (VN) antitela za BVDV u krvnim serumima goveda sa područja Južnobačkog i Sremskog okruga. Ispitivanjem prisustva VN antitela za BVD virus u krvnim serumima priplodnih goveda starijih od 6 meseci, ustanovljeno je prisustvo BVDV infekcije na celom epizootiološkom području Južnobačkog i Sremskog okruga. Prisustvo VN antitela za NADL soj BVDV je ispitano u 2657 krvnih serumima, pri čemu je pozitivan rezultat ustanovljen u 1354 (50,96%) uzoraka. Od ukupno ispitanih, 2076 uzoraka krvnih serumi je poticalo od goveda iz 13 zapata u farmskom, a 581 uzorak je bio poreklom od goveda u individualnom načinu držanja sa područja 7 opština (Petrović, 2002). Sprovedena ispitivanja u ovom radu su sprovedena sa ciljem utvrđivanja stvarne prevalence BVDV infekcije i u velikim i u malim zapatima na celokupnom području Južnobačkog i Sremskog okruga, kao i eventualnih promena u prevalenci u odnosu na ispitivanja sprovedena nekoliko godina ranije.

## MATERIJAL I METODI RADA

Radi utvrđivanja raširenosti BVDV infekcije kod priplodnih mlečnih goveda iz malih zapata individualnog (pojedinačnog) držanja sa područja Južnobačkog i Sremskog okruga sprovedena su ispitivanja prisustva virus neutralizacionih antitela u njihovim krvnim serumima. Na ovim područjima se, po statističkom godišnjaku (2004) i podacima kojima smo raspolagali, nalazi približno 29675 grla. U toku 2004. godine je prikupljeno 7577 uzoraka krvnih serumi priplodnih mlečnih goveda starijih od 6 meseci ili 25,68% ukupne populacije. Od ovog broja 3457 uzoraka potiče od goveda iz malih zapata Južnobačkog (26,31% ukupne populacije iz svih 9 opština), a 4120 uzoraka potiče od goveda iz malih zapata Sremskog okruga (25,17% ukupne populacije iz svih 8 opština). Ispitivanjem su na ovaj način obuhvaćene životinje iz svih naseljenih mesta (156) na ispitivanom području.

Radi utvrđivanja raširenosti BVDV infekcije kod priplodnih mlečnih goveda iz velikih zapata farmskog načina držanja sa područja Južnobačkog i Sremskog okruga, sprovedena su ispitivanja prisustva virus neutralizacionih antitela u njihovim krvnim serumima. U ispitanim zapatima na navedenim područjima se po podacima kojima smo raspolagali, nalazi približno 8060 grla starijih od 6 meseci. U toku 2004. godine je prikupljeno 3019 uzoraka krvnih serumi priplodnih mlečnih goveda starijih od 6 meseci ili 37,46% ukupne populacije. Od ovog broja 2721 uzoraka potiče od goveda iz 18 velikih zapata Južnobačkog (38,65% ukupne populacije u zapatima), a 298 uzoraka potiče od goveda iz 4 velika zapata Sremskog okruga (29,22% ukupne populacije u zapatima). Ispitivanjem su obuhvaćene životinje iz svih većih zapata goveda (22) na ispitivanom području.

Virus neutralizacioni test (VN) je izvođen po standardnoj proceduri opisanoj u "Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals" Office International des Epizooties (2004), uz korišćenje manjih modifikacija. Za izvođenje testa je upotrebljen NADL soj BVD virusa i kultura ćelija MDBK. Serum su ispitivani u dvostrukim razređenjima od 1:2 do 1:512.

## REZULTATI RADA

### Seroprevalenca BVDV infekcije u malim zapatima goveda

Prisustvo virus neutralizacionih antitela protiv NADL soja BVDV ustanovljeno je u 1833 (24,19%) uzorka. Od ovog broja u Južnobačkom okrugu je utvrđeno 1082 (31,30%), a u Sremskom okrugu 751 (18,53%) seropozitivnih životinja. Rezultati ovih ispitivanja su prikazani u tabeli 1.

Tabela 1: Rezultati ispitivanja prisustva VN antitela protiv BVDV u uzorcima krvnih serumi priplodnih mlečnih goveda iz malih zapata.

Okrug	Broj životinja na području	Br. isptanih životinja	% isptanih životinja	Br. pozitivnih životinja	Procenat pozitivnih
Južnobački	13305	3457	26,31%	1082	31,30%
Sremski	16370	4120	25,17%	751	18,23%
Ukupno	29675	7577	25,68%	1833	24,19%

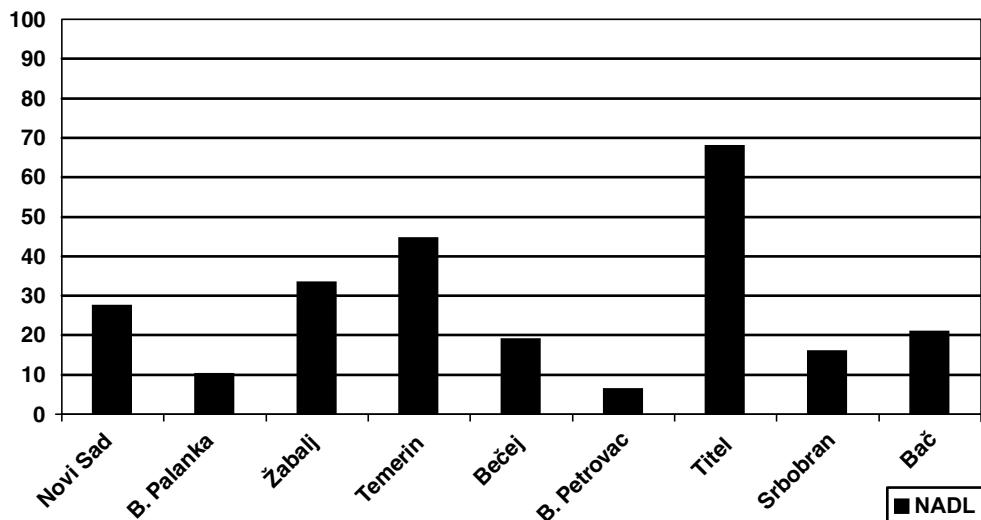
U uzorcima krvnih serumi goveda iz malih zapata sa područja Južnobačkog okruga prisustvo VN antitela je utvrđeno kod 1082 (31,30%) životinja. Najveći procenat seropozitivnih životinja u Južnobačkom okrugu je utvrđen na području opštine Titel (68,07%), a najmanji na području opštine Bački Petrovac (6,63%). Posmatrajući po naseljenim mestima, procenat seropozitivnih životinja na BVD virus se kretao od 0%, odnosno gde nisu utvrđene seropozitivne životinja (8 naselja), do 74,50% (Lok). Ovi rezultati nisu prikazani. Rezultati ispitivanja prisustva VN antitela kod životinja na području pojedinih opština Južnobačkog okruga su prikazana u tabeli 2 i grafikonu 1.

Tabela 2: Utvrđena prevalenca seropozitivnih životinja u malim zapatima goveda na NADL soj BVDV po opštinama u Južnobačkom okrugu

Opština	Broj životinja na području	Br. isptanih životinja	% isptanih životinja	Br. pozitivnih životinja	Procenat pozitivnih
Novi Sad	2053	710	34,58%	195	27,46%
Bačka Palanka	2208	578	26,18%	59	10,21%
Žabalj	2823	304	10,77%	102	33,55%
Temerin	382	121	31,68%	54	44,63%
Bečej	1655	433	26,16%	83	19,17%

<b>Bački Petrovac</b>	493	166	33,67%	11	6,63%
<b>Titel</b>	2513	736	29,29%	501	68,07%
<b>Srbobran</b>	651	181	27,80%	29	16,02%
<b>Bač</b>	527	228	43,26%	48	21,05%
<b>Ukupno</b>	13305	3457	26,31%	1082	31,30%

Grafikon 1: Procenat seropozitivnih životinja u malim zapatima goveda na NADL soj BVDV po opština sa područja Južnobačkog okruga



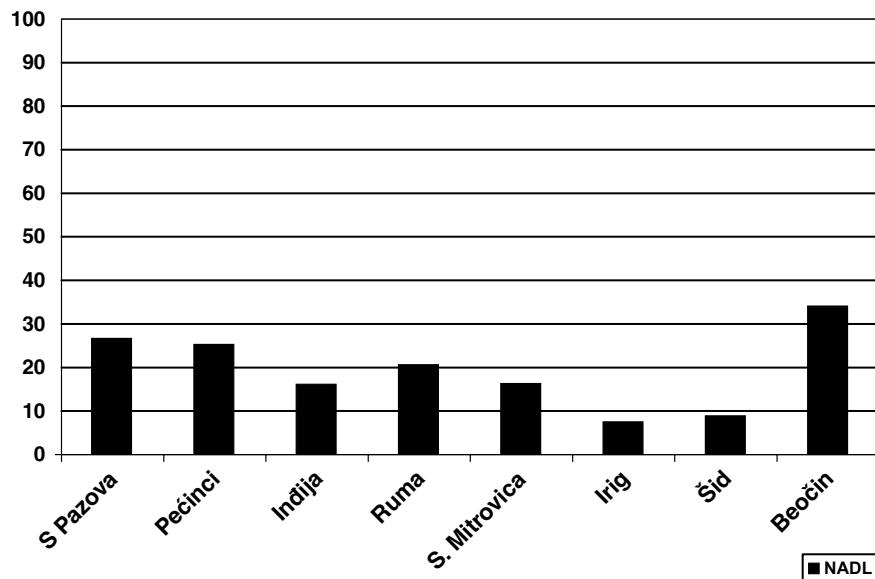
U uzorcima krvnih seruma goveda iz malih zapata sa područja Sremskog okruga prisustvo VN antitela je utvrđeno kod 751 (18,23%) životinja. Najveći procenat seropozitivnih životinja u Sremskom okrugu je utvrđen na području opštine Beočin (34,16%), a najmanji na području opštine Irig (7,62%). Posmatrajući po naseljenim mestima, procenat seropozitivnih životinja na BVD virus se kretao od 0%, odnosno gde nisu utvrđene seropozitivne životinja (18 naselja), do 86,67% (Krnjčevci). Ovi rezultati nisu prikazani. Rezultati ispitivanja prisustva VN antitela kod životinja na području pojedinih opština su prikazana u tabeli 3 i grafikonu 2.

Tabela 3: Utvrđena prevalenca seropozitivnih životinja u malim zapatima goveda na NADL soj BVDV po opština u Sremskom okrugu

Opština	Broj životinja na području	Br. ispitanih životinja	% ispitanih životinja	Br. pozitivnih životinja	Procenat pozitivnih
<b>Stara Pazova</b>	1917	302	15,75%	81	26,82%
<b>Pećinci</b>	2896	623	21,51%	157	25,20%
<b>Indija</b>	2369	366	15,45%	59	16,12%
<b>Ruma</b>	2872	703	24,48%	144	20,48%

<b>Sremska Mitrovica</b>	3093	776	25,09%	126	16,24%
<b>Irig</b>	1139	564	49,52%	43	7,62%
<b>Šid</b>	1105	505	45,70%	45	8,91%
<b>Beočin</b>	979	281	28,70%	96	34,16%
<b>Ukupno</b>	<b>16370</b>	<b>4120</b>	<b>25,17%</b>	<b>751</b>	<b>18,23%</b>

Grafikon 2: Procenat seropozitivnih životinja u malim zapatima goveda na NADL soj BVDV po opština sa područja Sremskog okruga



### Seroprevalenca BVDV infekcije u velikim zapatima goveda

Prisustvo virus neutralizacionih antitela protiv NADL soja BVDV je ustanovljeno kod 1667 (55,22%) uzorka. Od ovog broja, u Južnobačkom okrugu je utvrđeno 1500 (55,13%), a u Sremskom okrugu 167 (56,04%) seropozitivnih životinja. Rezultati ovih ispitivanja su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4: Rezultati ispitivanja prisustva VN antitela protiv NADL soja BVDV u uzorcima krvnih serumi priplodnih mlečnih goveda iz velikih zapata goveda

Veliki zapati goveda	Broj zapata	Broj životinja u zapatu	Br. ispitanih životinja	Br. pozitivnih životinja	Procenat pozitivnih
Južnobački okrug	18	7040	2721	1500	55,13%
Sremski okrug	4	1020	298	167	56,04%
<b>Ukupno</b>	<b>22</b>	<b>8060</b>	<b>3019</b>	<b>1667</b>	<b>55,22%</b>

Ispitivanjem raširenosti BVDV infekcije kod priplodnih mlečnih goveda iz velikih zapata sa područja Južnobačkog okruga su obuhvaćene životinje iz 18 velikih zapata.

Prisustvo specifičnih antitela protiv NADL soja BVD virusa je ispitano kod 2721 grla ili 38,65% ukupne populacije, pri čemu su ona utvrđena kod 1500 (55,13%) životinja. Posmatrajući po pojedinim zapatima, procenat seropozitivnih životinja se kretao od 0%, odnosno gde nisu utvrđene seropozitivne životinja (5 zapata: A, Ć, G, K i N), do 96,61% (zapat Đ). Rezultati ovih ispitivanja su prikazani u tabeli 5.

Tabela 5: Rezultati ispitivanja prisustva VN antitela protiv NADL soja BVDV u uzorcima krvnih seruma priplodnih mlečnih goveda iz velikih zapata sa područja Južnobačkog okruga

Opština	Veliki zapat	Br. životinja u zapatu	Br. ispitanih životinja	Br. pozitivnih životinja	Procenat pozitivnih
Novi Sad	A	170	138	0	0%
	B	440	195	39	20,00%
	C	170	169	163	96,45%
Bačka Palanka	Ć	500	146	0	0%
	Č	140	46	10	21,74%
	D	170	107	32	29,91%
	Đ	200	118	114	96,61%
	Dž	150	66	8	12,12%
	E	230	161	113	70,19%
	F	230	124	103	83,07%
Žabalj	G	340	60	0	0%
Temerin	H	140	121	54	44,63%
Bečeј	I	1400	238	208	87,39%
	J	1400	582	521	89,52%
Bački Petrovac	K	500	68	0	0%
Titel	L	250	159	132	83,02%
Srbobran	M	170	55	3	5,45%
Bač	N	440	168	0	0%
<b>Ukupno</b>	<b>18</b>	<b>7040</b>	<b>2721</b>	<b>1500</b>	<b>55,13%</b>

Ispitivanjem raširenosti BVDV infekcije kod priplodnih mlečnih goveda iz velikih zapata sa područja Sremskog okruga su obuhvaćene životinje iz 4 velika zapata. Prisustvo specifičnih antitela protiv NADL soja BVD virusa je ispitano kod 298 grla ili 29,22% ukupne populacije, pri čemu su ona utvrđena kod 167 (56,04%) životinja. Posmatrajući po pojedinim zapatima, procenat seropozitivnih životinja se kretao od 0%, odnosno gde nisu utvrđene seropozitivne životinja (zapat O), do 96,96% (zapat R). Rezultati ovih ispitivanja su prikazani u tabeli 6.

Tabela 6: Rezultati ispitivanja prisustva VN antitela protiv NADL soja BVDV u krvnim serumima priplodnih mlečnih goveda iz velikih zapata sa područja Sremskog okruga

Opština	Veliki zapat	Br. život. u zapatu	Br. ispitanih životinja	Br. pozitiv. životinja	Procenat pozitivnih
Stara Pazova	0	580	50	0	0%
Indija	P	170	89	14	15,73%
Sremska Mitrovica	Q	170	93	89	95,70%
Šid	R	100	66	64	96,96%
<b>Ukupno</b>	<b>4</b>	<b>1020</b>	<b>298</b>	<b>167</b>	<b>56,04%</b>

## DISKUSIJA

Ispitivanjem raširenosti BVDV infekcije kod priplodnih mlečnih goveda iz malih zapata sa područja Južnobačkog i Sremskog okruga, utvrđeno je prisustvo VN antitela kod 1833 (24,19%) od 7577 ispitanih uzoraka krvnih seruma. Broj ispitanih životinja predstavlja 25,68% ukupne populacije goveda u malim zapatima na analiziranom području. Pri ispitivanju je naročito vođeno računa o zastupljenosti svih delova ispitanih područja i o statističkoj značajnosti veličine uzorka. Ispitivanjem su na ovaj način obuhvaćene životinje iz svih naseljenih mesta (156) na ispitivanim područjima.

Posmatrajući stanje po područjima, u Južnobačkom je utvrđeno 1082 (31,30%), a u Sremskom okrugu 751 (18,53%) seropozitivnih životinja u malim zapatima goveda. Utvrđena neujednačenost je naročito izražena ukoliko se raširenost BVDV infekcije, odnosno prisustvo serološki pozitivnih životinja posmatra na nivou pojedinih opština i naselja na ispitanim području. Na području Južnobačkog okruga prisustvo serološki pozitivnih životinja je utvrđeno na području svih opština ali je prevalenca bila neujednačena i kretala se od 6,63% u opštini Bački Petrovac do 68,07% u opštini Titel. Posmatrajući po naseljenim mestima, procenat seropozitivnih životinja na BVD virus se kretao od 0% do 74,50% (Lok). Na područjima pojedinih naseljenih mesta nije utvrđeno prisustvo serološki pozitivnih životinja. Pomenuta naseljene mesta su utvrđena na području opštine Bačka Palanka (Bačka Palanka, Parage, Mladenovo i Obrovac), opštine Novi Sad (Sremska Kamenica i Novi Ledinci), opštine Bečeј (Drljan) i opštine Bački Petrovac (Maglić).

Slični rezultati su dobijeni i na području Sremskog okruga. Prisustvo serološki pozitivnih životinja je utvrđeno na području svih opština. Najveći procenat seropozitivnih životinja je utvrđen na području opštine Beočin (34,16%), a najmanji na području opštine Irig (7,62%). Posmatrajući po naseljenim mestima, procenat seropozitivnih životinja na BVD virus se kretao od 0% do 86,67% (Krnjčevci). Naseljena mesta na čijim područjima nije utvrđeno prisustvo serološki pozitivnih životinja su se nalazila na celom području Sremskog okruga, odnosno u opštini Stara Pazova (Novi Banovci), opštini Pećinci (Šimanovci), opštini Indija (Indija, Ljukovo,

Čortanovci i Maradik), opštini Ruma (Putinci, Buđanovci i Platičevo), opštini Sremska Mitrovica (Salaš Noćajski i Mačvanska Mitrovica), opštini Irig (Irig i Mala Remeta), opštini Šid (Molovin, Bikić Do i Privina Glava) i opštini Beočin (Beočin i Rakovac).

Dobijeni rezultati ukazuju na nešto niži procenat seropozitivnih životinja na BVDV u malim zapatima goveda u odnosu na ispitivanja izvršena par godina ranije. Naime, u periodu od 1999. do 2001. godine izvršena su prva opsežnija ispitivanja prisustva VN antitela protiv BVDV u uzorcima krvnih serumu goveda sa područja Južnobačkog i Sremskog okruga. Tom prilikom je ustanovljeno prisustvo BVDV infekcije na celom epizootiološkom području Južnobačkog i Sremskog okruga. Procenat serološki pozitivnih, od ukupno ispitane 581 životinje u individualnom načinu držanja, se u zavisnosti od soja BVDV upotrebljenog za ispitivanje, kretao od 39,59% (230) na C24V soj BVDV do 45,96% (267) seropozitivnih na AD-8 soj BVDV. Kod životinja iz svih opština je ustanovljeno prisustvo serološki pozitivnih grla. Pri tome se procenat serološki pozitivnih životinja po opština kretao od približno 16% ispitanih životinja iz opštine B do 68,75% ispitanih životinja iz opštine F. Međutim, u najvećem broju opština procenat seropozitivnih grla se kretao između 30% i 50% (Petrović, 2002).

Prema ovakvim rezultatima ispitivanja se može smatrati da je BVDV infekcija široko rasprostranjena u individualnom načinu držanja životinja. Raširenost BVDV kod životinja u individualnom načinu držanja je verovatno rezultat prometa životinja kod individualnog proizvođača, odnosno uvođenja novih životinja nepregledanih na BVDV, kretanje životinja po sajmovima i kontakta životinja prilikom prirodnog pripusta. Do ovakvih podataka su došli i drugi autori (Ssentongo i sar. 1980; Bitsch i Ronsholt, 1995; Houe, 1995). Dobijeni rezultati nas navode na povezanost veće prevalence BVDV infekcije na područjima na kojima se nalazi veći broj velikih zapata goveda ili sa područjima gde se u individualnom držanju priplodni materijal većinom nabavlja iz velikih zapata goveda. Odnosno, rezultati ispitivanja krvnih serumu priplodnih goveda u individualnom načinu držanja direktno ocrtavaju područja u kojima su se životinje nabavljale iz zaraženih zapata farmskog načina držanja goveda.

Siroka rasprostranjenost BVDV infekcije u individualnom načinu držanja goveda na području Srbije je potvrđena i preliminarnim ispitivanjima drugih autora. U ispitivanjima Petrovića i sar. (2002) sprovedenim na Niškom i Južnomoravskom području, a koja su obuhvatila manji broj mlečnih krava (188) sa područja 9 opština, ustanovljeno je prisustvo serološkog odgovora na BVDV kod životinja iz 5 opština. Utvrđen procenat serološki pozitivnih životinja se kretao od 3,8% do 45% sa prosekom od 10,64%. Kod uzorka iz 4 opštine nije utvrđeno prisustvo specifičnih antitela za BVDV. I pored relativno niskog procenta serološki pozitivnih životinja, ovi rezultati ukazuju na značajnu raširenost BVDV infekcije na području juga Srbije. Nalaz samo serološki negativnih životinja na području nekih opština u ovom

ispitivanju može biti razlog malog broja ispitanih uzoraka ali i činjenice da se na tim prostorima ne nalaze veliki zapati goveda.

Dobijeni rezultati ispitivanja su u skladu i sa rezultatima do kojih su došli neki autori u drugim zemljama. Ukupna seroprevalenca ispitivanih životinja u 17 država Indije je bila 17,31% (76/439) (Sudharshana i sar. 1999). Ispitivanja Waage i sar. (1994) ukazuju da je u Norveškoj 15-20% mlečnih krava i 25-30% mlečnih zapata bilo izloženo infekciji BVD virusom. Takođe, utvrđene su značajne regionalne varijacije. Loken i sar. (1991) su ispitivanjem 1133 mlečne krave iz 187 zapata u Norveškoj, utvrdili 18,5% seropozitivnih. Prevalenca je bila najniža (6,5%) u severnim, a najveća (24,2%) u jugoistočnim delovima zemlje. U oblasti Venecije u Italiji, Cancellotti i Carlotto (1986) su utvrdili da je BVDV bio uzročnik u preko 30% virusnih oboljenja goveda u periodu od 1976. do 1984. godine. Ovaj procenat nije bio isti svake godine, već se kretao između 17,6 i 53,6%. Od ukupno 7968 uzoraka iz 354 zapata goveda u Sloveniji utvrđeno je 18% seropozitivnih životinja, pri čemu je jedan region severo-istočne Slovenije (Pomurje) bio skoro potpuno slobodan od BVDV infekcije (5% seropozitivnih) (Grom i Barlic-Maganja, 1999). U toku naših ispitivanja takva područja nisu ustanovljena.

Veći broj autora iznosi nalaze veće seroprevalence BVDV u jednom broju zemalja, naročito onih sa intenzivnom govedarskom proizvodnjom. Od 1332 ispitana uzorka krvnih serumu goveda, koja su prikupljena sa dve klanice u Danskoj, 78% je bilo seropozitivno (Meyling, 1984). Edwards i sar. (1987) su prilikom nekih epizootioloških ispitivanja u Velikoj Britaniji isptili 18759 životinja i ustanovili 64,9% životinja sa VN antitelima za BVDV. Skorašnja ispitivanja u Engleskoj i Velsu su pokazala da je utvrđena prevalenca BVDV infekcije slična rezultatima ispitivanja sprovedenim 10 do 20 godina ranije (Paton i sar., 1998). Infekcija BVDV je u Italiji prvi put utvrđena ranih 60-tih godina prošlog veka u severnom delu države. Bolest je bila rasprostranjena širom zemlje i procenat seropozitivnih jedinki se kretao i do 100%, a najčešće je bio rezultat subkliničkih infekcija (Cancellotti i Carlotto, 1986).

Rezultati ispitivanja uzoraka krvnih serumu priplodnih goveda u velikim zapatima, odnosno u farmskom načinu držanja životinja, su oslikavali prisustvo većeg broja seropozitivnih životinja u odnosu na ispitane krvne serume u individualnom načinu držanja goveda. Ispitivanjem raširenosti BVDV infekcije kod priplodnih mlečnih goveda iz velikih zapata farmskog načina držanja sa područja Južnobačkog i Sremskog okruga, utvrđeno je prisustvo VN antitela kod 1667 (55,22%) od 3019 ispitanih uzoraka krvnih serum. Broj ispitanih životinja predstavlja 37,46% ukupne populacije goveda u velikim zapatima na analiziranom području. Pri ispitivanju je naročito vođeno računa o zastupljenosti svih delova ispitanih područja i o statističkoj značajnosti veličine uzorka. Ispitivanjem su na ovaj način obuhvaćene životinje najvećeg broja velikih zapata goveda (22) na ispitivanom području. U Južnobačkom okrugu je utvrđeno 1500 (55,13%) seropozitivnih od 2721 (38,65%) ispitanih životinja iz 18 zapata. U Sremskom okrugu je utvrđeno 167 (56,04%) seropozitivnih od 298 (29,22%) ispitanih životinja iz 4 zapata.

Neujednačenost u procentu serološki pozitivnih životinja je naročito izražena ukoliko raširenost BVDV infekcije posmatramo na nivou pojedinih zapata na ispitanim područjima. Na području Južnobačkog okruga, procenat seropozitivnih životinja se u zapatima goveda kretao od 0%, odnosno gde nisu utvrđene seropozitivne životinje (5 velikih zapata), do 96,61% (zapat Đ). Visok procenat serološki pozitivnih životinja (70%) je utvrđen u 7 od 18 zapata. Na području Sremskog okruga, procenat seropozitivnih životinja u velikim zapatima se kretao od 0% (zapat O), do 96,96% (zapat R). Visok procenat serološki pozitivnih životinja (70%) je utvrđen u 2 od 4 zapata. Ovi rezultati i pored prisustva visokog procenta serološki pozitivnih životinja u velikim zapatima goveda, istovremeno ukazuju na postojanje velikih aglomeracija goveda slobodnih od BVDV infekcije na ispitanim epizootiološkim područjima. Na području Sremskog okruga je utvrđen jedan serološki negativan zapat, od oko 580 goveda, koji ovakav status u odnosu na BVDV infekciju ima duži niz godina, s obzirom da je i u ranijim ispitivanjima (Petrović, 2002; Petrović i sar. 2004) bio seronegativan. Posmatrajući tendenciju u govedarskoj proizvodnji većeg broja razvijenih evropskih država, u kojima je otpočeo ili je u toku program eradikacije BVDV infekcije, postojanje zapata slobodnih od ove infekcije na našim područjima predstavlja dobar početak za uspostavljanje programa suzbijanja i iskorenjivanja BVDV infekcije u našoj državi.

Ustanovljene varijacije u procentu seropozitivnih životinja u pojedinim zapatima su verovatno rezultat načina poslovanja tih farmi, odnosno kretanja životinja u zapatu u smislu, pre svega uvođenja novih grla u zapat. Naime, u literaturi su opisani rezultati ispitivanja većeg broja autora koji su ustanovili da se broj seropozitivnih životinja i učestalost BVDV infekcije u zapatima povećava sa učestalom prometom i uvođenjem novih životinja u zapat, ispašom goveda na zajedničkim pašnjacima, kao i kretanjem životinja po sajmovima i izložbama. Houe i sar. (1995/a) su ustanovili da je ukupan rizik pojave infekcije BVDV bio veći kod danih zapata i u zavisnosti od starosne kategorije je varirao između 20 i 25%, za razliku od 5 do 10% kod zapata iz države Mičigen. U starosnoj grupi između 2 i 6 godina rizik pojave je bio 1,7 do 5,8 puta veći kod danih zapata. Faktori rizika koji su imali ulogu u ovakovom rezultatu su, pre svega, gustina goveda na području, pastirska ispaša, nabavljanje novih grla i veličina zapata. Od 19 danih zapata, 15 je koristilo i pastirska način ishrane, dok od 20 mičigenskih zapata ovaj način ishrane koristilo samo njih 9, što je povećavalo mogućnost kontakta sa PI životinjama i infekciju u zapatu. U zapatima sa PI životinjama je uvođeno mnogo više novih grla nego u ona bez PI jedinki. Ispitivanjem pomoću Fišerovog egzaktnog testa i Mantel-Haenszel  $\chi^2$  testa, kao i logističke regresije je utvrđeno da pastirska način ishrane nije bio statistički značajan za prisustvo PI životinja. Međutim, ovaj način ishrane zajedno sa uvođenjem u zapat preko 40 novih životinja je bio statistički značajan za prisustvo infekcije (Houe i sar., 1995/a). Tokom drugog ispitivanja Houe i sar. (1995/b) su za zapat, u kojem je utvrđen najveći procenat seropozitivnih životinja (82%), ustanovili da je popunjen sa velikim brojem grla iz drugih zapata. Waage i sar. (1994) su ustanovili da je trgovina

živim životnjama i kontakti između zapata na zajedničkoj ispaši tokom leta glavni uzrok širenja BVDV infekcije između zapata u Norveškoj.

Shodno svim pomenutim literaturnim podacima može se reći da je visok procenat serološki pozitivnih životinja (70%) koji smo utvrdili u zapatima Južnobačkog (7) i Sremskog okruga (2) velikim delom i rezultat nekontrolisanog (u smislu dijagnostike BVDV) prometa životinja, što je doprinelo unošenju virusa i izbijanju učestalih BVDV infekcija u njima. Istovremeno, činjenica je da je u velikim zapatima goveda u Srbiji omogućen bliski kontakt između životinja, omogućujući time brzo širenje BVDV infekcije i učestalo rađanje PI životinja. Literaturni podaci ukazuju da su u zapatima sa visokim procentom serološki pozitivnih životinja u najvećem broju slučajeva prisutne PI jedinke (Houe i Meyling, 1991; Houe, 1995; Houe i sar. 1995/b; Houe, 1999). Ove jedinke, izlučujući BVD virus svim sekretima i ekskretima u velikim količinama, omogućuju veoma brzo širenje infekcije u zapatu, pri čemu veliki broj životinja nakon akutne, često inaparentne infekcije postaje serološki pozitivan. Prema tome, visok procenat seropozitivnih životinja, koje smo ustanovili u jednom broju zapata, je najverovatnije i rezultat prisustva PI životinja u njima. Ovu pretpostavku se i potvrdila u nekim zapatima, izolacijom virusa (Petrović, 2006).

Ustanovljeni serološki negativni zapati na BVDV su, obzirom da se u našoj zemlji goveda u prometu nisu ispitivala na prisustvo infekcije BVD virusom, verovatno ostala slobodna od te infekcije samo iz razloga ne uvođenja novih životinja u zapat (zatvoreni zapati). U ispitivanjima Houe-a i sar. (1995/b) jedan zapat je bilo potpuno seronegativan, što je potvrđivalo mogućnost nalaza zapata potpuno slobodnog od infekcije u inficiranom području. Ovakav nalaz predstavlja istovremeno i veliku opasnost za te zapate, zbog njihove velike prijemčivosti za infekciju. Varijacije u procentu seropozitivnih životinja u drugim zapatima farmskog načina držanja goveda su verovatno rezultat učestalosti i kontrole uvođenja novih životinja. Obzirom na periodičnost BVDV infekcije, ove razlike mogu biti i rezultat trenutno prisutne, skoro prošle ili davno prošle BVDV infekcije. U literaturi je u velikoj meri opisivana cikličnost BVDV infekcije. Nakon rađanja PI životinja u zapatu dolazi do brzog širenja infekcije, pri čemu nastaje veliki broj serološki pozitivnih životinja, tako da će naredni ciklus infekcije nastati samo nakon opadanja broja seropozitivnih (imunih) životinja, intrauterine infekcije i rađanja nove grupe PI jedinki (Houe, 1995; Houe, 1999). S obzirom da životinje nisu ispitivane po starosnim kategorijama, ovaj status infekcije u radu nije određivan.

Dobijeni rezultati su veoma slični nalazima u ranijim ispitivanjima na ovim područjima. U periodu od 1999. do 2001. godine, u prvim opsežnijim ispitivanjima, od ukupno 2076 ispitanih uzoraka krvnih serumi goveda iz 13 velikih farmi sa područja Južnobačkog i Sremskog okruga, prisustvo VN antitela za NADL soj BVDV smo ustanovili u 1088 (52,41%) uzoraka. Pri tome, u dva od 13 ispitivanih zapata nije utvrđeno prisustvo seropozitivnih životinja (Petrović, 2002). U ovom ispitivanju, osim razlika u broju i procentu serološki pozitivnih životinja, prilikom utvrđivanja visine titra VN antitela, u nekim slučajevima su ustanovljene statistički značajne

razlike u odnosu na soj BVD virusa kojim su vršena ispitivanja. Obzirom na rezultate pomenutih ispitivanja, kao i na literaturne podatke, izведен je zaključak da su na epizootiološkom području Južnobačkog i Sremskog okruga prisutni antigeno različiti BVDV sojevi.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti i mogu se lako nadovezati i na ispitivanja Molnara i saradnika (2003) sprovedenih na području severa zemlje (Severnobački okrug). Ovi autori su na prisustvo antitela protiv BVDV, ELISA testom ispitali 94 (4,34%) uzorka seruma iz 7 velikih zapata goveda sa ukupno 2164 životinja i 94 uzorka seruma (12,13%) iz malih zapata sa ukupno 775 životinja. Mali zapati goveda su poticali sa područja 17 naselja iz 5 opština. Ustanovljena prevalenca seropozitivnih životinja u velikim zapatima se kretala do 71,43% sa prosekom od 22,34%. U jednom velikom zapatu nisu utvrđene seropozitivne životinje. Procenat pozitivnih uzoraka krvnih seruma životinja iz malih zapata je iznosio 59,57%. Seropozitivne životinje su utvrđene na području svih 5 ispitivanih opština. Ovi rezultati nam ukazuju na prilično ujednačenu raširenost BVDV infekcije na ispitanim područjima severnih delova naše zemlje.

U prethodnim ispitivanjima sprovedenim na području Beograda, Milošević i saradnici (2004) su ispitali 440 krvnih seruma životinja iz velikih zapata i 2024 krvnih seruma životinja iz malih zapata goveda. Prosečna prevalenca seropozitivnih životinja u velikim zapatima je iznosila 66,80%, a u malim zapatima 4,24%. Dobijeni rezultati, odnosno nešto veći procenat seropozitivnih životinja u velikim zapatima na tom području, je verovatno posledica cikličnosti BVD infekcije i izbijanja skorašnjih infekcija u tim zapatima. Ova pretpostavka je i potvrđena u dva zapata izolacijom BVDV iz seruma viremičnih životinja (ovi rezultati nisu prikazani).

Rezultati naših ispitivanja se podudaraju i sa ispitivanjima sprovedenim pre 10-30 godina na području naše zemlje. Belić i sar. (1973) su u 6 zapata i 224 ispitanih krvnih seruma goveda ustanovili 166 ili 74% seropozitivnih životinja. Procenat pozitivnih se na pojedinim imanjima kretao između 38,8% i 91%. Kurčubić (1993) je u svom magistarskom radu izneo podatke serološkog ispitivanja goveda na dve farme u okolini Valjeva. Na farmi tovnih junadi (uzrasta od 6 do 7 meseci) od ispitanih 86, autor je utvrdio 48 ili 55,81% seropozitivnih seruma, dok se na farmi mlečnih krava od ukupno 178 grla, procenat seropozitivnih životinja kretao, u zavisnosti od starosne kategorije, između 30,55% i 52,24%.

Do sličnih rezultata su došli i autori iz zemalja našeg okruženja. Bojanović i sar. (2003) su ELISA testom za detekciju antitela protiv BVDV ispitali 217 pojedinačnih i 135 zbirnih uzoraka mleka krava sa područja Crne Gore. Od 217 pojedinačnih uzoraka mleka životinja, iz malih zapata sa područja 6 opština, utvrđeno je 85 ili 39,17% seropozitivnih uzoraka. Ispitivanjem zbirnih uzoraka mleka iz 135 većih zapata sa područja 5 opština, prevalenca od preko 30% seropozitivnih životinja je ustanovljena kod 34 (25,18%), dok je prevalenca ispod 10% utvrđena kod 85 (62,96%) zapata. Rezultati ispitivanja krvnih seruma mlečnih krava sa 4 različite

farme u Hrvatskoj pokazuju da je prisustvo specifičnih antitela ustanovljeno za BVD virus kod 79,2% ispitanih krava (Biuk-Rudan i sar. 1999).

Rezultati do kojih su dolazili drugi autori baveći se ispitivanjem raširenosti BVDV infekcije u zapatima goveda širom sveta su različiti. Houe (1995) je ispitivanjem 3157 životinja iz 66 zapata u SAD utvrdio 89% seropozitivnih životinja. Prikupljeni uzorci seruma od 430 odraslih goveda sa 19 farmi iz Brazila i jedne farme iz Argentine su ispitani na prisustvo antitela za BVDV. Antitela su ustanovljena u  $56\% \pm 15,1\%$  analiziranih serumi, što potvrđuje da je i u Brazilu prevalenca BVDV infekcije slična onoj u USA i Evropi (Canal i sar., 1998). U rimskoj provinciji Italije je od ukupno ispitanih 174 pretežno mlečnih zapata, 61 (42,9%) zapat klasifikovan kao negativan, od čega je 26 odmah dobilo status slobodnog zapata. Preostalih 84 (56,1%) zapata su bili serološki pozitivni ali je samo 13 (8,8%) klasifikованo kao skoro inficirani. Ukupna prevalenca serološki pozitivnih životinja je bila 31,4% (2199/6992). U zapatima sa skorašnjom infekcijom seroprevalenca kod goveda starijih od 1 godine je iznosila 87,6%, odnosno između 76 i 99% (Ferrari i sar., 1999). Schreiber i sar. (1999) su u Belgiji ispitali 9685 goveda, što čini sva grla na 61. farmi. Prevalenca seropozitivnih jedinki je iznosila 65,5%. U zapatima u kojima nije bilo inficiranih životinja ustanovljeno je 53,8% seropozitivnih životinja, dok je u zapatima sa bar jednom inficiranom životinjom, bilo u proseku 76,6% seropozitivnih životinja. Seropozitivne životinje su utvrđene u svim ispitivanim zapatima. U ispitivanju raširenosti BVDV infekcije koje je obuhvatilo 2570 životinja iz 19 današnjih mlečnih zapata je utvrđeno 64% serološki pozitivnih životinja. Seropozitivne životinje su otkrivene u svih 19 zapata (100%) (Houe i Meyling, 1991). Argente i sar. (1990) su sproveli serološka i virusološka ispitivanja prisustva BVDV infekcije na 41 mlečnoj farmi u oblasti Bretanje u Francuskoj u toku 1987. godine. Ispitivanjem je ustanovljeno 8 seronegativnih zapata, 13 zapata sa seroprevalencom između 0 i 10%, za 5 zapata je ustanovljena seroprevalenca između 10% i 20%, 4 zapata je sa seroprevalencom između 20% i 30%, dok je kod preostalih 10 zapata bilo preko 30% seropozitivnih životinja. Rezultati do kojih smo došli u toku naših ispitivanja se slažu sa predhodno iznesenim, a i drugim literaturnim podacima koji opisuju raširenost BVDV infekcije. Svi ovi podaci ukazuju na veliku raširenost BVDV infekcije, naročito u zemljama sa razvijenim stočarstvom i velikom gulinom goveda na području.

Međutim, prisustvo serološki pozitivnih životinja u zapatu na mora istovremeno značiti i trenutno prisutnu infekciju. Primera radi, Fredriksen i sar. (1999) su u prvoj godini nakon pojave infekcije u zapatu goveda pratili titar antitela u intervalima od 2 meseca (6 puta), a u naredne dve godine u intervalima od 6 meseci (5 puta). Između prvog i drugog perioda ispitivanja ustanovili su pad titra VN antitela od  $0,24 \log_{10}$  ( $p<0,001$ ), što je približno odgovaralo jednom razređenju u VN testu. Nakon proteklih tri godine ispitivanja životinje su i dalje imale srednji ili visok titar VN antitela, pri čemu u tom periodu nisu imale nove kontakte sa BVD virusom ili njegovim antigenom. Rezultati ovih ispitivanja potvrđuju da se nakon BVDV infekcije stvorena VN antitela zadržavaju u cirkulaciji dugi vremenski period. U našim ispitivanjima

takva problematika je verovatno prisutna u najvećem broju velikih zapata sa seroprevalencom do 50%, kao i u većini opština i naseljenih mesta kod pregledanih životinja individualnog načina držanja.

U literaturi su opisane i razlike u broju i procentu serološki pozitivnih grla u odnosu na veličinu zapata. Što je zapat manji veća je mogućnost prekidanja ciklusa infekcije (Lindberg i Alenius, 1999). S obzirom na literaturne podatke, može se reći da je u velikim zapatima goveda infekcija češća, a samim tim i veći procenat serološki pozitivnih životinja. U takvim zapatima infekcija uvek može da se održava u vidu PI fetusa u uterusu majke. U malim zapatima sve životinje bivaju inficirane u kratkom vremenskom intervalu, pri čemu je zbog prisustva manjeg broja životinja, manja i mogućnost infekcije majke u prvoj trećini graviditeta. Nakon infekcije, sve životinje u malim zapatima postaju imune, a "klirens" virusa iz malog zapata je potpun zbog nedostatka prijemčive životinje. U odnosu na značaj veličine zapata u epizootiologiji BVDV infekcije, upoređeni su podaci dobijeni iz četiri države: Danske, Švedske, Norveške i Finske. Utvrđeno je da je seroprevalenca BVDV infekcije najveća u Danskoj (gde su zapati najveći), a najmanja u Finskoj (gde su zapati najmanji) (Houe, 1995). Rezultati naših ispitivanja su takođe pokazali povezanost između procenta serološki pozitivnih životinja i veličine zapata. Ustanovljena razlika je pre svega rezultat ređe infekcije u zapatima sa malim brojem životinja, kao i kod životinja koje se drže pojedinačno. U slučaju individualnog načina držanja goveda, usled malog prometa životinja mala je i mogućnost unošenja infekcije u zapat, a ukoliko se i unese u zapat, infekcija se brzo zaustavlja zbog malog broja prijemčivih životinja. Veliki zapati farmskog načina držanja goveda su imali veći procenat seropozitivnih životinja, koji se u 9 od 22 ispitana zapata kretao preko 70%. Za razliku od njih u malim zapatima goveda, gde se u kontaktu nalazi mali broj životinja i gde su te male grupe goveda raštrkane na manju ili veću razdaljinu, procenat seropozitivnih od ukupno ispitanih u opština se najčešće kretao između 10% i 45% u Južnobačkom i od 8% do 35% u Sremskom okrugu. Pored razlika u procentu serološki pozitivnih životinja u zapatima različite veličine i načina uzgoja, ispitivanjima je utvrđena i razlika u visini titra VN antitela (rezultati nisu prikazani). Visok titar VN antitela je ustanovljen, pre svega, kod goveda iz velikih zapata farmskog načina držanja. Ova pojava je vezana, pre svega, na učestalo izbijanje BVDV infekcije, rađanje PI jedinki i izlaganje životinja virusnom antigenu koji vrši stalni imunološki podražaj. Visok titar VN antitela je utvrđen i kod jednog broja životinja u individualnom načinu držanja, odnosno malim zapatima u pojedinim opština i naseljima. Razlog ove pojave je verovatno sličan onom u velikim zapatima uz veliku verovatnoću učestalog kretanja životinja u smislu nabavke i uvođenja novih grla iz velikih zapata goveda. Bez obzira na način držanja goveda, visok procenat seropozitivnih i prisustvo životinja sa izrazito visokim titrom VN antitela (nastao kao rezultat stalne imunizacije) direktno ukazuje na prisustvo PI jedinki u zapatu. Iz ovog razloga se serološka ispitivanja mogu upotrebiti kao indirektni dokaz prisustva PI životinja. Visok titar VN antitela naročito kod stenonih životinja u ispitanim zapatima može biti i rezultat intrauterino

prisutne infekcije u vidu PI fetusa. Lindberg i Alenius (1999) navode da majke PI fetusa imaju izuzetno visok titar antitela i to naročito pri kraju graviditeta. Ova činjenica se može iskoristiti u ranoj detekciji još nerođene PI jedinke.

## ZAKLJUČAK

Sprovedena serološka ispitivanja prisustva VN antitela protiv BVDV kod goveda na ispitanim području su pokazala jasnu sliku raširenosti ove infekcije u zapatima goveda različitog načina držanja na području Južnobačkog i Sremskog okruga. Kompletna epizootiološka situacija BVDV infekcije na teritoriji Srbije nije poznata, jer šira serološka i virusološka istraživanja nisu izvršena. Međutim, s obzirom na dobijene rezultate, kao i sva do sada izvršena ispitivanja i utvrđen stepen raširenosti BVDV infekcije na ispitanim epizootiološkim područjima, na postojeće zdravstveno stanje životinja, kao i na postojanje zapaženih kliničkih manifestacija oboljenja goveda, može se sa sigurnošću pretpostaviti značajna rasprostranjenost ove infekcije na širem epizootiološkom području. Na osnovu ustanovljenih podataka i realnih pretpostavki o raširenosti BVDV infekcije na području naše države, velikih ekonomskih šteta do kojih ona dovodi, kao i na tendenciju rešavanja problema u evropskim državama, postoji potreba pokretanja zakonske regulative u profilaksi i eradicaciji ove virusne bolesti goveda kod nas.

## LITERATURA:

1. Argente G., Serrand S., Quefelec C., Frappier E., Lucas C., Gueguen C., Bataillon G.: Bovine viral diarrhoea-mucosal disease (BVD-MD) prevalence in dairy cattle in Brittany (France). A serological and virological survey in 1987. In: Symposium of the European Society for Veterinary Virology, Ruminant Pestiviruses Infections: Virology, Pathogenesis and Perspectives of Prophylaxis, Hanover, Germany, 1990.
2. Belić L., Mihajlović B., Jermolenko G.: Prilog ispitivanju antitela protiv virusne dijareje goveda. *Veterinarski glasnik* 8, 565-568, 1973.
3. Bitsch V., Ronsholt L.: Control of bovine viral diarrhoea virus infection without vaccines. *Vet. Clinics of North America: Food Animal Practice*, 11, 3, 627-640, 1995.
4. Biuk-Rudan N., Cvjetnić S., Madić J., Rudan D.: Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders *Theriogenology*. 51, 5, 875-881, 1999.
5. Bojanic Mirjana, Božarić Lidija, Pejović N.: Prisustvo antitijela na virus bovine dijareje (BVDV) kod mlječnih krava na području Crne Gore. U: Simpozijum "V Epizootioločki dani", Subotica 2-5 April, Zbornik radova i kratkih sadržaja, 2003, 51-55.
6. Canal C.W., Strasser M., Hertig C., Masuda A., Peterhans E.: Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Vet. Microbiology* 63 (2-4), 85-97, 1998.

7. Cancellotti F.M., Carlotto F.: Methods and strategies of bovine viral diarrhoea control in Italy. In: Proc. EEC Conference on Pestivirus Infections of Ruminants, Brussels, 1986, 183-193.
8. Ferrari G., Scicluna M.T., Bonvicini D., Gobbi C., Della Ferita F., Valentini A., Autorino G.L.: Bovine virus diarrhoea (BVD) control program in an area in the Rome province (Italy). *Veterinary Microbiology* 64, 237-245, 1999.
9. Fredriksen B., Sandvik T., Loken T., Odegaard S.A.: Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* 144 (5), 111-114, 1999.
10. Grom J., Darja Barlić-Maganja: Bovine viral diarrhoea (BVD) infections-control and eradication program in breeding herds in Slovenia. *Veterinary Microbiology* 64, 259-264, 1999.
11. Houe H., Meyling A.: Prevalence of bovine virus diarrhoea (BVD) in 19 Danish dairy herds and estimation of incidence of infection in early pregnancy. *Prev. Vet. Med.* 11, 9-16, 1991.
12. Houe H.: Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 11, 3, 521-547, 1995.
13. Houe H., Baker J.C., Maes R.K., Lloyd J.W., Enevoldsen C.: Comparison of the Prevalence with Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVDV) in Denmark and Mitchigen and Association with Possible Risk Faktors. *Acta Vet. Scand.* 36, 521-531, 1995.
14. Houe H., Baker J.C., Maes R.K., Wuryastuti H., Wasito R., Ruegg P.L., Lloyd J.W.: Prevalence of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus in 20 dairy herds in two counties in central Michigan and comparison of prevalence of antibody-positive cattle among herds with different infection and vaccination status. *J. Vet. Diag. Invest.* 7, 3, 321-326, 1995.
15. Houe H.: Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology* 64, 89-107, 1999
16. Kurčubić V.: Serološka ispitivanja goveda na infekciju virusom bovine virusne dijareje : magistarski rad. Beograd: Veterinarski fakultet univerziteta u Beogradu, Katedra za Mikrobiologiju, 1993
17. Lindberg Ann L.E., Alenius S.: Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Veterinary Microbiology* 64, 197-222, 199.
18. Loken T., Krogstrup J., Larsen I.L.: Pestivirus infections in Norway-Serological investigations in cattle, sheep and pigs. *Acta Vet. Scand.* 32, 27-34, 1991.
19. Meyling A.: Detection of BVD virus in viremic cattle by an indirect imunoperoxidase tehnique. In: McNulty M.S., MacFerran J.B., Recent Advances in Virus Diagnosis, Boston, 37-46, 1984.
20. Milošević B. Petrović T., Jermolenko Gordana, Stanojević S.: Rasprostranjenost infekcije virusom bovine virusne dijareje kod goveda u beogradskom epizootiološkom području. U: Simpozijum „VI epizootiološki dani”, Vlasinsko

- jezero, 31. mart-2.april, Zbornik kratkih sadržaja, Beograd: Sekcija za zoonoze SVD, 2004, 167.
21. Molnar T., Kiškarolj F., Molnar Olga: Bovina virusna dijareja-prva serološka ispitivanja na epizootiološkom području VSI Subotica. U: Zbornik referata i kratkih sadržaja, „5 Jugoslovenski Epizootiološki Dani”, Palić, Subotica, 3-5. aprila. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2003, 56-59.
  22. Paton D.J., Christiansen K.H., Alenius S., Cranwell M.P., Pritchard G.C., Drew T.W.: Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *The Veterinary Record* 142, 385-391, 1998.
  23. Petrović T.: Ispitivanje raširenosti infekcije izazvane virusom goveđe dijareje (BVD) kod priplodnih goveda : magistarska teza. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, 2002.
  24. Petrović M., Đuričić Bosiljka, Ignjatović R., Stojanović G., Petreski I.: Ispitivanje raširenosti virusne dijareje goveda / bolesti sluzokoža (BVD/MD) ELISA testom kod mlečnih krava Niškog i Južnomoravskog epizootiološkog područja. U: Zbornik referata i kratkih sadržaja, Simpozijum „IV Jugoslovenski Epizootiološki Dani”, Mataruška Banja, 3-6. aprila. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 2002, 224-226.
  25. Petrović, T., Molnar, T., Milošević, B., Kurčubić, V., Petrović, M.M., Bojanic, M., Lazić, S., Đuričić, Bosiljka: Some examinations of prevalence of BVD infection in Serbia and Montenegro. In: Book of Abstracts, Second European Symposium on: BVDV Control, Porto, Portugal, October 20 – 22, 2004, 80.
  26. Petrović T.: Identifikacija i genetska analiza izolovanih sojeva virusa goveđe dijareje (BVD) na području Republike Srbije: doktorska disertacija. Beograd, Fakultet veterinarske medicine, 2006.
  27. Roeder P.L., Harkness J.W.: BVD virus infection: Prospects for control. *Veterinary Record* 118, 143-147, 1986.
  28. Ssentongo Y.K., Johnson R.H. Smith J.R.: Association of bovine diarrhoea-mucosal disease virus with ovaritis in cattle. *Aust. Vet. J.* 56, 272-273, 1980.
  29. Schreiber P., Dubois F., Dreze F., Lacroix N., Limbourg B., Coppe Ph.: Prevalence of bovine virus diarrhoea virus infection in Belgian white blue cattle in southern Belgium. *Vet. Quar.* 21, 28-32, 1999.
  30. Sudharshana K.J., Suresh K.B., Rajsekhar M.: Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in India. *Rev. Sci Tech* 18 (3), 667-671, 1999.
  31. Waage S., Krogsrud J., Nyberg O.: The Norwegian program for eradication of bovine viral diarrhoea/mucosal disease. In: Proc. XVIII World Buiatrics Congress, Bologna, Italy, 1994, 773-776.

Primljeno: 10.01.2009.  
Odobreno: 03.03.2009.

# Uticaj oboljenja respiratornog trakta na zaostajanje svinja u porastu

Radoslav Došen,\* Jasna Prodanov, Ivan Pušić, Igor Stojanov, Marko Maljković  
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Rumenački put 20, Novi Sad

## Kratak sadržaj

Respiratorne bolesti svinja nanose velike ekonomске štete u vidu direktnih gubitaka zbog uginuća i prinudnog klanja, smanjenog dnevног prirasta, većeg utroška hrane za kilogram prirasta, prođenog tova, visokog procenta „lakih svinja” na klanici i troškova lečenja. Cilj rada je bio ustanovljavanje uticaja respiratornih bolesti na pojavu svinja koje zaostaju u porastu. Kao materijal za istraživanja koristili smo 73 praseta koja su zaostajala u porastu i 224 tovljenika koji su na klanicu dopremljeni kao redovna isporuka. Prasadima koja su zaostajala u porastu i tovljenicima posle dopremanja na klanicu je izmerena telesna masa, a na liniji klanja je izvršen patomorfološki pregled respiratornog trakta i srca. Pregledom organa grudne duplje kod 65,75% zaklanih „lakih” svinja ustanovljene su promene na plućima. Patološki proces je najčešće zahvatao istovremeno apikalne, kardijalne i diafragmatske lobuse pluća (42,46%). Pregledom organa grudne duplje kod 54,88% tovljenika ustanovljene su promene na plućnom tkivu. Kod ukupno 53 (21,54%) tovljenika promene su zahvatale manje od 10% plućnog parenhima, a kod 26 (10,57%) tovljenika promene su ustanovljene na više od 50% plućnog parenhima. Na osnovu rezultata istraživanja može se sa velikom verovatnoćom pretpostaviti da su bolesti respiratornog sistema kod tovnih svinja na farmi industrijskog tipa, dominantan uzrok kako uginuća tako i prinudnog klanja i da bitno utiču na proizvodne rezultate i ekonomičnost proizvodnje.

Ključne reči: respiratorna oboljenja svinja, klanica, „lake svinje”

---

\* e-mail: dosen@niv.ns.ac.yu

# The influence of respiratory diseases on decreased rate of weight gain in pigs

Radoslav Došen,<sup>\*</sup> Jasna Prodanov, Ivan Pušić, Igor Stojanov, Marko Maljković,  
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Rumenački put 20, Novi Sad

## Abstract

Respiratory diseases of swine cause great economic losses due to death of animals, compulsory slaughtering, reduced daily weight gain, higher consumption of feed per kilo comparing to gain, prolonged fattening time, higher percentage of low weight pigs in the slaughterhouse and increased costs of medical treatment. The aim of this paper was to evaluate how the diseases of respiratory tract influence on the appearance of reduced growth rate in pigs. The material for research were 73 piglets in which decreased weight gain was noticed and 224 fattening pigs that were delivered to a slaughter house on regular basis. The body mass of the piglets that showed decreased weight gain and of the fattening pigs was measured upon the arrival to the abattoir. At the slaughterhouse pathomorphological examination of respiratory tract and heart was carried out. Examining the organs of chest cavity in 65.75% of the slaughtered low weight pigs changes on lungs were discovered. The pathological process most often comprised at the same time apical, cardial and diaphragmatic lobes (42.46%). In 52% cases we discovered pleuropneumonia and pericarditis. In 14 cases (9.18%) abscesses in lung tissues were discovered. Examining chest cavity it was detected that in 54.88% fattening pigs there were changes on lungs. In 53 (21.54%) fattening pigs the changes influenced lesser than 10% on lung parenchyma, but in 26 (10.57%) fattening pigs changes on lung parenchyma occurred in more of 50%. On the bases of these results it can be concluded that the diseases of respiratory system in the fattening pigs raised on industrial farms are the dominant cause of death, but also the reason for forced slaughtering, and they considerably influence productional results and the efficiency of swine production.

Key words: respiratory diseases of swine, slaughterhouse, low weight pigs

## UVOD

Savremeno tržište pred proizvođače svinja postavlja zahtev da u određenim intervalima isporuče određen broj tovljenika, koji po kvalitetu treba da zadovolje potrebe potrošača. Međutim, ne mali procenat svinja u toku procesa proizvodnje zaostaje u porastu („lake svinje”), te proizvođači nisu u mogućnosti da ispune uslove

savremenog tržišta. Ovo se odnosi kako u pogledu broja isporučenih, tako i sa aspekta kvaliteta tovljenika.

Respiratorne bolesti su jedan od najvažnijih problema savremene, intenzivne proizvodnje svinja, kako u svetu tako i u našoj zemlji. Intenziviranjem svinjarske proizvodnje uvećava se frekvenca i ekonomski značaj ovih bolesti, bez obzira na dosadašnje mere primenjene za njihovo suzbijanje (Sorensen i sar., 2006). Velike ekonomiske štete se ogledaju u vidu direktnih gubitaka zbog uginuća i prinudnog klanja, smanjenog dnevnog prirasta, većeg utroška hrane za kilogram prirasta, produženog vremena trajanja tova, troškova lečenja kao i u pojavi visokog procenata „lakih“ svinja na klanici (Schepers, 1990). Smatra se da na pojavu „lakih svinja“ utiče veći broj faktora: sistem menadžmenta, način držanja, ishrana, genetika, zoohigijenski uslovi kao i zdravstveni status zapata svinja (Sorensen i sar., 2006). Kao primarni uzročnici respiratornih oboljenja navode se virus respiratornog i reproduktivnog sindroma svinja (PRRS), cirkovirus, virus influence svinja, zatim infekcije sa *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* a ponekad i virus Aujeskićeve bolesti. Od sekundarnih uzročnika značaj imaju infekcije sa *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* i *Actinobacillus suis* (Gagrčin i Došen, 2004; Došen i sar., 2000). Uzročnici bolesti se najčešće unose u zapat kupovinom inficiranih svinja ili semena za veštačku oplodnju sa druge farme (Došen i sar., 2002). Ustanovljeno je da troškovi koji nastaju usled pojave respiratornih bolesti u svinjarskoj proizvodnji nastaju kao posledica: umanjenja prirasta (60%), uništenih i odbačenih obolelih životinja (37%) i odbačenih pluća (3%) (Hoy i sar., 1987).

U praktičnim uslovima procenjivanje ekonomskog uticaja respiratornih oboljenja na nivou zapata zasniva se na sledećim informacijama: podacima o oboljenju u zapatu (pojava kliničke forme respiratornog oboljenja i drugih bolesti, stepen mortaliteta, rezultati obdukcije, materijalni troškovi preduzetog tretmana kao i strategije primenjene profilakse), podacima o produktivnosti (trenutni prirast, utrošeno dana do klanja, konverzija), i podacima iz klanice (procenat „lakih“ svinja i broj obolelih, intenzitet zapaženih lezija pri klanju i količina odbačenih organa i trupova).

Cilj naših istraživanja je bio da se ispita uticaj respiratornih bolesti na pojavu svinja koje zaostaju u porastu („lakih svinja“). U skladu sa ciljem, izvršeno je ispitivanje pojave i intenziteta promena na plućnom tkivu kod tovljenika na liniji klanja.

## MATERIJAL I METOD RADA

Materijal za istraživanje je obuhvatao ukupno 73 praseta za koja je utvrđeno da su zaostajala u porastu u odnosu na prasad iste starosti i 224 tovljenika koji su na klanicu dopremljeni kao redovna isporuka. Svinje su poreklom sa farme industrijskog tipa, kapaciteta oko 40000 tovljenika godišnje. Tovljenici su do klanja bili smešteni u objektima kapaciteta 1000 tovljenika. Objekti su bili bez prozora, a ventilacija je

obezbeđena ventilatorima (sa svake strane je ustanovljeno sedam ventilatora, odgovarajućeg kapaciteta). Pod je celorešetkast i nalazi se iznad kanala za osoku, a sistem izdubravanja je samotok.

Prasadima koja su zaostajala u porastu i tovljenicima posle dopremanja na klanicu izmerena je telesna masa, a na liniji klanja je izvršen patomorfološki pregled respiratornog trakta i srca. Rezultati pregleda i intenzitet ustanovljenih promena su evidentirani u formi obrasca koji smo sačinili po ugledu na Sorenson i sar. (2006).

## REZULTATI I DISKUSIJA

Merenjem je ustanovljeno da je prosečna telesna masa prasadi koja su zaostajala u porastu iznosila 30,74 kg. U 83,2 % ispitivana slučaja telesna masa prasadi koja su zaostajala u porastu je bila između 16 i 40 kg. Ustanovljena distribucija telesne mase ispitivanih svinja nam ukazuje da su poticala iz svih starosnih grupa na farmi (faza odgoja, predtova i tova).

Pregledom organa grudne duplje kod ukupno 65,75% zaklanih „lakih” svinja ustanovljene su promene na plućnom tkivu. Pri tome, promene na plućnom tkivu su ustanovljene u najnižem procentu samo na apikalnim (2,74%) ili samo na kardijalnim režnjevima (4,1%). U najvećem broju ispitivanih uzoraka (42,46%), patološki proces je zahvatao istovremeno apikalne, kardijalne i dijafragmatske režnjeve pluća. Utvrđeno je da se oboljenje komplikuje spuštanjem patološkog procesa na distalne režnjeve pluća, i najčešće poprima hronični tok. Patološki proces se u tim slučajevima karakteriše hepatizacijom plućnog tkiva (*Pneumonia fibrinosa in statu hepatisationis rubrae et griseae*), te režnjevi makroskopski podsećaju na tkivo jetre ili pankreasa. U 52% ispitanih uzoraka je ustanovljena pleuropneumonija i perikarditis. Na plućnom tkivu su ustanovljene naslage fibrina (*Inflammatio fibrinosa pleurae pulmonalis*) ili još češće priraslice (adhezije) između viscerarnog i parietalnog lista plućne maramice (*Pleuritis adhaesiva circumscripta et diffusa, Pleuritis fibrinoplastica adhaesiva*). Kod 14 ispitanih uzoraka (9,18%) ustanovljeni su apsesi u plućnom tkivu (*Pneumonia apostematosa disseminata*). Perikarditis kao samostalno oboljenje ili u sklopu bronhopneumonije je ustanovljen u svega 4,1% ispitanih uzoraka, dok je u sklopu pleuropneumonije učestalost patološkog procesa koji je zahvatio i srčani mišić bila 43,83%. Patološki proces je bio različitog intenziteta: *Perikarditis fibrinosa, Perikarditis fibrinosa massiva, Perikarditis fibrinosa diffusa partim villosa, Pericarditis villosa (filamentosa)*. U okviru sličnih ispitivanja, Došen i sar. (2000) su kod prinudno zaklanih tovljenika ustanovili da učestalost pojave patomorfoloških promena koje se mogu vezati za bolesti respiratornog trakta iznosi 92,85%. Pri tome, promene koje ukazuju na nalaz pleuropneumonije su ustanovljene u 50% ispitanih uzoraka, dok je učestalost patomorfološkog nalaza bronhopneumonije iznosi 42,85%.

U ispitanim uzorku od 224 tovljenika koji su na klanicu dopremljeni kao redovna isporuka, kod ukupno 45,12% tovljenika na plućnom tkivu nisu ustanovljene promene, dok su kod 21,54% utvrđene promene koje su zahvatale manje od 10%

plućnog tkiva. Patološke promene na plućima koje su zahvatile od 11 do 40% plućnog tkiva ustanovljene su kod 19,4% pregledanih tovljenika. Nalaz patoloških promena koje su ukazivale na pneumoniju jakog intenziteta, odnosno kada su promene obuhvatale od 41 do 50% plućnog parenhima, ustanovljeno je kod 3,2% tovljenika, dok je kod 10,5% pregledanih uzoraka patološki proces zahvatio preko 51% i više plućnog parenhima (tabela 1).

Tabela 1. Intenzitet ustanovljenih promena na plućima tovljenika

Normalna pluća				Upala pluća						Teška upala pluća			
% afekcije plućnog tkiva													
0		1-10%		11-20%		21-30%		31-40%		41-50%		50%	
Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%	Br.	%
111	45,12	53	21,54	22	8,94	18	7,32	8	3,25	8	3,25	26	10,57

U najvećem broju slučajeva su ustanovljene promene u vidu hepatizacije plućnog tkiva, koje se na osnovu patomorfološkog nalaza mogu vezati za mikoplazmatske pneumonije (46,66%), dok je nalaz pleuritisa utvrđen u 22,22% ispitanih uzoraka. Mikoplazmatske pneumonije sa pleuritisom kao komplikacijom su ustanovljene u 12,59% slučajeva. Pored toga treba istaći da je u 10,37% slučajeva ustanovljen patološki supstrat na plućnom tkivu koji se može vezati za aktinobacilusnu pneumoniju. Kod ukupno u 5,18% uzorka pluća mikoplazmatska pneumonija je bila dalje komplikovana sa aktinobacilusnom pleuropneumonijom. Došen i sar. (2000) su pregledom na liniji klanja, u okviru redovne isporuke tovljenika, ustanovili kod ukupno 29,06% pregledanih uzoraka patološke promene koje su ukazivale na pojavu oboljenja respiratornog trakta. Pri tome, pleuropneumonija je ustanovljena kod 21,18%, dok su promene u vidu bronhopneumonije utvrđene na 7,88% pregledanih uzoraka pluća (tabela 2).

Tabela 2. Promene na plućima ustanovljene pregledom ukupno 246 tovljenika

Promene na plućima	Br. tovljenika	% sa promenama
Mikoplazmatska pneumonija (hepatizacija režnjeva)	63	46,66
Pleuritis	30	22,22
Mikoplazmatska pneumonija i pleuritis	17	12,59
Aktinobacilusna pneumonija	14	10,37
Bronhopneumonija	4	2,96
Mikoplazmatska i aktinobacilusna pneumonija	3	2,22
Aktinobacilusna pleuropneumonija	2	1,48
Mikoplazmatska i aktinobacilusna pleuropneumonija	2	1,48
UKUPNO	135	100

## ZAKLJUČAK

Na osnovu postignutih rezultata istraživanja može se sa velikom verovatnoćom pretpostaviti da su bolesti respiratornog sistema kod tovnih svinja na farmi industrijskog tipa, dominantan uzrok kako uginuća tako i prinudnog klanja i da bitno utiču na proizvodne rezultate i ekonomičnost proizvodnje. Neophodno je u određenim vremenskim intervalima vršiti pregled „lakih“ svinja i tovljenika u okviru redovne isporuke na liniji klanja kako bi se prikupili sledeći podaci kao što je procenat „lakih“ svinja, broj obolelih, lokalizacija i intenzitet lezija zapaženih pri klanju, kao i količina odbačenih organa i trupova.

## LITERATURA

1. Došen R., Radulović G., Prodanov J.: Uticaj respiratornih bolesti svinja na proizvodne rezultate farme industrijskog tipa. U: Zbornik plenarnih referata i koreferata, 3. Simpozijum Uzgoj i zaštita zdravlja svinja, 21-23. juna Vršac, Beograd: Veterinarska komora Srbije, 2000, 99-101.
2. Došen R., Lalić M., Prodanov J., Gagrčin M., Volarev S.: Karantin i promet svinja u Vojvodini sa epizootiološkog aspekta. U: Bosiljak Đuričić, urednik, Zbornik referata i kratkih sadržaja, Simpozijum IV jugoslovenski epizootiološki dani, 3-5. april, Mataruška Banja, Beograd: Veterinarska komora Srbije, 2002, 51-52.
3. Gagrčin M., Došen R.: Kompleks respiratornih bolesti svinja: strategija kontrole u svetu akuelnih saznanja. *Veterinarski glasnik*, 58, 3/4, 409-418, 2004
4. Hoy S., Mehlhorn, G., and Lieschkhe B.: The economic importance of respiratory diseases in pigs. *Tierzucht* 41, 334-336, 1987.
5. Schepers J.A.: Data requirements and objectives for economic analysis of diseases in farm livestock. In: Proc Soc Vet Epidemiol Prev Med, Belfast, 120-132, 1990.
6. Sorensen V., Josal S. E., Mausing J.: Diseases of the Respiratory System. In: Straw, B. E., D Allaire, S., Mengeling, W. L., Taylor D. J., Diseases of Swine, Iowa State University, 2006, 149-177.

Primljeno: 12.02.2009.

Odobreno: 03.03.2009.

## Američke kuge pčelinjeg legla - epizootiološka situacija i značaj ranog otkrivanja bolesti

Nada Plavša\*, I. Stojanov, Dubravka Milanov, Jelena Petrović  
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

### Kratak sadržaj

Američka kuga pčelinjeg legla je zarazna bolest na listi bolesti obaveznih za prijavu po Programu mera zdravstvene zaštite životinja. Na epizootiološkom području Južnobačkog i Sremskog okruga u periodu od 2002-2007. potvrđena je u 5 opština, na 50 pčelinjih zajednica, odnosno na 19,76% pregledanih uzoraka pčelinjeg legla. Praćeno je utvrđivanje raširenosti američke kuge u zaraženom području na okolne pčelinjake, pri čemu je urađen klinički pregled 613 pčelinjih društava. Iz 82 pčelinja društva uzeti su uzorci meda na analizu prisustva spora *Paenibacillusa larvae*. Nije bilo kliničkih znakova bolesti u pregledanim društvima, a spore su utvrđene u 28 društava (34,50%). U istim uzorcima sprovedena su ispitivanja na rezidue antibiotika, a rezultati su pokazali da su bile prisutne u 26 uzoraka (31,70%).

Ključne reči: pčele, američka kuga, spore *Paenibacillusa larvae*, rezidue antibiotika

---

\* e-mail: nada@niv.ns.ac.yu

# American foulbrood – epizootiological situation and the importance of early detecting

Nada Plavša, I. Stojanov, Dubravka Milanov, Jelena Petrović  
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

## Abstract

American foulbrood is a contagious disease and reports on the cases are obligatory according to the Directive on Animal Health Protective Measures for 2009. On the area of Southern Bačka and Srem district in the period between 2002 and 2007 this disease was detected in 50 bee colonies in 5 municipalities. The prevalence of American foulbrood in contaminated area was monitored with the intention to detect its spreading. There were 613 colonies clinically examined. In 82 colonies the samples of honey were analyzed on *Paenibacillusa larvae* spora. The examined colonies were without clinical signs, but in 28 colonies (34.5%) the spores were detected. In the same samples an examination on residua presence was carried out and it was present in 26 samples (31.70%).

Key words: bees, American foulbrood, *Paenibacillusa larvae* spora, antibiotic residua

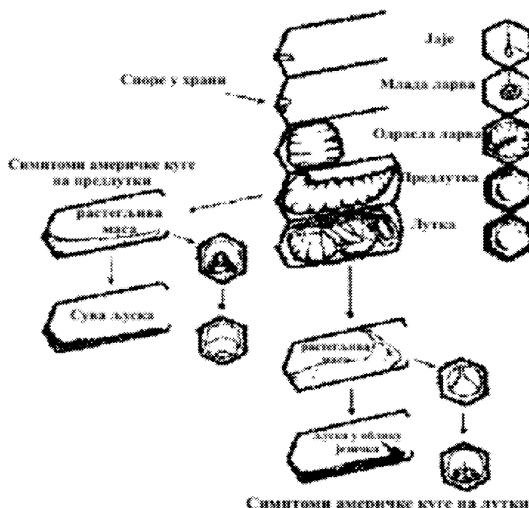
## UVOD

Američke kuge pčelinjeg legla je već duže vremena značajno prisutna u pčelarstvu Srbije. Prava epizootiološka slika je praktično nepoznata, ali je oboljenje prisutno na terenu i ima tendenciju daljeg širenja (Đuričić i sar., 1997; 2001). Ovome, svakako, doprinosi više razloga od kojih su najprisutnija dva: sa jedne strane nedovoljna stručna kontrola pčelinjaka i obavezno sprovođenje zakonskih mera za otkrivanje, suzbijanje i iskorenjivanje bolesti, a sa druge strane nekontrolisani promet pčelinjih proizvoda i meda, nekontrolisana seoba pčelinjih društava na veće pčelinje paše i nekontrolisana upotreba antibiotika (u „preventivne svrhe“). Sama činjenica da se kontrola pojave bolesti bazira na slobodnoj volji pčelara da zarazu prijavi, što se relativno retko dešava, do toga da je rad veterinaru i veterinarskih inspektora na ovoj problematiki na terenu skoro beznačajan, kao posledicu ima nepovoljnu epizootiološku situaciju.

Pojava američke kuge pčelinjeg legla u Srbiji u poslednjih dvadesetak godina kretala se od 3 do 20% i prema zvaničnim nalazima dijagnostičkih laboratorijskih u

Republiči Srbiji bolest nije poprimila značajne razmere. Međutim, poslednjih godina, prema informacijama od pčelarskih udruženja i pčelara pojedinaca sa terena bolest je značajno prisutna u gotovo svim epizootiološkim područjima Republike Srbije. Uzročnik ove bolesti je bakterija *Paenibacillus larvae larvae* (Heundricks i sar., 1996) koja je u obliku spora izuzetno otporna i u pčelinjim proizvodima i opremi ostaje aktivna 30 i više godina. Američka kuga je prvi put opisana 1906. godine (White, 1906). I ako je bolest prisutna i poznata u pčelarstvu skoro pun vek, ona nije značajnije uticala na pčelinja društva tako da su se održavala i razvijala. Mada oboljenje ima lančasti tip zaraze i maligni tok, razlog njenog slabijeg širenja nalazio se u primitivnom pčelarenju, manjim i ređim seobama i komunikacijama, ali i u jačoj otpornosti pčelinjih društava, koja su živela i održavala se na medu i polenu, a ne zamenama za tu kvalitetnu hranu, što se danas najčešće dešava. Infekcija jednodnevne larve nastaje samo sporama *Paenibacillus larvae larvae*, a za nastanak bolesti potrebno je 8,49 spora po jednoj larvi u starosti do 24 sata. Kliničke promene se uočavaju u roku od 25 dana, dok sa starošću procesa od 60 dana masa uginule larve je na dnu ćelije sasušena i ima izgled „jezička” koji svetluca što je prikazano na Šemici 1.

Šema 1. Razvoj legla inficiranog *Paenibacillus larvae* (Goodwin i Eaton, 2002)



Uzročnik se može naći u dva oblika - vegetativnom, u inficiranoj larvi i sporogenom u uginuloj larvi, medu i drugim sredinama. Novija istraživanja su pokazala da uzročnik američke kuge može biti prisutan u košnici godinu i više dana, a da nema izraženih kliničkih simptoma bolesti (Hansen, 1984a; Hansen, 1984b; Hansen i Rasmussen, 1986; Werner, 2003).

Ritter (2003) na osnovu provedenih istraživanja ukazuje na značaj ranog otkrivanja američke kuge pčelinjeg legla analizom meda i voska na prisustvo spora *Paenibacillus larvae*. Pregled meda kao uzorka hrane na spore *Paenibacillus larvae* je usvojen kao obavezan dijagnostički metod u propisima u Nemačkoj koji se odnose na

infektivna oboljenja pčela. Isti autor iznosi da su na osnovu dobijenih rezultata pčelinja društva podelili u 2 kategorije, jednu sa manje od 5.000 spora/g meda i drugu sa više od 5.000 spora/g meda. U prvoj grupi 2% pčelinjih društava je imalo izražene i kliničke simptome bolesti, dok u drugoj grupi kliničke simptome bolesti (prošarano leglo, nazubljeni, ulegnuti poklopci tamne boje i larva boje čokolade, rastegljive mase) je imalo čak 88% pčelinjih društava.

Redovnim pregledom pčelinjih društava, po Programu mera zdravstvene zaštite životinja i na zahtev veterinarske službe po utvrđivanju zaraze, izvršen je pregled 253 uzorka pčelinjeg legla u periodu od 2002. do septembra 2007. godine.

Naša istraživanja su bazirana na ispitivanju raširenosti spora *Paenibacillus larvae* metodom rane detekcije, u okolini zaraženog pčelinjaka kao i prisustvo rezidua antibiotika u medu koji ne deluju na sporogenu formu uzročnika PLL, a predstavljaju veliku opasnost za ljude.

## MATERIJAL I METOD RADA

Redovnim pregledom po Programu mera zdravstvene zaštite životinja i po ugovornoj saradnji vrši se pregled pčelinjih društava na prisustvo američke kuge.

Ogled je obavljen na prirodno ograničenom lokalitetu, reka Dunav i padina Fruške gore. U pčelinjaku koji je imao 17 košnica američka kuga je utvrđena u 5 društava kliničkim i laboratorijskim pregledom. Svih 5 društava je spaljeno, sače i pčele, a med odstranjen za ljudsku upotrebu. Ostala društva na pčelinjaku su detaljno pregledana, još jedno društvo je spaljeno iako nije pokazivalo klinički znake bolesti, jer je dosta slabo. Od svih društava iz pčelinjaka uzeti su uzorci, isečak sača sa medom, veličine 10x10 cm, za laboratorijsku analizu i utvrđivanje spora *Paenibacillus larvae* u medu Hansenovom metodom.

Ostali pčelinjaci u okolini, ukupno 12, sa 613 pčelinjih društava, su detaljno klinički pregledani, svaki ram sa leglom je detaljno analiziran, i iz svakog pčelinjaka slobodnim izborom je uzeto oko 10% uzorka sača sa medom za pregled na prisustvo spora *Paenibacillus larvae*. Ukupno su laboratorijski pregledana 82 uzorka meda u saču. Isti uzorci su pregledani i na prisustvo (rezidue) antibiotika.

## Postupak u laboratoriji: Hansenov metod

Podloga (medijum) za ovo ispitivanje sadrži: 20 g agar, 5 g triptona, 15 g ekstrakta kvasca, 3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 2 g glukoze po jednom litru demineralizovane vode. Medijum je sterilisan u autoklavu na 121°C u trajanju od 15 minuta. U petrijevu ploču sipa se 20 ml pripremljenog medijuma u aseptičnim uslovima. Od svakog uzorka meda koji se ispituje uzima se najmanje 5 g u sterilnu staklenu posudu i zagreva u vodenom kupatilu na 88-92°C 5 minuta, a zatim se od ovakvog uzorka vrši zasejavanje na 3 petri ploče sa pripremljenim medijumom, tako što se uzima po 80 mg meda standardnom platinskom ezom i ubičajeno raznese po svakoj ploći. Petri ploče se zatim stavljuju u termostat na 36°C na inkubaciju u trajanju od 6 do 11 dana. Izrasle kolonije *Paenibacillus larvae* se identifikuju makroskopskim pregledom

(kolonije u vidu tipičnog cvetanja), mikroskopskim ispitivanjem, bojenjem po Gramu i katalaza testom. Uključeni su i dodatni testovi sa indolom, glukozom, arabinozom, ksilozom, manitolom i test rasta na 40°C. Za određivanje stepena kontaminacije meda sporama *Paenibacillua larvae* broje se izrasle kolonije na ploči nakon 5 dana. Svaka kolonija predstavlja 6.000 spora/g meda. Ukoliko ima više od 20 izraslih kolonija one se ne broje, već se procenjuje da je med visoko kontaminiran i da ima više od 120.000 spora u 1 g meda.

### **Metoda dokazivanja rezidua antibiotika u medu**

Ispitivanje antibiotika u medu vršeno je skrining mikrobiološkom metodom sa pozitivnim test mikroorganizmom *Bacillus subtilis* (BGA) prema Program i metode interlaboratorijske kontrole, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.

Uzorak meda koji se ispituje prethodno se inaktivise u vodenom kupatilu na 80°C 10 minuta. Podloga se ohladi na 45°C, na 100 ml podloge doda se 2 kapi kulture *Bacillus subtilis*, stare 24 časa. U petri ploču se razliva po 10 ml podloge da bi debljina podloge bila 2 mm. Kada podloga očvrsne, izbuše se četiri otvora prečnika 10 mm. U otvore se stavi po 100 ml uzorka razblaženog sa puferom pH 6 (med : pufer = 1 : 1,5). Ploče sa uzorkom se stavlju u frižider na +4 – 5°C dva časa. Iza toga ploče se inkubiraju na 37°C 12 do 18 časova.

#### Čitanje rezultata

Ako su u uzorku prisutne antimikrobne aktivne rezidue antibiotika u zoni difuzije ekstrakta meda u podlogu, neće se primetiti rast test mikroorganizma – uočiće se zona inhibicije. Širina zone inhibicije se meri od ivice otvora u agaru do granice rasta test mikroorganizma.

## **REZULTATI I DISKUSIJA**

Redovnim pregledom po Programu mera zdravstvene zaštite životinja i po ugovornoj saradnji vrši se pregled pčelinjih društava na prisustvo američke kuge što je prikazano u tabeli 1.

Tabela 1. Broj pregledanih i pozitivnih uzoraka američke kuge pčelinjeg legla

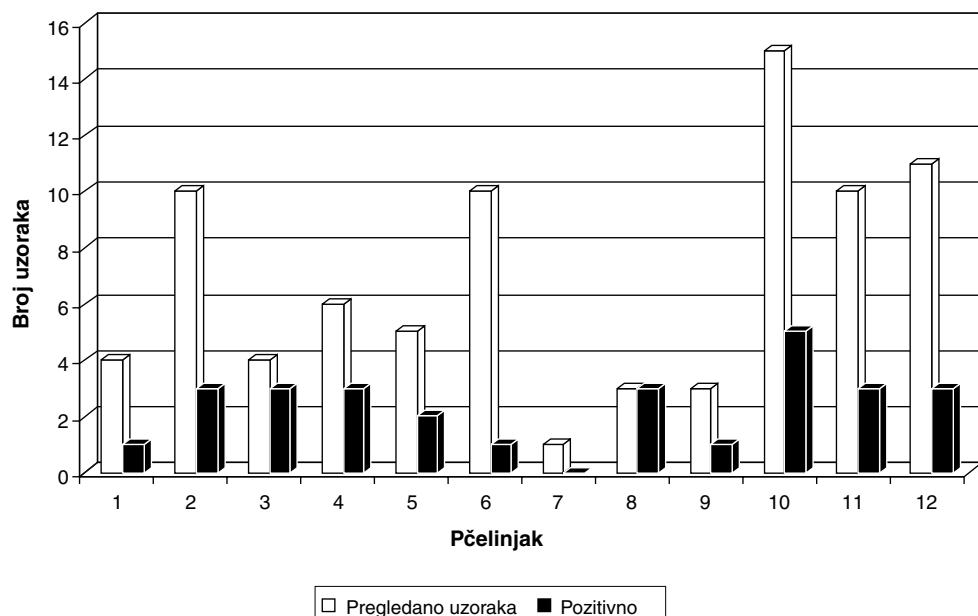
Godina	Broj opština	Broj pregledanih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka	%
2002.	5	9	2	22,2
2003.	7	45	0	0
2004.	4	26	1	3,84
2005.	5	64	14	21,8
2006.	9	64	24	37,5
2007.	6	45	9	20,0
UKUPO	36	253	50	19,76

Tabela 2. Raširenost spora *P. larvae*

Pčelinjak br.	Broj košnica u pčelinjaku	Pregledano uzoraka u laboratoriji	Pozitivno na spore <i>P. larvae</i>
1.	41	4	1
2.	107	10	3
3.	27	4	3
4.	47	6	3
5.	48	5	2
6.	45	10	1
7.	27	1	0
8.	29	3	3
9.	17	3	1
10.	105	15	5
11.	109	10	3
12.	11	11	3
?	<b>613</b>	82	28

Iz prikazanih rezultata dobijenih ispitivanjem prisustva *P. larvae* u medu na pčelinjacima u neposrednoj blizini zaraženog društva može se videti da je ovaj metod epizootiološki veoma značajan. Iz tabele 2 se vidi da je izvršen klinički pregled u 613 pčelinjih društava pri čemu je od 82 društva uzet uzorak za laboratorijski pregled na prisustvo spora *P. larvae* i rezidue antibiotika.

#### Raširenost spora *P. larvae*



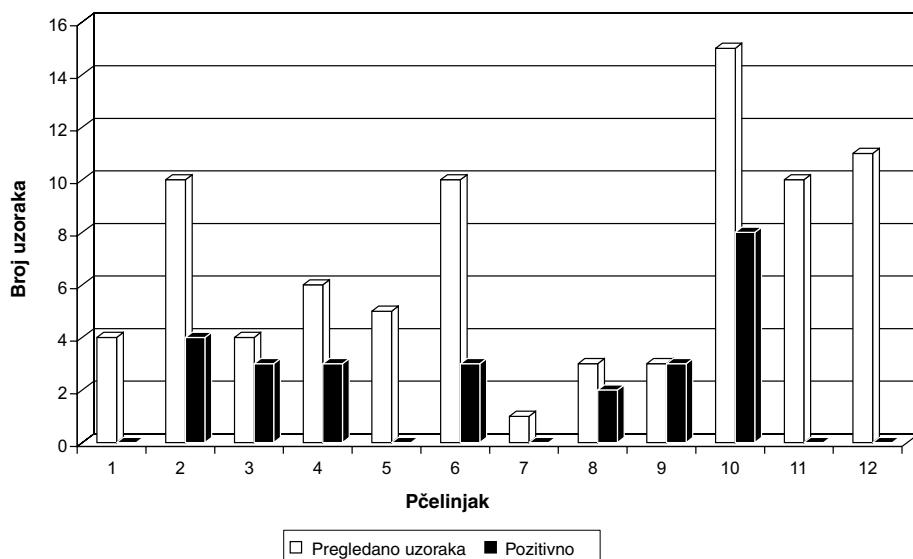
Dobijeni rezultati (tabela 2) ukazuju da su spore nađene u 28 pčelinjih društava (34,15%) i to u 17 uzoraka na ploči su izrasle po 2 kolonije, u 8 uzorka po 3 kolonije, u 2 uzorka po 9 kolonija, a samo u 1 uzorku je bilo 11 izraslih kolonija. Raširenost spora *Paenibacillus larvae* na pčelinjaku u neposrednoj blizini zaraženog društva je veoma značajno. Rezidue antibiotika (tabela 3) su utvrđene u 26 uzoraka od ukupno 82 pregledana (odnosno 31,70 %).

Tabela 3. Prisustvo rezidua antibiotika u ispitivanim medovima

Pčelinjak broj	Broj košnica u pčelinjaku	Pregledano uzorka u laboratoriji	Pozitivno na rezidue antibiotika
1.	41	4	0
2.	107	10	4
3.	27	4	3
4.	47	6	3
5.	48	5	0
6.	45	10	3
7.	27	1	0
8.	29	3	2
9.	17	3	3
10.	105	15	8
11.	109	10	0
12.	11	11	0
?	<b>613</b>	82	26

Hansen i Rasmussen (1986) su ispitivali prisustvo spora u pčelinjaku gde nije bilo znakova američke kuge i od 521 pregledanih uzoraka spore su utvrđene u 47 uzoraka (9,1%), dok je u 11 uzoraka uzetih iz pčelinjaka sa izraženim kliničkim simptomima spora bilo čak u 9 uzoraka (81,8%). U toku ovih istraživanja potvrđena je kontaminacija meda sporama *Paenibacillus larvae* čak 6 godina pre pojave kliničkih znakova bolesti.

### Prisustvo rezidua antibiotika u ispitivanim medovima



Na osnovu značajnih literaturnih podataka, kao i naših istraživanja, vidimo da je problem prisustva spora *Paenibacillus larvae* u pčelinjim društima veoma značajan. Spore *Paenibacillus larvae* mogu biti prisutne u pčelinjem društvu u velikom broju, čak do 15 miliona, a da klinički znaci bolesti nisu izraženi (Hornitzku i Clark, 1993). Sama klasifikacija pčelinjih društava prema izraslom broju spora na hranljivoj podlozi (cfu) je dosta različita, što znači da još nije precizno utvrđeno koji broj spora i za koji vremenski period sigurno dovodi do pojave američke kuge.

### ZAKLJUČAK

Američka kuga pčelinjeg legla prisutna je u 50 pčelinjih društava, odnosno u 19,76% ispitanih uzoraka, u periodu od 2002. do septembra 2007. godine na epizootiološkom području Južnobačkog i Sremskog okruga.

Na osnovu rezultata rane dijagnostike spora *Paenibacillus larvae* u medu Hansenovom metodom utvrđeno je da je raširenost spora *Paenibacillus larvae* nađena kod 34,50% ispitanih pčelinjih društava, dok su rezidue antibiotika potvrđene kod 31,70% društava. Sve ovo ukazuje da je američka kuga značajno raširena u našoj zemlji, a da se antibiotici vrlo često nekontrolisano koriste u suzbijanju ove bolesti iako se pouzdano zna da antibiotici ne deluju na sporu, a ostavljaju tretirana društva kao trajan izvor zaraze, a ostale veoma poželjne i dragocene pčelinje proizvode čine neupotrebljivim.

Neophodno je prihvatići činjenicu da redovan pregled i rana dijagnostika bolesti, uz dobru pčelarsku praksu, predstavljaju pravo i trajno rešenje za dobrobit i razvoj pčelarstva u našoj zemlji.

## LITERATURA

1. Đuričić, B., Obrenović S., Milošević, B., Radojčić S.: Upotreba antibiotika u mednim pogačama i njihov uticaj na raširenost američke kuge pčelinjeg legla. U: Radovi III. Savetovanja o lekovima za upotrebu u veterini. Igalo, 47-51, 1997.
2. Đuričić B., Ilić Z., Bošnjak M., Plavša N.: Epizootiološka slika američke kuge pčelinjeg legla sa posebnim osvrtom na moguće greške u terapiji. U: Zbornik plenarnih referata. I Savetovanje o biologiji i zdravstvenoj zaštiti pčela. Beograd, 1-7, 2001.
3. Goodwin, M., Eaton, C. V.: Symptoms of American Foulbrood. A Practical Manual for Beekeepers. Pest menagement Strategy – Elimination of American Foulbrood Without the use of Drugs. ([www.beekeeping.co.nz/disease](http://www.beekeeping.co.nz/disease)), 2002.
4. Hansen, H.: Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium *Bacillus* larvae in honey. *Dan. J Plant Soil Sci* 88, 325-328, 1984a.
5. Hansen H: The incidence of the foulbrood bacterium *Bacillus* larvae in honeys retailed in Denmark. *Dan J Plant Soil Sci* 88, 329-336, 1984b.
6. Hansen, H. Rasmussen, B: The investigation of honey from bee colonies for *Bacillus* larvae. *Tidsskrift for Planteavl* 90, 81-86, 1986.
7. Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N. A., Ali, N., and Berkelay, R. C.: Reclassification of *Paenibacillus* (former *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984), Ash et al.1994. a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) larvae (White 1906). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, pp. 270-279, 1996.
8. Hornitzky M. A. Z., Clark, N.: Honey bee diseases. In: Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases. Commonwealth Scientific and Industrial Research. Victoria, Australia, 3-7, 1993.
9. Ritter W.: Early detection of American Foulbrood by honey and wax analysis. *Apicta* 38, 125-130, 2003.
10. Werner von der Ohe: Efficient prophylactic measures against AFB by bacterial analysis of honey for spore contamination. *Am. Bee Journal* 137, (8), 177-191, 1997.
11. White, G. F.: The bacteria of the apiary, with special reference to bee diseases. United States Department of Agriculture. Bureau of Entomology. Technical Series 14, 1906.

Primljeno: 10.02.2009.

Odobreno: 03.03.2009.



# Titar antitela protiv antigena spermatozoida bika u krvnom serumu krava i junica sa različitim brojem osemenjavanja

Aleksandar Milovanović,<sup>1\*</sup> Rad je delimično finansiran od strane MNT Republike Srbije po osnovu zadatka iz projekta ON 111998. Miodrag Lazarević,<sup>2</sup> Danijela Kirovski,<sup>2</sup> Milovan Jovičin,<sup>1</sup> Tomislav Barna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Rumenački put 20, Novi Sad

<sup>2</sup>Fakultet veterinarske medicine, Beograd

## Kratak sadržaj

U okviru ovog rada prikazani su rezultati dobijeni određivanjem titra antitela IgA i G klase protiv antigena spermatozoida i razređivača za spermu bikova metodom indirektne imunofluorescencije u krvnom serumu krava i junica. Za izvođenje testa korišćeni su spermatozoidi pripremljeni za veštačko osemenjavanje suspendovanjem u TRIS-žumančanom i bilnjom razređivaču „Biociphos+”. Ispitivane plotkinje su bile podeljene u četiri grupe na osnovu ukupnog broja osemenjavanja tokom života: neosemenjene junice; krave i junice osemenjene 1-5 puta; 6-10 puta i grla koja su za života osemenjene više od 10 puta. Dobijeni rezultati jasno ukazuju da postoji sistemski humorali odgovor imunološkog sistema plotkinja na spermatozoide i/ili sastojke razređivača. Titar ukupnih antispermalnih antitela raste sa brojem osemenjavanja. Ovaj porast posledica je povećanja titra antispermalnih antitela IgA klase. Antitela protiv spermatozoida klase IgG, po svemu sudeći nemaju značajniji efekat u ovom smislu.

Ključne reči: spermatozoidi, antitela, junice, krave, plodnost

\* e-mail: aca@niv.ns.ac.yu

# **Antibody titer against spermatozoal antigens of bulls in blood sera of cows and heifers with different number of insemination**

Aleksandar Milovanović,<sup>1</sup> Miodrag Lazarević,<sup>2</sup> Danijela Kirovski,<sup>2</sup> Milovan Jovičin,<sup>1</sup> Tomislav Barna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific Veterinary Institue „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20.

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, Belgrad

## **Abstract**

In this paper are presented the results obtained by determining antibody titar of IgA and IgG class against spermatozoal antigens and extenders for bull's semen using the method of indirect immunofluorescence in blood sera of cows and heifers. Spermatozoids, prepared for artificial insemination, were suspended in TRIS egg yolk and herbal „Biociphos+” extender. Animals were divided in four groups according to the number of total inseminations in their life: virgin heifers; cows and heifers inseminated 1-5 times; 6-10 times inseminated cows and cows inseminated more than 10 times. The obtained results clearly point that there is a system humoral response of the immune system towards spermatozoids and/or semen extender. Titers of total antisperm antibodies increase with the number of inseminations. This increase is a consequence of increased titer of antisperm antibodies of the IgA class. Obviously, antibodies against spermatozoids of the IgG class have no important influence.

Key words: spermatozoids, antibodies, heifers, cows, fertility

## **UVOD**

Krave sa asimptomatskim sterilitetom su jedinke koje nisu ostale steone nakon tri i više uzastopna osemenjavanja, pri čemu ispoljavaju normalne intervale između estrusa, imaju najmanje jedno teljenje kako bi se isključile eventualne anomalije na genitalnom traktu, mlađe su od 10 godina, nemaju znakove kliničkih promena niti patološki iscedak prilikom rektalnog pregleda genitalnih organa (Tanabe i Casida, 1949). Grla koja povađaju, nesumnjivo postavljaju najzahtevniju kauzalnu analizu za stručnjake iz oblasti reprodukcije. Uzroci povađanja mogu biti posledica nesinhronizovanosti hormona, povećane stope abnormalnih embriona, patologije materice sa histološki vidljivim lezijama, teškoće u otkrivanju estrusa (Youngquist i Bierschwal, 1985).

Problem prisustva specifičnih antitela u cervikalnoj sluzi i krvnom serumu krava je nedovoljno istražen, a često zanemaren u veterinarskoj medicini. Kanchev i sar. (1993) i Max (1990) saopštavaju da je 3,3%, odnosno 4,5% krava neplodno zbog prisustva visokog titra ASA (antispermatozoalnih antitela). Wang i Xie (1990) su ispitivali 119 neplodnih krava dokazali prisustvo ASA kod 43 krave (36%), u odnosu na 3,8% kod gravidnih krava. Ovi autori su zaključili da se visok titar ASA može dokazati i kod steonih krava ali je očigledno da se samo kada je titar ASA visok i u serumu i u lokalnom tkivu ispoljava negativan uticaj na plodnost. Seshagiri i sar. (1987) su utvrdili ASA kod 59,4% krava koje ponovo dolaze u ciklus (povađaju) i 14,5% kod krava sa normalnom plodnošću. U ispitivanjima Farahanija i sar. (1981) je utvrđeno da se u serumu krava koje su povađale, steonih krava i steonih junica zastupljenost ASA nalazi u 26%, 32%, odnosno 0%.

Poznato je da se pojedine komponente iz sastava razređivača tako čvrsto vezuju za membranu spermatozoida da se praktično ne mogu kasnije odvojiti (Cookson i sar., 1984). Antitela protiv antigaena razređivača dovode do smanjenog fertiliteta kod eksperimentalnih životinja i kod goveda (Hunter i Alsum, 1969; Swanson i Hunter, 1969; Griffin i sar., 1974; Coulter i sar., 1976). Dokazano da se kod svega 3% krava sa normalnim reproduktivnim pokazateljima u serumu nalaze antitela protiv antigaena žumančanog razređivača, dok je u grupi krava koje povađaju taj procenat 29%. U istoj studiji utvrđeno je da 67% jedinki koje povađaju ima antitela na antigene razređivača u cervikalnoj sluzi (Coulter i sar., 1976).

### **Imunski odgovor u ženskom genitalnom traktu**

Sekretorna antitela klase A su osnovni imunoglobulini u suzama, pljuvački i kolostrumu, kao i u sekretima respiratornog, gastrointestinalnog i reproduktivnog trakta. Lokalni sekretorni sistem postoji u ženskom reproduktivnom traktu što dokazuje i prisustvo plazma ćelija koje proizvode IgA u jajovodu, cerviku i vagini (Kutteh i Mestecky, 1996). U sekretu iz lumena materice dominira nalaz imunoglobulina klase G, a u vagini IgA. Samo se deo od ukupnih IgG<sub>1</sub> koji se nalaze u materičnoj sluzi sintetiše lokalno u endometrijumu, a preostali deo IgG<sub>1</sub> kao i ukupan IgG<sub>2</sub> pristiže iz lokalnog krvotoka materice (Chacin i sar., 1990).

Postoji veliki broj podataka koji ukazuju na lokalnu proizvodnju ASA u genitalnom traktu, iako antitela nisu prisutna u krvi. Pre svega nastaju imunoglobulini klase A (Bronson, 1999). Kutteh i sar. (1988, 1990) ukazuju da će, ukoliko se sprovode samo serološka ispitivanja u dijagnostici imuniteta protiv spermatozoida, rezultati imati pogrešna tumačenja u velikom procentu slučajeva. Danas prevlađuje stanovište da prisustvo humorálnih antitela protiv spermatozoida nije relevantan pokazatelj poremećaja plodnosti, sve dok se ne dokaže prisustvo antitela u reproduktivnom traktu.

Lazarević i sar. (1996) su ispitivali titar spermaglutinina u serumu i cerviko-vaginalnoj sluzi kod 29 junica i 35 krava crno-bele šarene rase metodom aglutinacije u želatinu (eng. Kibrick-Belding-Meril test - KBM). U krvnom serumu,

od ispitanih 29 krava, kod 14 (48,2%) zabeležen je titar spermaglutinina 1:1024, dok je u istoj grupi to bilo kod svega 8,5% junica. Slični rezultati su dobijeni ispitivanjem cerviko-vaginalne sluzi, gde je broj junica sa nultim titrom bio značajno veći nego kod krava (9 junica i jedna kava), dok je 9 krava (31%) imalo titar spermaglutinina 1:16, u poređenju sa 5 junica (14,3%). Očigledno je da kod krava u toku ponovljenih osemenjavanja postoji tendencija povećanja titra spermaglutinina, ali se imunski subfertilitet ne može procenjivati samo na osnovu ovog parametra.

Usled unakrsnih reakcija sa obiljem mikroflore, pogotovo kod preživara, očekuje se postojanje „prirodnih” ASA koje, po svemu sudeći, nemaju uticaj na reprodukciju, osim ukoliko su prisutne u serumu u visokom titru i dospeju u cervicalni sekret, kada mogu da spreče koncepciju kod krava i junica (Bratanov i sar., 1975). Kod većine jedinki se očekuje porast titra ASA sa povećanjem broja osemenjavanja, sve do postizanja nivoa koji bi mogao da ugrozi plodnost. Svakako da dokaz ASA u serumu ili čak u genitalnom traktu ne podrazumeva sigurnu neplodnost, ali su mogućnosti za oplodnju smanjene. Imunitet na spermatozoide ne funkcioniše po mehanizmu „sve ili ništa” (Schumacher, 1988), pa ga treba prihvati kao relativni, a ne kao apsolutni uzrok steriliteta.

Cilj ovog rada je da se kod većeg broja plotkinja holštajn-frizijske rase (oko 200) utvrdi korelacije između titra antispermatozoalnih antitela klase IgA i IgG u uzorku krvnog seruma protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču i „Biociphos+” (IMV, Francuska), u zavisnosti od ukupnog broja osemenjavanja.

## MATERIJAL I METODE RADA

Našim ispitivanjima je bilo obuhvaćeno 181 krava i 20 junica holštajn-frizijske rase. Krave i junice su bile locirane na tri govedarske farme koje su u proseku imale po 600 grla. Uzorkovanje krvi punkcijom *v. jugularis* vršeno je na dan osemenjavanja. Krvi serumi čuvani su na -20°C do momenta ispitivanja. Titar je određivan metodom indirektne imunofluorescencije po Noel-u i sar. (1974), a za izvođenje testa su korišćeni spermatozoidi iz pajeta za VO prethodno suspendovani u TRIS-žumančanom razređivaču i razređivaču „Biociphos+” (IMV, Francuska). Većina plotkinja od kojih su uzimani uzorci za ova ispitivanja je već imala kontakt sa spermatozoidima suspendovanim u obe vrste razređivača.

Za dokazivanje prisustva antispermatozoalnih antitela IgG klase korišćena su komercijalna antiantitela (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA; Cat. <sup>1</sup> 654 421), konjugovana fluorescein izotiocijanatom (Fluorescein S Isothiocyanate - FITC Conjugated, Sigma; Cat. <sup>1</sup> 222-042-0). Za dokazivanje prisustva antispermatozoalnih antitela IgA klase korišćena su komercijalna antiantitela (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA; Cat. <sup>1</sup> 641 751).

Očitavanje uzoraka vršeno je na fluorescentnom mikroskopu (Olympus, BX-40, Japan) sa B-2A filterom i uvećanjem od 400×. Pojava izražene fluorescencije glave, vrata ili repa smatrana je pozitivnim rezultatom. U slučaju pozitivne reakcije sa

antiantitelima klase G, fluorescencija je obično vidljiva na akrozomu, dok je kod antiantitela klase A fluorescencija izražena na vratu i repu spermatozoida. Vrednosti titra antispermatozoalnih antitela su izražene kao  $-\log_2 n$  ( $1:2 = 1$ ,  $1:4 = 2$  itd.) prema Sjurin-u i sar. (1984). Stepen statističke značajnosti razlika između srednjih vrednosti je određivan Mann-Whitney i LSD testom pomoću statističkog programa Statistica 5 (Poljoprivredni fakultet, Novi Sad).

## REZULTATI I DISKUSIJA

U tabeli 1, 2, 3. i 4. prikazani su prosečan titar ASA IgG i IgA klase protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (T) i „Biociphos+“ (B) u krvnom serumu junica i krava, u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja. Statistička ocena značajnosti utvrđenih razlika između srednjih vrednosti prikazana je u Grafikonu 1 i 2.

Tabela 1. Prosečan titar IgG antitela protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (IgG-T) u krvnom serumu junica i krava, u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja

Broj veštačkih osmenjavanja - V0		Ig G-T u krvnom serumu ( $-\log_2 n$ )					
		N	$\bar{x}$	SD	Sx	CV%	I.V.
(J)	V0 0	20	2,15	1,09	0,24	50,67	0-4
(K)	V0 1-5	69	2,72	1,96	0,24	72,01	0-8
(K)	V0 5,1-10	60	2,22	1,50	1,50	67,52	0-5
(K)	V0 10,1>	52	2,46	1,71	0,24	69,42	0-6

J - junice; K - krave

Srednja vrednost titra IgG protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (T) najniža je kod junica ( $2,15 \pm 1,09$ ), a najviša kod krava koje su osemenjene od 1-5 puta ( $2,75 \pm 1,96$ ). Može se uočiti da su standardne devijacije u svim grupama plotkinja niske ( $1,09-1,96$ ). Primenom Mann-Withney testa nisu uočene statistički značajne razlike titra ASA klase IgG u krvnom serumu ( $p > 0,05$ ) junica i krava, kada su za izvođenje reakcije korišćeni spermatozoidi bikova prethodno suspendovani u TRIS-žumančanom razređivaču.

Tabela 2. Prosečan titar IgG protiv spermatozoida u krvnom serumu junica i krava, suspendovanih u „Biociphos+” razređivaču (IgG-B) u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja

Broj veštačkih osmenjavanja - V0		Ig G-T u krvnom serumu (-log <sub>2</sub> n)					
		N	$\bar{x}$	SD	S <sub>x</sub>	CV%	I.V.
(J)	V0 0	20	2,50	0,95	0,21	37,84	0-4
(K)	V0 1-5	69	2,25	1,69	0,20	75,35	0-6
(K)	V0 5,1-10	60	2,07	1,58	0,20	76,57	0-5
(K)	V0 10,1 i >	52	2,10	1,83	0,25	87,23	0-6

J - junice; K - krave

Srednje vrednosti titra IgG protiv spermatozoida suspendovanih u razređivaču „Biociphos+” najviše su kod junica ( $2,50 \pm 0,95$ ), a najniže kod krava koje su osemenjavane 5,1-10 puta ( $2,07 \pm 1,83$ ). Sve izračunate srednje vrednosti za ovaj parametar kretale su se u uskom opsegu od 2,07-2,50, tako da je standardna devijacija 0,95-1,83. Takođe se i ovde, primenom Mann-Withney testa nisu uočene statistički značajne razlike titra ASA.

Tabela 3. Prosečan titar IgA protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (IgA-T) u krvnom serumu junica i krava, u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja

Broj veštačkih osmenjavanja - V0		Ig G-T u krvnom serumu (-log <sub>2</sub> n)					
		N	$\bar{x}$	SD	S <sub>x</sub>	CV%	I.V.
(J)	V0 0	20	2,60	1,19	0,27	45,68	0-4
(K)	V0 1-5	69	4,30	2,69	0,32	62,40	0-12
(K)	V0 5,1-10	60	4,70	2,83	0,37	60,22	0-12
(K)	V0 10,1 i >	52	5,23	2,91	0,40	55,59	0-10

J - junice; K - krave

Srednje vrednosti titra IgA u krvnom serumu protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (T) pokazuju tendenciju konstantnog rasta sa povećanjem broja osemenjavanja. Najniže vrednosti su zabeležene u krvnom serumu junica koje nisu osemenjane ( $2,60 \pm 1,19$ ), a najviše kod krava koje su osemenjene više od 10 puta ( $5,23 \pm 2,91$ ).

Ustanovljena je visoko statistički značajna razlika kada se uporede junice sa kravama koje su osemenjene 1-5 puta (p 0,01), dok je razlika vrlo visoko statistički značajna između neosemenjenih junica i krava koje su osemenjene 5,1-10 i krava osemenjenih više od 10 puta (p 0,001). Najmanja statistički značajna razlika postoji između grupa krava koje su osemenjene 1-5 puta i više od 10 puta (p 0,05).

Tabela 4. Prosečan titar IgA protiv spermatozoida suspendovanih u razređivaču „Biociphos+” (IgA-B) u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja u krvnom serumu junica i krava

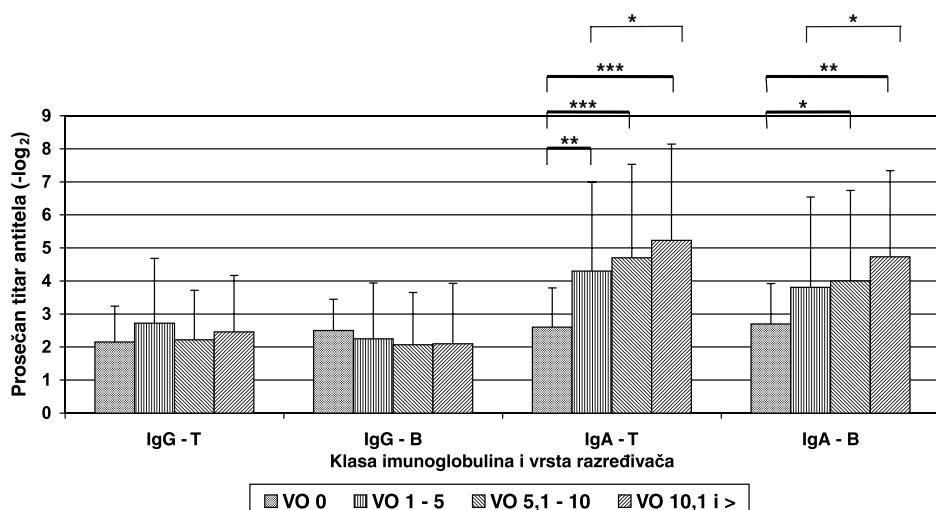
Broj veštačkih osemenjavanja - VO		Ig G-T u krvnom serumu (-log <sub>2</sub> n)					
		N	$\bar{x}$	SD	S <sub>x</sub>	CV%	I.V.
(J)	VO 0	20	2,70	1,22	0,27	45,12	0-4
(K)	VO 1-5	69	3,81	2,73	0,33	71,61	0-11
(K)	VO 5,1-10	60	4,00	2,74	0,35	68,43	0-12
(K)	VO 10,1 i >	52	4,73	2,61	0,36	55,08	0-9

J - junice; K - krave

Srednje vrednosti titra IgA u krvnom serumu protiv spermatozoida suspendovanih u „Biociphos+“ pokazuju istovetnu tendenciju povećanja titra sa brojem osemenjavanja, kao u slučaju spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču (T) (tabela 4.). Najniže vrednosti su zabeležene u krvnom serumu junica koje nisu osemenjavane ( $2,70 \pm 1,22$ ), a najviše kod krava koje su osemenjene više od 10 puta ( $4,73 \pm 2,61$ ).

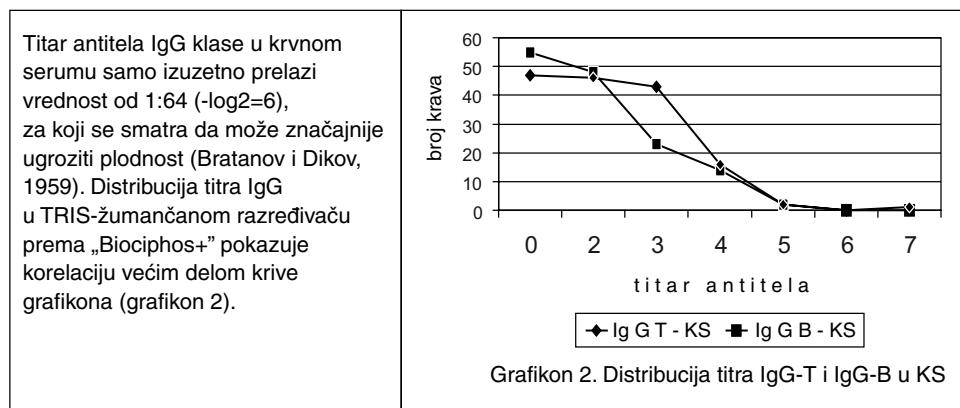
Statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima titra ustanovljena je između neosemenjenih junica i krava koje su osemenjene od 5,1-10 (p 0,05), kao i kod grupe krava osemenjenih 1-5 puta i krava sa 10,1 osemenjavanja, dok je ova razlika visoko statistički značajna kada se uporede junice sa kravama osemenjenim 1-5 puta (p 0,01).

Na grafikonu 1 prikazani su rezultati dobijeni ispitivanjem prosečnog titra antitela IgG i IgA klase protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom (T) i „Biociphos+“ (B) razređivaču u krvnom serumu junica i krava, u zavisnosti od broja ukupnih osemenjavanja.



Grafikon 1. Prosečan titar antitela IgG i IgA klase protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom (T) i „Biociphos+“ (B) razređivaču u zavisnosti od broja ukupnog osemenjavanja u krvnom serumu junica i krava

Iz podataka prikazanih na grafikonu 1 zapaža se da ne postoje statistički značajne razlike u srednjim vrednostima titra ASA klase IgG u krvnom serumu ( $p > 0,05$ ) junica i krava, kada su za izvođenje reakcije korišćeni spermatozoidi bikova prethodno suspendovani u TRIS-žumančanom i „Biociphos+“ razređivaču.



Međutim, razlike u srednjim vrednostima titra ASA klase IgA u krvnom serumu na spermatozoide suspendovane u TRIS-žumančanom razređivaču su visoko statistički značajne kada se uporede virgilne (još neosemenjene) junice sa kravama koje su osemenjene 1-5 puta ( $p < 0,01$ ), dok je razlika vrlo visoko statistički značajna između neosemenjenih junica i grupe krava koje su osemenjavane 5,1-10 puta, kao i između neosemenjenih junica i krava koje su osemenjene više od 10 puta ( $p < 0,001$ ).

Razlike su statistički manje izražene između grupa kada se razmotre vrednosti pri upotrebi spermatozoida bikova prethodno suspendovanih u „Biociphos+“ razređivaču. Statistička značajnost je ustanovljena između virgilnih junica i krava koje su osemenjene od 5,1-10 puta i krava sa 1-5 i 10,1 i više osemenjavanja ( $p < 0,05$ ). Ova razlika je visoko statistički značajna kada se uporede junice sa kravama osemenjenim 10,1 i više puta ( $p < 0,01$ ). Najniže vrednosti titra (-log<sub>2</sub> n) su zabeležene u krvnom serumu junica koje nisu osemenjavane ( $2,70 \pm 1,22$ ), a najviše kod krava koje su osemenjene više od 10 puta ( $4,73 \pm 2,61$ ).

Posmatrajući sa aspekta da je kritična koncentracija ASA koja može da ugrozi uspeh oplopljenje i razvoj zametka viša od 1:64 (-log<sub>2</sub>=6); (prema Bratanovu i Dikovu, 1959), izvršena je trijaža krava na osnovu visine ASA IgA klase protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom razređivaču i „Biociphos+“ u krvnom serumu (Milovanović, 2005). Visoka statistička značajnost razlika postojala je u dužini servis perioda. Grla sa nižim titrom imala su prosečnu dužinu servis perioda od  $185,18 \pm 107,35$  dana, u odnosu na krave sa titrom većim od 1:64, gde je servis period iznosio  $243,64 \pm 126,21$  dan (TRIS-žumančani razređivač,  $p < 0,05$ ). Slične vrednosti su dobijene za dužinu servis perioda kada su korišćeni spermatozoidi suspendovani u

razređivaču „Biociphos+”. Razlika u broju osemenjavanja u poslednjem ciklusu je visoko statistički značajna između ove dve grupe ( $2,33 \pm 1,46$  :  $3,84 \pm 2,46$ ; p 0,01), a vrlo visoko statistički značajna prema broju osemenjavanja po steonosti ( $3,65 \pm 2,14$  :  $4,40 \pm 2,04$ ; p 0,001) i ukupnom broju osemenjavanja ( $7,85 \pm 5,22$  :  $10,36 \pm 5,16$ ; p 0,001), kada su se kao antigeni koristili spermatozoidi suspendovani u TRIS-žumančanom razređivaču.

Jaćević i sar. (1999) koji su utvrdili da se stepen aglutinacije spermatozoida antitelima iz krvnog seruma i cervicalne sluzi junica i krava u većini uzoraka značajno smanjuje kada se za izvođenje testa upotrebe spermatozoidi prethodno suspendovani u razređivač pod komercijalnim nazivom „Biociphos+”. Plotkinje od kojih su uzimani uzorci za ova ispitivanja bile su isključivo osemenjavane spermatozoidima suspendovanim u TRIS-žumančanom razređivaču. U našem ispitivanju većina plotkinja je imala kontakt sa spermatozoidima suspendovanim u obe vrste razređivača. Jasnija saznanja o uticaju vrste razređivača na visinu stvorenih antitela postigla bi se formiranjem grupa plotkinja koje bi bile osemenjavane samo spermatozoidima suspendovanim u pojedinim razređivačima.

Ovi rezultati jasno ukazuju da postoji sistemski humorali odgovor imunološkog sistema plotkinja na spermatozoide i/ili sastojke razređivača. Porast vrednosti ASA u krvnom serumu proporcionalan je broju VO, što je u saglasnosti sa drugim autorima (Griffin i sar., 1973; Vukotić, 1986; Jaćević, 1998; Lazarević i sar., 2003). Na osnovu rezultata naših ispitivanja može se zaključiti da je ovaj porast posledica povećanja titra ASA IgA klase. Antitela protiv spermatozoida klase IgG, po svemu sudeći nemaju značajniji efekat u ovom smislu.

Kako titar ASA raste sa povećanjem broja osemenjavanja i narušavanjem plodnosti, uspostavlja se „začarani krug”. Iz tog razloga, Zralý i sar. (2003) savetuju da se plotkinje osemenjavaju tek nakon potpunog izlečenja puerperalnih oboljenja i saniranja endometrijalnih lezija. Grla koja su bila uključena u naš ogled su u proseku imala visok indeks osemenjavanja, produžen servis period, sa dosta rutinskih tretmana u vidu ispiranja materica. Ovo su predisponirajući faktori koji kod izvesnog broja plotkinja sa znatno produženim servis periodom omogućavaju ulazak u „začarani krug”, gde sa srazmerno većim brojem osemenjavanja nalazimo signifikantno viši titar ASA IgA u krvnom serumu.

## ZAKLJUČCI

- Između grupe neosemenjenih junica, krava i junice osemenjenih 1-5 puta, krava osemenjenih 6-10 puta i krava, koja su za života osemenjene više od 10 puta, tehnikom IIF nisu uočene statistički značajne razlike u titru ASA IgG klase protiv spermatozoida suspendovanih u obe vrste razređivača (TRIS-žumančanom i „Biociphos+”). Titar antitela IgG klase uglavnom ne prelazi vrednosti od 1:64, za koje se smatra da potencijalno mogu ugroziti plodnost stada. Antitela protiv spermatozoida klase IgG, po svemu sudeći, nisu od značaja u ovom smislu.

2. Analiza titra ASA IgA klase u krvnom serumu između ispitanih grupa krava jasno ukazuje na postojanje sistemske reaktivnosti imunskog sistema plotkinja protiv spermatozoida suspendovanih u TRIS-žumančanom i „Biociphos+“ razređivaču.
3. Između visine titra ASA IgA klase i broja osemenjavanja postoji direktna zavisnost i sa povećanjem broja osemenjavanja povećava se statistička značajnost razlike u visini titra ASA IgA klase u krvnom serumu plotkinja.
4. Titar ASA IgA klase u krvnom serumu virgilnih junica je značajno manji u odnosu na grupe krava sa različitim brojem ukupnih osemenjavanja i postoji jasan porast titra ASA IgA klase sa brojem ukupnih osemenjavanja, bez obzira na vrstu korišćenog razređivača.

## LITERATURA

1. Bratanov K, Dikov V.: Research on spermagglutination in connection with fertility in cows. U: Proc Word Cong Fert Ster, 1959, 923 - 928.
2. Bratanov K, Tornyov A, Hristova-Koleva M: Studies on the immunoglobulins in secretion of the female reproductive tract. U: Third Int Symp Immunol Reprod, Varna, Abstracts, 1975, p. 68.
3. Bronson R.: Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines, *Journal of Reproductive Immunology*, 45, 159-83, 1999.
4. Chacin M.F.L, Hansen P.J, Drost M.: Effects of stage of the estrous cycle and steroid treatment on uterine immunoglobulin content and polymorphonuclear leukocytes in cattle, *Theriogenology*, 34, 1169-84, 1990.
5. Cookson A.D., Thomas A.N, Foulkes I.A.: Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa, *Journal Fert Reprod*, 70, 599-604, 1984.
6. Coulter G.H., Foote R.H., Sehaiavo J.J., Brava R.K.: Antibodies to egg-yolk in blood serum of rabbits and cattle and cervical mucus inseminated artificially, *Theriogenology*, 6, 5, 585-7, 1976.
7. Farahani J.K, Tompkins W, Wagner W.C.: Reproductive status of cows and incidence of antisperm antibodies, *Theriogenology*, 15, 605-12, 1981.
8. Griffin J.F.T, Hartigan P.J., McGilligan C.A., Nunn W.R.: Antibodies to semen diluent and infertility in rabbits, *Theriogenology*, 1, 2, 55-61, 1974.
9. Hunter A.G., Alsum D.J.: Immunological suppression of fertility in rabbits inseminated with egg-yolk citrate extender, *J Dairy Sci*, 52, 6, 922, 1969.
10. Jaćević Vesna: Spermaglutinini u krvnom serumu i cervikalnoj sluzi junica i krava sa različitim indeksom osemenjavanja, magistarski rad, Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 1998.
11. Kanchev L, Pavlova S, Danev A.: Assesment of circulating agglutinating antisperm antibodies in buffalo cows with unexplained infertility and attempt to identify buffalo sperm isoantigens, *Am J Reprod Immun*, 29, 62-8, 1993.

12. Kutteh W.H, Blackwell R.E, Gore H, Kutteh C.C, Carr B.R, Mestecky J.: Secretory immune system of the female reproductive tract, II: Local immune system in normal and infected fallopian tube, *Fertil Steril*, 54, 51-5, 1990.
13. Kutteh W.H, Hatch K.D, Blackwell R.E, Mestecky J.: Secretory immune system of the female reproductive tract, In: Immunoglobulin and secretory component-containing cells, 1988.
14. Kutteh W.H, Mestecky J.: The concept of mucosal immunity, In: Bronson R.A, Alexander N.J, Anderson D, Branch D.W, Kutteh W.H (Eds.), Reproductive Immunology, Cambridge, MA: Blackwell Science, 1996, 28-51.
15. Lazarević M: Lokalni imunitet i neplodnost, Zbornik radova 4. savetovanja iz kliničke patologije i terapije životinja, *Clinica veterinaria*, 155-162, 2003.
16. Lazarević M, Jaćević Vesna, Žderić M, Jakovljević G.: Spermaglutinini u krvnom serumu i cerviko-vaginalnoj sluzi junica i krava, U: Zbornik kratkih sadržaja radova, 9. savetovanje veterinara Srbije, Zlatibor, 10-14 decembar, 1996, 59-61.
17. Max A.: Analysis of causes of ineffective insemination of cows based on clinical, hormonal and immunological examinations, *Med Weter*, 46, 352-4, 1990.
18. Milovanović A., Lazarević M., Kirovski D., Jovičin M., Barna T.: Antispermalna antitela u cervikalnoj sluzi junica i krava i njihov uticaj na reproduktivne pokazatelje U: 5. simpozijum Ishrana, reprodukcija i zaštita zdravlja goveda, Banja Kanjiža, 4.-7. jul 2007.godine, urednik Horea Šamanc, Beograd: Veterinarska komora Srbije, 2007, str.189-195.
19. Milovanović A.: Određivanje antitela protiv antigaena spermatozoida u krvnom serumu i cervikalnoj sluzi junica i krava metodom indirektnе imunofluorrescencije : magistarska teza. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, Katedra za fiziologiju i biohemiju, 2005.
20. Seshagiri V.N, Pattabiraman S.R, Krishnan A.R.: Incidence of sperm agglutinating antibody in regular and repeat breeding cross bred cows, *Chetron*, 16, 152-4, 1987
21. Schumacher G.F.B, Immunology of spermatozoa and cervical mucus, *Human Reproduction*, Vol. 3, No. 3, pp. 289-300, 1988.
22. Tanabe T. Y., Casida L. E.: The nature of reproductive failures in cows of low fertility, *J. Dairy Sci.* 32,237, 1949.
23. Youngquist R.S., Bierschwal C.J, Clinical Management of Reproductive Problems in Dairy Cows, *Journal of Dairy Science* Vol. 68, No. 10, 1985.
24. Wang G.L, Xie C.X.: The relationship between antisperm antibodies and progesterone in the serum of infertile dairy cows, *Acta Vet Zootec Sinica*, 21, 126-30, 1990.
25. Zral? Z, Čanderle J, Diblíková I, Vecová D, Mašková J, Kummer V.: Antisperm Antibodies in Cows as Related to Their Reproductive Health, *Acta Vet, Brno*, 72, 27-32, 2003.

Primljeno: 12.02.2009.

Odobreno: 03.03.2009.



# Kvalitativno određivanje rezidua antibiotika u mleku različitim skrining metodama i bio testom

Jelena Petrović,<sup>1\*</sup> Ksenija Čobanović,<sup>2</sup> Mira Kovačević,<sup>1</sup> Radomir Ratajac<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad, Rumenački put 20, Novi Sad

<sup>2</sup>Novosadska mlekara, Sentandrejski put 9, Novi Sad

## Kratak sadržaj

Rezidue veterinarskih lekova u mleku predstavljaju rizik za zdravlje konzumenta. Da bi se ispunili zakonski propisi i smanjili ekonomski gubici u mlekarama se vrši testiranje mleka na prisustvo antibiotika na samom prijemu pre nego što se mleko prikupi u tankove. Jedan od bitnih zahteva mlekara je i vreme trajanja ispitivanja, zato su brojni proizvođači ponudili brze skrining testove, stoga je cilj rada je da se primenom različitih skrining metoda i Bio testa uporedno ispita prisustvo rezidua antibiotika u sirovom mleku uzorkovanom na prijemu u mlekari. Skrining testovi osetljivi samo prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima (Delvo-X-press, Penzim S, Beta Star i CHARM  $\beta$ -laktam test) su pokazali odličnu podudarnost. Bio test i Delvo SP test imaju nešto slabiju podudarnost sa ostalim testovima. Na osnovu izvršenih ispitivanja može se zaključiti da postoji potreba za uvođenjem skrining testova koji su osetljivi i prema drugim antimikrobnim lekovima osim  $\beta$ -laktamskih antibiotika. Jedan od novih komercijalnih testova je Twinsensor (Unisensor S.A., Belgija) koji je osetljiv ne samo prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima već i prema tetraciklinima.

Ključne reči: mleko, rezidue, skrining, antibiotici

---

\* e-mail: jelena@niv.ns.ac.yu

# Qualitative determination of antibiotic residues in milk with different screening methods and bio test

Jelena Petrović<sup>1</sup>, Ksenija Čobanović<sup>2</sup>, Mira Kovačević<sup>1</sup>, Radomir Ratajac<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenski put 20

<sup>2</sup>Novi Sad Dairy, Sentandrejski put 9, Novi Sad

## Abstract

Veterinary drug residues in milk represent a health risk for the consumer. To comply with national drug residue regulations and to minimize economic losses, milk testing for antibiotics at the truck site, before pumping the contents into the silo, is applied in dairy industry. Because of the time requirements for microbiological inhibition tests, several companies offer more rapid commercial tests. The aim of this study was to compare different screening methods and Bio test in examination of raw milk at truck site in dairy. The results showed that assays sensitive only to  $\beta$ -lactams (Delvo-X-press, Penzim S, Beta Star and CHARM- $\beta$ L test) have good agreement. Bio test and Delvo SP test have less agreement with other tests. The results also show that introduction of rapid tests for the detection of more antibiotic groups is necessary, e.g. Twinsensor (Unisensor S.A., Belgium) which enables to detect  $\beta$ -lactam and tetracycline antibiotics as well.

Keywords: milk, residue, screening, antibiotics

## UVOD

Prvi skrining testovi za ispitivanje rezidua veterinarskih lekova u namirnicama su razvijeni za detekciju  $\beta$ -laktamskih antibiotika u mleku (Mitchell i sar., 1998). Kontrola prisustva rezidua antibiotika u mlekari je obimna i svakodnevna. Proizvođači testova su na zahteve mlekara odgovorili velikom ponudom različitih testova, tako da se danas na tržištu mogu naći testovi koji daju rezultate za samo 5-10 minuta (Petrović i Katić, 2003).

Skrining testovi za pregled mleka se, na osnovu principa rada dele na: mikrobiološke inhibitorne, enzimske, receptor vezujuće, enzimske kolorimetrijske i imunološke (Mitchell i sar., 1998; Navratilova, 2008).

Bio test nije komarečijalni test, već predstavlja jednostavnu probu kojom se potvrđuje da li se od ispitivanog mleka upotrebotom starter kulture može napraviti jogurt tj. dostići odgovarajuća kiselost i nekada se dosta koristio u našim mlekarama.

Ovaj test pokazuje određene nedostatake, kao što su dužina trajanja ispitivanja i nedovoljna osetljivost u odnosu na MDK vrednosti (Katla i sar., 2001), stoga se danas više ne koristi mlekarama ali može dati podatke o tome šta se dešava sa ispitivanim mlekom u postupku proizvodnje jogurta. MDK vrednost je maksimalno dozvoljena koncentracija rezidua u hrani, odnosno maksimalna koncentracija rezidue koja se smatra bezbednom za konzumenta (Codex alimentarius, 1993).

Delvo test SP je mikrobiološka inhibitorna metoda sa *Geobacillus* (*Bacillus*) *stearothermophilus* var. *calidolactis*: C 953 kao test mikroorganizmom. Princip rada testa se zasniva na sprečavanju rasta test mikroorganizama u prisustvu rezidua antibiotika, što se manifestuje izostankom promene boje podloge posle propisane inkubacije. Delvo SP test je osetljiv ne samo prema β-laktamskim već i prema drugim antibioticima (tetraciklini, aminoglikozidi, makrolidi itd.), ali i sulfonamidima. Vreme izvođenja testa je 3 h (Suhren i Beukers, 1998).

Penzim test je kvalitativna enzimska metoda za brzo dokazivanje β-laktamskih antibiotika u mleku (25 min). U ovom testu se kao glavni reagens koristi enzim DD-karboksipeptidaza (penicilin vezujući protein) koji se vezuje za rezidue β-laktamskih antibiotika iz uzorka, reakcija postaje vidljiva dodavanjem reagens tablete koja sadrži substrat D-alanin, a čijim razlaganjem nastaje promena boje indikatora (Mitchell i sar., 1998; Gustavsson i Sternesjö, 2004).

DELVO-X-Press test za β-laktamske antibiotike u mleku je kvalitativni enzimski, receptor vezujući test. Princip rada se zasniva na vezivanju konjugovanog enzima za rezidue antibiotika iz mleka. Ako u uzorku nije bilo rezidua, konjugat enzima ostaje slobodan i vezuje se za antibiotike koji su imobilisani na zidu test epruvete. Nakon ispiranja i dodavanja substrata za enzim dolazi do razvijanja boje. Očitavanje se vrši pomoću instrumentalne jedinice koja automatski interpretira rezultate. Vreme izvođenja testa je 6 min (Angelidis i sar., 1999; Petrović i Katić, 2001).

Beta Star test je kvalitativni receptor vezujući test koji sadrži specifičan receptor za β-laktamske antibiotike vezan za čestice zlata. Receptori se vezuju za rezidue antibiotika iz mleka (ako ih ima), zatim se u test bočicu postavlja tračica sa imuno-hromatografskom podlogom. Ukoliko u uzorku nisu prisutni β-laktamski antibiotici, biomolekuli na prvom delu imuno-hromatografske podloge imobilisu ukupne receptore, što se manifestuje pojmom ružičaste trake. Ukoliko u mleku ima rezidua na prvom delu podloge receptori će ostati slobodni, odnosno pojava ružičaste boje će izostati. Vreme izvođenja testa je 5 minuta (Navratilova, 2008).

CHARM test je takođe receptor vezujući test. Princip rada se zasniva na vezivanju funkcionalne grupe antibiotika za enzim koji se nalazi na ili u mikrobnoj ćeliji. Mikroorganizam, koji ima receptore za vezivanje antimikrobnog leka, dodaje se ispitujućem uzorku, zatim se dodaje obeleženi antibiotik (npr. C-14 penicillin) da bi se takmičio sa eventualno prisutnom reziduom antibiotika za receptorsko mesto; metoda je i semi kvantitativna, jer što se više penicilina C-14 veže manje je antibiotika u uzorku. Postoji više vrsta CHARM testa namenjenih za različite uzorke kao i razliite vrste antibiotika. U našim ispitivanjima je korišćen test CHARM-βL namenjen za

otkrivanje prisustva  $\beta$ -laktamskih antibiotika u mleku. CHARM test se može koristiti i u ispitivanju rezidua HPLC metodom, gde identificuje frakciju aktivnog leka (Navratilova, 2008).

U našoj zemlji danas je dostupan veliki broj različitih skrining testova stoga je cilj rada da se primenom različitih skrining metoda i Bio testa uporedno ispita prisustvo rezidua antibiotika u sirovom mleku uzorkovanom na prijemu u mlekari.

## MATERIJAL I METODE

Materijal: sirovo mleko je uzorkovano iz transportnih cisterni na prijemu mleka u mlekari. Ukupno je ispitano 100 uzoraka. Prisustvo prirodnih inhibitornih materija (lizocim, lakoferin, laktoperoksidaza) je eliminisano inaktivacijom mleka na 95°C tokom 10 min, obzirom da prirodne inhibitorne materije mogu dovesti do pojave lažno pozitivnih nalaza na mikrobiološkim inhibitornim testovima (Kang i sar., 2005).

Metode: Bio test je izvođen tako što je 100 ml mleka inaktivisano a nakon toga je ohlađeno na 42°C, zatim je dodata 2% jogurtna kultura (*Str. termophilus*, *Lb. bulgaricus*). Dalje je izvršena inkubacija u trajanju od 2 sata i određen stepen kiselosti. Stepen kiselosti manji ili jednak 25°SH smatran je pozitivnim rezultatom. Delvo SP test, Delvo-X-press  $\beta$ -laktam II test (DSM, Holandija), Beta Star test (Chr. Hansen, Danska), CHARM MRLTM  $\beta$ -laktam test (Charm science, inc, USA) i Penzim S test (UCB-Bioproducts S.A., Belgija) su izvođeni prema uputstvu proizvođača.

Statističke metode: Kappa test vrednost je izračunata na osnovu postupka koji je preporučio Valčić (1998). Ova metoda statističke analize se koristi za proveru usaglašenosti (podudarnost nalaza) ili neusaglašenosti rezultata dva testa. Kappa može imati vrednosti: 0,81 idealna podudarnost, 0,61-0,80 skoro idealna podudarnost, 0,41-0,60 prilična podudarnost, 0,21-0,40 srednja podudarnost, 0,00-0,20 beznačajna podudarnost i 0,00 nema podudarnosti.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Prvi skrining testovi za ispitivanje rezidua lekova u namirnicama su razvijeni za mlekarsku industriju, odnosno za detekciju  $\beta$ -laktamskih antibiotika u sirovom mleku (Mitchell i sar., 1998). Beta laktamski antibioticici se široko koriste u terapiji i profilaksi oboljenja mlečnih goveda i to prvenstveno kod mastitisa. Stoga nije neobično da ova grupa antibiotika predstavlja najčešću vrstu rezidua koja se može naći u mleku (Fischer i sar., 2003). Zbog prisustva rezidua antibiotika u mleku najpre je nastao problem u proizvodnji sireva i jogurta, jer se zbog inhibicije mlekarskih kultura fermentacija nije mogla odvijati na pravilan način, samim tim nije mogao nastati gotov proizvod, što je dovodilo do ekonomskih gubitaka. Starter kulture, uključujući i onu koja se koristi u Bio testu, pokazuju veliku osetljivost prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima dok je osetljivost prema ostalim grupama antimikrobnih lekova daleko manja (tabela 1).

Masovna upotreba antibiotika u prethodnim decenijama dovela je do proučavanja niza neželjenih efekata i uobičavanja problematike rezidua u odvojenu oblast. Posebno mesto u ovoj oblasti zauzimaju metode za pregled i selekciju velikog broja uzoraka – skrining metoda zajedno sa zakonskom regulativom o maksimalno dozvoljenoj količini rezidua.

Tabela 1: Osetljivost bakterija mlečne kiseline prema antimikrobnim lekovima (Katla i sar., 2001)

Antimikrobn lek	Minimalna inhibitorna koncentracija ( $\mu\text{g/l}$ )			
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
penicilin	0,002-0,047	0,002-3	0,016-2	0,002-0,125
streptomycin	2-256	0,5-64	0,094-24	0,047-24
hloramfenikol	0,5-6	1-64	1-8	0,125-6
tetraciklin	0,19-2	0,064-8	0,38-6	0,016-1,5
sulfadiazin	256	256	256	256
gentamicin	2-192	0,064-4	0,016-2	0,125-16
trimetoprim	32	32	32	32

Osnovni kriterijumi za izbor skrining metode u mlekari su senzitivnost i specifičnost ali i brzina dobijanja rezultata. Senzitivnost, kao najvažniji parametar, je određena mogućnošću testa da detektuje količinu rezidua u nivou maksimalno dozvoljene količina rezidua (MDK). MDK vrednosti za Evropsku Uniju su propisane u Council Regulation 2377/90 i kreću se u različitom rasponu od zabrane prisustva (zero tolerance) za hloramfenikol, preko malih količina 4 ppb za neke  $\beta$ -laktamske antibiotike u mleku do raspona od 200 i više za aminoglikozide itd. Brojni komercijalni skrining testovi ispunjavaju zahteve vezane za senzitivnost (tabela 2).

Tabela 2: Prag detekcije različitih testova (Althaus i sar., 2003; Petrović i sar., 2008; Council Regulation 2377/90) (ND- ne detektuje (nije osetljiv))

Antimikrobn lek	Prag detekcije ( $\mu\text{g/l}$ )					MDK ( $\mu\text{g/l}$ )
	<i>Delvo SP</i>	<i>Delvo Xpess</i>	<i>Beta star</i>	<i>Penzim S</i>	<i>CHARM-<math>\beta</math>L</i>	
penicilin	2,5	2	2	4	2	4
ampicilin	2	3	2	2	4	4
amoksicilin	2	4	2	3	2	4
kloksacilin	30	35	5	30	15	30
streptomycin	2500	ND	ND	ND	ND	200
tilozin	50	ND	ND	ND	ND	50
tetraciklin	100	ND	ND	ND	ND	100
sulfadiazin	50	ND	ND	ND	ND	100
gentamicin	100	ND	ND	ND	ND	100
neomicin	100	ND	ND	ND	ND	500

S obzirom da je u našoj zemlji dostupan veliki broj različitih skrining testova prvo pitanje koje se nameće je kakva je podudarnost rezultata pri ispitivanju istih uzoraka mleka. Kao važan kriterijum pri poređenju rezultata uzeti su i rezultati paralelnog ispitivanja Bio testom, zbog velike osetljivosti starter kulture prema  $\beta$ -laktamskim, ali i postojanja osetljivosti i prema drugim antimikrobnim lekovima. Rezultati ispitivanja 100 uzoraka sirovog mleka Bio testom, Delvo SP testom, Delvo-X-press testom, Penzim S testom i Beta Star testom su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3: Rezultati uporednog ispitivanja uzorka sirovog mleka različitim testovima

Biostest		Rezultati ispitivanja skrining testova			
SH°	Br. uzor	Svi testovi pozitivni	Svi testovi negativni	Delvo SP pozit / ostali negat	Delvo X negat / ostali pozit
≤10	9	8	0	1	0
11-20	14	4	2	7	1
21-25	4	0	2	1	1
ukupno	27	12	4	9	2
26-30	23	1	17	4	1
≥31	50	0	46	3	1
ukupno	73	1	63	7	2

U uzorcima mleka u kojim se razvila jaka inhibicija starter kulture i dovela do razvijanja vrlo slabog kiselinskog stepena (= 10SH°), ustanovljeno je da je najčešći uzrok ovakve inhibicije prisustvo  $\beta$ -laktamskih antibiotika (88,89% uzoraka) i to verovatno u većim količinama, dok je nešto ređe (11,11%) uzrok ovako jake inhibicije prisustvo drugih antimikrobnih lekova. Jogurtna kultura je veoma osetljiva prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima (tabela 1). Ova grupa antibiotika se najčešće koriste u terapiji mastitisa, a samim tim su i najčešća vrsta rezidua u sirovom mleku. Zbog toga je u ovim uzorcima i vrlo nizak kiselinski stepen, a Penzim S test, Beta Star i Delvo X press test su potvrdili prisustvo  $\beta$ -laktamskih anitibiotika. Podudarnost Bio testa sa ostalim testovima je od 88,88 do 100 % rezultata. Ovako velika podudarnost je nastala zbog visoke količine rezidua koja se lako može dokazati različitim testovima zato što ne dolazi do nepodudarnosti testova usled različite osetljivosti.

Do nešto slabije inhibicije starter kulture (kiselinskog stepena 11-20°SH i kiselinski stepen 21-25°SH, dovode  $\beta$ -laktamski antibiotici (33,33%), verovatno u nešto manjim koncentracijama nego u prethodnoj grupi, a zatim i ostali antimikrobni lekovi (44,44%). U manjem broju uzoraka (22,22%) uzročnici nepoznate etiologije su doveli do inhibicije starter kulture. Može se pretpostaviti da je moguć uticaj bakteriofaga na starter kulturu ali ne mogu se isključiti i drugi faktori npr. uslovi inkubacije i dr. Delvo X press test se pokazao slabije osetljiv prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima u odnosu na ostale testove,s obzirom da je kod dva

uzorka imao negativan rezultat iako su drugi testovi pokazali prisustvo ovih antibiotika.

Značajniju grupu predstavljaju uzorci u kojima je ustanovljeno ustanovljeno prisustvo rezidua koje nisu imale nikakav uticaj na starter kulturu (tabela 3). Od 73 ispitana uzorka kod 4,10% je ustanovljeno prisustvo  $\beta$ -laktamskih antibiotika a kod 9,59% uzoraka drugih antimikrobnih lekova. Od ovakvog mleka je moguće napraviti jogurt, ali tako dobijen proizvod nije bezbedan za ishranu ljudi.

Rezultati ispitivanja 25 uzoraka sirovog mleka Bio testom, Delvo SP test, Delvo-X-press testom, Penzim S testom, Beta Star testom i CHARM- $\beta$ L testom su prikazani u tabeli 4. CHARM- $\beta$ L test ima u potpunosti podudarne rezultate sa testovima koji su osetljivi samo prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima identične rezultate Penzim S testom i sa Delvo X press testom. Razlike u rezultatima su ustanovljene jedino kod Delvo SP testa a nastale su kao posledica prisustva rezidua drugih antibiotika ili sulfonamida.

Tabela 4: Rezultati ispitivanja 25 uzoraka sirovog mleka Bio testom, Delvo SP test, Delvo-X-press testom, Penzim S testom, Beta Star testom i CHARM- $\beta$ L testom

Biotest		Rezultati ispitivanja skrining testova		
SH°	Br. uzor	Svi testovi pozitivni	Svi testovi negativni	Delvo SP pozit/ostali negat
≤ 10	8	8	0	0
11-25	7	3	3	1
≥ 26	10	0	10	0
ukupno	25	11	13	1

Statistički obrađena podudarnost testova ukazuje na dobru međusobnu podudarnost koja se kretala u intervalu od prilične do idealne podudarnosti (tabela 5). Najbolja međusobna podudarnost – idealna podudarnost – je ustanovljena između testova koji su osetljivi samo prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima Delvo-X-press, Penzim S, Beta Star i CHARM- $\beta$ L test. Nešto slabija podudarnost (skoro idealna i prilična podudarnost) je ustanovljena poređenjem DelvoSP i Bio testa sa ostalim testovima. Nešto slabija podudarnost je posledica razlike u senzitivnosti, DelvoSP je osetljiv i prema ostalim antimikrobnim lekovima, a Bio test ima nešto viši prag detekcije u odnosu na ostale testove (tabele 1 i 2). Do sličnih podataka su došli i drugi autori (Andrew i sar., 1997; Gibbons-Burgener i sar., 2001; Petrović i sar., 2008).

Tabela 5: Kappa podudarnost

Test	Međusobna podudarnost testova				
	Bio test	Delvo SP	Delvo X	Penzim	Beta star
CHARM-βL	0,69**	0,92**	1,00***	1,00***	1,00***
Beta star	0,54*	0,59*	0,84***	1,00***	
Penzim	0,54*	0,59*	0,84***		
Delvo X	0,51*	0,46*			
Delvo SP	0,67**				

\*\*\* idealna podudarnost, \*\* skoro idealna podudarnost \* prilična podudarnost,

## ZAKLJUČAK

Kontrola mleka je neophodna s obzirom na činjenicu da su rezidue veterinarskih lekova utvrđene u 33% ispitanih uzoraka. Najčešća vrsta rezidua u mleku su  $\beta$ -laktamski antibiotici (45,95% pozitivnih rezultata) ali je značajno i prisustvo rezidua drugih antimikrobnih lekova (43,97% pozitivnih rezultata). Takođe u jednom broju uzoraka mleka je skrining testiranjem ustanovljeno odsustvo rezidua ali ipak od ovakvog mleka nije bilo moguće napraviti jogurt (10,81% pozitivnih rezultata). Izvršenim ispitivanjima je otkriven i jedan broj uzoraka mleka, rizičnog po zdravlje ljudi zbog prisustva rezidua, od kog je moguće napraviti jogurt (13,70%).

Skrining testovu osetljivi samo prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima (Delvo-X-press, Penzim S, Beta Star i CHARM-βL test) su pokazali odličnu podudarnost. Bio test i Delvo SP test imaju nešto slabiju podudarnost sa ostalim testovima. Na osnovu izvršenih ispitivanja može se zaključiti da postoji potreba za uvođenjem skrining testova koji su osetljivi i prema drugim antimikrobnim lekovima osim  $\beta$ -laktamskih antibiotika. Jedan od novih komercijalnih testova je Twinsensor (Unisensor S.A., Belgija) koji je osetljiv ne samo prema  $\beta$ -laktamskim antibioticima već i prema tetraciklinima.

## LITERATURA

1. Althaus R.L., Torres A., Montero A., Balash S., Molina M.P.: Detection limits of antimicrobials in ewe milk by delvotest photometric measurements. *J Dairy Sci*, 86, 457–463, 2003.
2. Andrew SM., Frobish RA., Paape M.J.: Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes. *J Dairy Sci*, 80, 11, 3050-7, 1997.
3. Angelidis A.S., Farver B.T., Cullor J.S.: Evaluation of the Delvo-X-Press assay for detecting antibiotic residues in milk samples from individual cows. *J Food Prot*, 62, 1183–1190, 1999.
4. Codex alimentarius, vol. three, Residue of veterinary drugs in foods. Food and agriculture organisation of united nations, Rome: WHO. 1993.

5. Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, L 224, 18.8.1990.
6. Fischer W.J., Tritscher A.M., Schilter B., Stadler R.H.: Contaminants resulting from agricultural and dairy practices. In: Roginski H.: Encyclopedia of Dairy Sciences. 1, 516–525, 2003.
7. Gibbons-Burgener S., Kaneene J., Lloyd J., Leykam J., Erskine R.. Reliability of three bulk-tank antimicrobial residue detection assays used to test individual milk samples from cows with mild clinical mastitis. *American J. Of Vet. Res* 62,11, 1716-1720,2001.
8. Gustavsson E., Sternesjö Č.: Biosensor analysis of  $\alpha$ -lactams in milk: comparison with microbiological, immunological, and receptor-based screening methods. *J AOAC Int*, 87, 614–620, 2004.
9. Kang J.H., Kondo F.: Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the Delvotest SP assay. *J Food Prot*, 64, 1211–1215, 2001.
10. Katla AK, Kruse H, Johnsen G., Herikstad H. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int J Food Microb*, 67, 1-2, 147-152, 2001.
11. Mitchell JM, Griffiths MW, McEwen SA, Mcnab WB, Yee AJ,. Antimicrobial Drug Residues in Milk and Meat: Causes, Concerns, Prevalence, Regulations, Tests, and Test Perfomance. *J Food Prot*, 61, 6, 742-756, 1998.
12. Pavlína Navrátilová. Screening Methods Used for the Detection of Veterinary Drug Residues in Raw Cow Milk – A Review. *Czech J. Food Sci*, 26, 6, 393–401, 2008.
13. Petrović J., Katić V.: Receptor enzimska metoda - Delvo-x-press betalaktam-II test - u detekciji rezidua beta laktamskih antibiotika u mleku. *Mlekarstvo*, 4, 30-34, 2001.
14. Petrović J., Katić V.: Uporedno ispitivanje rezidua antibiotika u mleku enzimskom i mikrobiološkim metodama. *Veterinarski glasnik*, 57, 1-2, 43-49, 2003.
15. Petrović J., Katić V.: Comparative Examination of the Analysis of  $\beta$ -Lactam Antibiotic Residues in Milk by Enzyme, Receptor-Enzyme, and Inhibition Procedures. *Food Anal. Methods* (2008) 1:119–125 DOI 10.1007/s12161-007-9007-y.
16. Suhren G, Beukers R.: Delvotest SP for detection of cloxacillin and sulfamethoxazole on milk: IDF interlaboratory study. *J AOAC Int*, 81, 5, 987-90, 1998.
17. Valčić M. *Opšta epizootiologija*. Beograd: Fakultet veterinarske medicine, 1998.

Primljeno: 02.02.2009.  
Odobreno: 03.03.2009.



# Mogućnost određivanja vitamina B<sub>12</sub> u vitaminskim predsmešama i dodacima hrani za životinje metodom AAS

Željko Mihaljev,<sup>\*</sup> Milica Živkov-Baloš, Sandra Jakšić

<sup>1</sup>Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

## Kratak sadržaj

Zbog važnih metaboličkih funkcija i nemogućnosti dovoljnog sintetisanja u samom organizmu domaćih životinja, a naročito nepreživara, posebna pažnja posvećuje se dodavanju vitamina B<sub>12</sub> u smeše za ishranu životinja. Potrebe za ovim vitaminom obezbeđuju se iz vitaminskih predsmeša, te je stoga i utvrđivanje količine vitamina B<sub>12</sub> u predmetnim uzorcima od izuzetnog značaja. Određivanje sadržaja vitamina B<sub>12</sub> standardnim hemijskim metodama zahteva njegovo izdvajanje i prečišćavanje. U ovom radu sadržaj vitamina B<sub>12</sub> u predsmešama sa visokim sadržajem različitih vitamina određen je indirektno, merenjem nivoa kobalta metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije. Iz izmerenog sadržaja kobalta, izračunat je sadržaj vitamina B<sub>12</sub>. Dobijeni rezultati pokazuju da je u uzorcima preparata čistog vitamina B<sub>12</sub> (kao dodatka hrani za životinje) koeficijent odstupanja izmerenih od očekivanih vrednosti manji od 2%. U vitaminskim predsmešama vitamina B grupe i vitaminskim predsmešama vitamina B grupe i ostalih vitamina (A, D, E i dr.) izmerene vrednosti su se razlikovale od deklarisanih za manje od 5%. Dobijeni rezultati ukazuju da je određivanje vitamina B<sub>12</sub>, merenjem sadržaja kobalta metodom AAS, obzirom na brzinu, tačnost i jednostavnost izvođenja, prihvatljiva metoda za ispitivane vrste uzorka hrane za životinje.

Ključne reči: vitamin B<sub>12</sub>, kobalt, određivanje, dodaci, predsmeša

\* zeljko@niv.ns.ac.yu

# Possibility of determining vitamin B<sub>12</sub> in vitamin premixes and feed additives using AAS method

Željko Mihaljev, Milica Živkov-Baloš, Sandra Jakšić  
Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

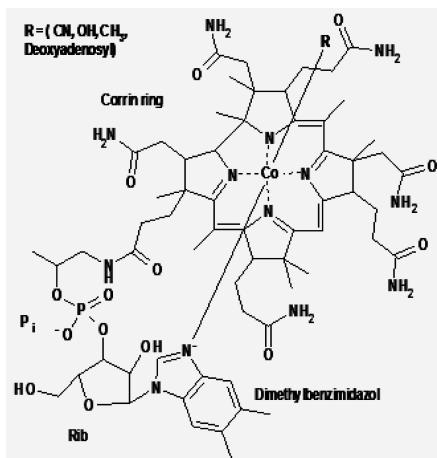
## Abstract

Since vitamin B<sub>12</sub> has important metabolic functions, but is unable sufficiently to synthesize into organisms of domestic animals (especially non-ruminants), special attention is given to adding B<sub>12</sub> into feed. The needs for this vitamin are provided through vitamin premixes, so determining the quantity of B<sub>12</sub> in the samples is of utmost importance. When standard chemical methods are applied extraction and purification are required. In this paper is described a method where the content of B<sub>12</sub> in premix with high level of different vitamins is determined through an indirect method: measuring the level of cobalt using atomic absorption spectrophotometry. The content of B<sub>12</sub> was determined from the content of cobalt. The obtained results show that in the samples of pure B<sub>12</sub> vitamin (used as an additive to feed) the measured values were lesser than 2% comparing to the expected values. In vitamin premixes the measured values of group B and vitamin premixes of vitamin B group and other (A, D, E) vitamins, the measured values differed from those given on the declaration, and the difference was lesser than 5%. The obtained results point that determining vitamin B<sub>12</sub> by measuring cobalt content using AAS method is a fast, accurate and simple method that can be applied in examining all the feed samples.

Key words: vitamin B<sub>12</sub>, cobalt, determination, additives, premix

## UVOD

Vitamin B<sub>12</sub> je, po svojoj hemijskoj strukturi, jedan od najsloženijih vitamina. Molekul B<sub>12</sub> se sastoji iz četiri redukovana pirolna prstena koji su međusobno povezani, dok je u središtu kobalt kovalentno vezan za četiri vodonikova atoma (slika 1). Prisustvo koralta je važno za biološku aktivnost, a po njemu se naziva još i cijanokobalamin.

Slika 1. Hemijska struktura vitamina B<sub>12</sub>

Vitamin B<sub>12</sub> ima važnu ulogu u različitim metaboličkim procesima. Neophodan je za sintezu crvenih krvnih zrnaca, pravilno funkcionisanje nervnog sistema, rast i razvoj. Ima važnu ulogu u metabolizmu proteina, jer je uključen u sintezi nekoliko aminokiselina (BASF, 2001). Kod preživara ima značaj kao koenzim u iskorišćavanju propionske kiseline u rumenu. Kod živine nedostatak vitamina B<sub>12</sub> dovodi do povećanja embrionalne smrtnosti i smrtnosti izleženih pilića. Duža izloženost hipovitaminozi vodi nižoj proizvodnji jaja (Jovanović i sar., 2001). Preživari imaju mogućnost mikrobiološke sinteze vitamina u buragu ukoliko je u ishrani prisutan kobalt. Kod svinja, živine i drugih životinja sa jednim želucem, biosinteza vitamina B<sub>12</sub> se odvija u poslednjem delu tankog creva, cekumu i debelom crevu, a apsorbuje se samo količina iz tankog creva, što zadovoljava samo deo potreba ovih životinja (BASF, 2001).

Zbog važnih metaboličkih funkcija i nemogućnosti dovoljnog sintetisanja u samom organizmu domaćih životinja, a naročito nepreživara, posebna pažnja posvećuje se dodavanju vitamina B<sub>12</sub> u smeše za ishranu životinja. Ovi dodaci predstavljaju smeše različitih vitamina i minerala i kao takvi predstavljaju izuzetno kompleksan matriks u analitičkoj hemiji. Danas su razvijene različite mikrobiološke (Mattila i sar., 2001) i hemijske metode za određivanje vitamina B<sub>12</sub> u različitim vrstama uzorka. Analitičke tehnike koje se mogu koristiti su: spektrofotometrija (Morelli, 1995; Pawar i sar. 2001), hemiluminescencija (Zhou i sar., 1991), kapilarna elektroforeza (Lambert i sar., 1992), tečna hromatografija visoke efikasnosti sa UV (Kozhanova i sar., 2002; Zafra-Gomez i sar., 2006), elektrohemskijska metoda (Marszall i sar., 2005), plamena atomska apsorpciona spektrometrija (Vinas i sar., 1996), fluorescentna detekcija (Li i sar., 2000), masena detekcija sa indukovano-kuplovanom plazmom (Szpunar i sar., 1999; Chen i Jiang, 2008) i atomska apsorpciona spektrofotometrija (Akatsuka i sar. 1989).

## MATERIJAL I METODE RADA

Svi ispitani uzorci preparata čistog vitamina B<sub>12</sub> (n=4), premixi vitamina B-kompleksa: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> (n=3) kao i premixi vitamina B-kompleksa u smeši sa ostalim vitaminima (A, D<sub>3</sub>, K<sub>3</sub>, E, Biotin, Holin hlorid, Ca-pantotenat, folna kiselina i dr.) (za životinju n=3; za svinje n=4; za goveda n=2), proizvedeni su od strane renomiranih svetskih proizvođača ove vrste dodataka hrani za životinje.

Za određivanje kobalta uzorci su pripremani metodom „suvog spaljivanja” - zagrevanjem uzorka, žarenjem na 540°C i razaranjem dobijenog pepela pomoću razblažene HNO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posle žarenja dobijeni pepeo je rastvaran u 10% HCl i razblažen demineralizovanom vodom do odgovarajuće zapremine. Sadržaj kobalta određen je metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije na instrumentu Varian SpectrAA-10 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Na osnovu izmerenog sadržaja kobalta i poznavanja tačne relativne molekulske mase vitamina B<sub>12</sub>, može se posredno utvrditi količina vitamina B<sub>12</sub> u ispitivanom uzorku.

## REZULTATI ISPITIVANJA

Tabela 1. Sadržaj vitamina B<sub>12</sub> u čistim preparatima, premiksima sa vitaminima B-kompleksa i smešama vitamina B-kompleksa i ostalih vitamina

Broj uzorka	Vrsta uzorka	Deklarisana vrednost za vitamin B <sub>12</sub> [mg · kg <sup>-1</sup> ]	Izmerena vrednost za vitamin B <sub>12</sub> [mg · kg <sup>-1</sup> ] x <sub>SE</sub> ± SD	Koeficijent odstupanja izmerenih od deklarisanih vrednosti [%]
1.	Vitamin B <sub>12</sub>	10 000 (n=4)	10 119 ± 567 (SE = 5,6 %)	+ 1,19
2.	Kompleks B vitamina	700,0 (n=3)	686,7 ± 4,2 (SE = 0,6 %)	- 1,90
3.	Predsmeša B-vitamina i ostalih vitamina za životinju	98,0 (n=3)	102,5 ± 6,7 (SE = 6,5 %)	+ 4,6
4.	Predsmeša B-vitamina i ostalih vitamina za svinje	130,0 (n=4)	133,4 ± 6,9 (SE = 5,2 %)	+ 2,6
5.	Predsmeša B-vitamina i ostalih vitamina za goveda	200,0 (n=2)	205,8 ± 1,2 (SE = 0,6 %)	+ 2,9

## DISKUSIJA

Dobijene vrednosti za sadržaj vitamina B<sub>12</sub> u analiziranim vrstama uzoraka upoređene su sa vrednostima datim u njihovim deklaracijama. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1 može se zaključiti da je u čistim preparatima (*feed grade*) sa veoma visokom tačnošću utvrđen sadržaj vitamina B<sub>12</sub>, jer odstupanje izmerenih od deklarisanih vrednosti iznosi ~1% (1,19%). U uzorcima kompleksa B-vitamina takođe je sa visokom tačnošću utvrđen sadržaj vitamina B<sub>12</sub> - odstupanje izmerenih od deklarisanih vrednosti je ~2% (1,90%). U složenijim matriksima, tipa predsmeša

B-vitamina i ostalih vitamina, tačnost određivanja je nešto niža, i iznosi do ~5%. Koeficijent odstupanja izmerenih od deklarisanih vrednosti za sadržaj vitamina B<sub>12</sub> najniži je kod predsmeša kompleksa B-vitamina i ostalih vitamina namenjenih za ishranu svinja i iznosi ~3% (2,6%). U vitaminskim predsmešama za ishranu goveda koeficijent odstupanja izmerenih od deklarisanih vrednosti za sadržaj vitamina B<sub>12</sub> iznosio je takođe ~3% (2,9%). Najniža tačnost određivanja, tj. najviši koeficijent odstupanja izmerenih od deklarisanih vrednosti za sadržaj vitamina B<sub>12</sub>, ~5% (4,6%) postignuta je u vitaminskim predsmešama za ishranu živine.

Iz tabele 1 takođe se može zaključiti da primjenjenu metodologiju za utvrđivanje količine vitamina B<sub>12</sub> odlikuje visoki stepen preciznosti, jer se utvrđena ponovljivost na istom analitičkom uzorku od različitih proizvođača, izražena preko relativne standardne greške (SE) kreće u intervalu od 0,6 do 6,5%, u zavisnosti od tipa i nivoa vitamina B<sub>12</sub> u uzorku.

Indirektno određivanje vitamina B<sub>12</sub> metodom AAS - merenjem sadržaja kobalta, primenili su Akatsuka i sar. (1989) i dobili rezultate koji su u saglasnosti sa našim zaključcima. Slične rezultate navode i Pawar i sar. (2001). Oni su preko kobalta određivali vitamin B<sub>12</sub> u farmaceutskim preparatima, metodom AAS i spektrofotometrijom i takođe dobili rezultate koji su u korelaciji sa našim merenjima sadržaja vitamina B<sub>12</sub> u sličnim preparatima.

## ZAKLJUČAK

Dobijeni eksperimentalni rezultati ukazuju da je navedena metoda primenjiva za određivanje vitamina B<sub>12</sub> u uzorcima preparata čistog vitamina B<sub>12</sub>, premiksima vitamina B-kompleksa kao i predsmešama vitamina B-kompleksa i ostalih vitamina. Metoda je veoma selektivna, čak i u veoma kompleksnim i složenim matriksima, pošto se zasniva na detekciji kobalta atomskom apsorpcijom. Obzirom na svoju jednostavnost i brzinu izvođenja, tačnost, preciznost i osetljivost kao i činjenicu da zahteva malu količinu uzorka, može se uspešno koristiti kao alternativna metoda određivanja sadržaja vitamina B<sub>12</sub>.

## LITERATURA

1. Akatsuka K., Atsuya I.: Determination of vitamin B<sub>12</sub> as cobalt by electrothermal atomic absorption spectrometry using the solid sampling technique. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 335, 2, 200-204, 1989.
2. BASF, Technical Information: Animal Nutrition, On feed additives, Ludwigshafen, Germany, 2001.
3. Chen J.H., Jiang S.J: Determination of cobalamin in nutritive suplements and chlorella fods by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4, 1210-1215, 2008.
4. Jovanović R., Dujić D., Glamočić D.: Ishrana domaćih životinja. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet Novi Sad i Banja Luka, 2001.

5. Kozhanova, L.A., Fedorova, G.A., Baram, G.I.: Determination of water- and fat-soluble vitamins in multivitamin preparations by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 57, 1, 40-45, 2002.
6. Lambert D., Adjalla C., Felden F., Benhayoun S., Nicolas J. P., Gueant J.L.: Identification of vitamin B<sub>12</sub> and analogues by high- performance capillary electrophoresis and comparison with high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 608, 1-2, 311-315, 1992.
7. Li, H.B., Chen, F., Jiang, Y.: Determination of vitamin B-12 in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 891, 2, 243-247, 2000.
8. Marszall M. L., Lebiedzinska A., Czarnowski W., Szefer P.: High-performance liquid chromatography method for the determination of thiamine hidrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 91, 98, 1094, 2005.
9. Mattila, P., Könkö, K., Eurola, M., Pihlava, J.-M., Astola, J., Vahteristo, L., Hietaniemi, V., Kumpulainen, J., Valtonen, M. and Piironen, V.: Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2343-2348, 2001.
10. Morelli B.: Determination of a quaternary mixture of vitamins B6, B1, and B12 and uridine 5'-triphosphate, by derivative spectrophotometry. *Journal of pharmaceutical sciences*, 84, 1, 34-37, 1995.
11. Pawar R. B., Padgaonkar S.B., Sawant A.D.: A rapid and sensitive method for the determination of cobalt in pharmaceutical and ink dryer samples. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 60, 4, 328-330, 2001.
12. Szpunar J., Chassaigne A., Makarov R., Lobinski R.: Limitations of high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection for speciation analysis of trace metals in biological samples. *Chemia Analityczna*, 44, 3, 351-362, 1999.
13. Vinas P., Campillo N., Lopez Garsia I., Hernandez Cordoba M.: Speciation of vitamin B-analogues by liquid chromatography with flame atomic absorption spectrometric detection. *Analitica Chimica Acta*, 318, 319, 325, 1996.
14. Zafra-Gomez A., Garballo A., Morales J. C., Garcia-Ayuso L.E.: Simultaneous Determination of Eight Water –Soluble Vitamins in Supplemented Foods by liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54,13, 4531-4536, 2006.
15. Zhou Y.K., Li H., Liu Y., Liang G. Y.: Chemiluminescence determination of vitamin B<sub>12</sub> by a flow-injection method. *Analitica Chimica Acta*, 243, 127-130, 1991.

Primljeno: 01.03.2009.

Odobreno: 03.03.2009.

## Značaj menadžmenta i ljudski resursi u evaluaciji Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad”

Jelena Stojanović,<sup>1\*</sup> Nenad Petrović<sup>2</sup>, Sara Savić<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Regionalna privredna komora Novi Sad, <sup>2</sup>Fakultet za menadžment Novi Sad,

<sup>3</sup>Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad” Novi Sad, Rumenski Put 20

### Kratak sadržaj

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad” deluju u okruženju koje zahteva različite poglede, različite načine razmišljanja i različite strukture organizacije. Filozofija savremene organizacije se zasniva na premisi da je organizacija uspešna zbog njenih ljudi. Ljudski resursi brzo postaju sledeći faktor konkurentnosti. Zato i put ka poslovnoj izvrsnosti danas uključuje i ljudsku stranu preduzeća. Mnoge vodeće istraživačke kuće utvrdile su da je najbolji indikator celovite poslovne izvrsnosti sposobnost preduzeća da privuče, podstakne i zadrži talente. Fokusirajući se na ljudske resurse, preduzeća razvijaju različite mere uspeha, uspostavljaju jasan proces procene, merenja i razvoja kvaliteta ljudi – zadovoljstva zaposlenih i procene uspešnosti zaposlenih.

Ključne reči: naučni institut, ljudski resursi, menadžment, evaluacija,

# The role of management and human resources in evaluation of the Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”

Jelena Stojanović,<sup>1</sup> Nenad Petrović,<sup>2</sup> Sara Savić<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Regional Economic Chamber Novi Sad, <sup>2</sup>Faculty of Management Novi Sad,

<sup>3</sup>Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

## Abstract

Scientific Veterinary Institute „Novi Sad” operates in the environment that requires different approaches, different ways of thinking and different structures. Modern philosophy of an organization is based on premises that the organization is successful because of its human resources, as a factor of competitiveness. Successful business includes human resources. Many good scientific institutes have discovered that the best indicator of overall success is the ability to attract, encourage and keep scientific talents. Focusing on human resources companies develop different means to measure success, establish the way of evaluation, measure and develop human resources – they evaluate satisfaction of employees and estimate the success of the employees.

Key words: scientific institute, human resources, management, evaluation

## UVOD

U okviru upravljanja, svaka organizacija razvija sistem strategija za upravljanje resursima kojima raspolaže. Ljudski potencijali, njihova znanja i sposobnosti jedini su resurs koji se upotrebom ne smanjuje nego raste. Svaka organizacija trebalo bi da ima razvijen sistem strategija za upravljanje ljudskim potencijalima, koji su jedan od njenih najvažnijih resursa.

Cilj ovog rada je projektovanje alata za evaluaciju radne efikasnosti menadžmenta i ljudskih resursa Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad”, iz Novog Sada. Naučni radnici i sví zaposleni su ljudski resurs Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad”, koji su u njega uneli svoje znanje, iskustvo, veštine, različite sposobnosti u manjoj ili većoj meri, različite potrebe, kulturu, običaje i navike. Sa druge strane gledano, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, ima ciljeve i planove koje treba da ostvari, vrednosti na kojima se temelji rad i potrebu za ljudima koji će se u sve to najbolje uklopiti. Menadžment Instituta, sve predhodno navedeno mora imati u vidu

i pokušati uklopiti na najbolji mogući način, ukoliko želi da uspešno upravlja ljudskim resursima.

## METOD VREDNOVANJE EFIKASNOSTI NAUČNOG INSTITUTA

Vrednovanje rada Naučnog instituta za veterinarstvo predstavlja kompleksno i detaljno sagledavanje rada naučnih radnika iz svih naučnih zvanja i svih zaposlenih u toj ustanovi i bavi se pitanjima efekata u odnosu na definisanje ciljeva i zadatke.

Imajući u vidu da je naučno-istraživački rad najznačajniji činilac kojim je uslovljeno napredovanje naučnih radnika, a budući da je misija Instituta određena potrebom izrade projekata naučno-istraživačkog karaktera u oblasti veterinarske medicine, cilj istraživanja je vrednovanje efikasnosti Naučnog instituta za veterinarstvo i da se utvrditi kakav stav zaposleni imaju prema menadžerima i individualnim efikasnostima koji direktno iniciraju uspešnost Instituta u celini.

Praćenje i procenjivanje radne efikasnosti je od vitalne važnosti u svakom sistemu koji želi povezati efikasnost organizacije i efikasnost pojedinca. Informacije koje se dobijaju procenom služe za profesionalno usmeravanje i raspoređivanje ljudi na ona radna mesta koja najbolje odgovaraju njihovim mogućnostima.

Evaluacija Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“, u suštini predstavlja vrednovanje efekata rada i naučnih dostignuća i kao takva ne ograničava se samo na nivo savladanih naučnih dostignuća, nego obuhvata širenje i razvoj novih naučnih saznanja, kao i promene ličnosti zaposlenih i dostignuća ukupnog naučnog rada. Pored evaluacije naučno-istraživačkog rada često se srećemo sa evaluacijom samih naučnih radnika što podrazumeva napredovanje - prelazak u više naučno zvanje, evaluacijom naučnih radova, projekata i patenata.

## PROCES I METODE PLANIRANJA LJUDSKIH RESURSA

Samo planiranje ljudskih resursa je složen proces. U njegovoј osnovi je proces pretvaranja jedne vrste pokazatelja u potreban broj i strukturu ljudi. Planiranje mora osigurati da organizacija ima potreban broj i profil ljudi za postizanje planiranih poslovnih aktivnosti i ciljeva. To je dinamičan proces, posebno u organizacijama koje deluju u promenljivom i neizvesnom okruženju u kojem su i spoljašnje i unutrašnje promene česte i velike. To znači da se planovi stalno moraju revidirati i prilagođavati promenama i strategiji poslovanja. Akcenat koji se danas stavlja na planiranje ljudskih resursa rezultat je promene celokupnog pristupa i shvatanja strategijske važnosti ljudskih potencijala, ali i problemi i posledice s kojima se suočavaju preduzeća koja zanemaruju taj segment poslovnog planiranja. Kvalitet konačnih rezultata iskazanih u potrebama i planu ljudskih resursa zavisi od toga koliko se kvalitetno sprovodi svaka faza.

Predviđanje potreba kao i svaki proces predviđanja budućnosti nije samo struka nego i umeće, zbog toga planeri ljudskih resursa moraju da upotrebljavaju isto toliko svoju glavu koliko modele i formule. Za predviđanja potrebnog broja i strukture

ljudskih resursa primenjuju se brojne metode i modeli. U osnovi mogu se svrstati u dve kategorije - kvantitativne i kvalitativne metode i modeli.

## PROMENE U NAŠIM USLOVIMA

Uslovi tranzicije u kojima se naša zemlja nalazi suočili su nas sa problemom otpuštanja radnika na različitim nivoima zapošljavanja. Problem viška zaposlenih se javlja u javnoj upravi, kao posledica neadekvatnog zapošljavanja koje je nametala partijska i socijalna pripadnost određenim grupacijama od uticaja. Tako su često ljudi imali, makar izmišljena, radna mesta ali ne i posao. Takođe visoki stepeni modernizacije, automatizacije, kompjuterizacije procesa rada doveli su do objektivnog smanjenja potrebe za određenim kadrovima.

Sprovodenje tranzicionih promena u našoj zemlji nailazi na mnogo problema i objektivne i subjektivne prirode. Dosadašnja praksa koju su negovale naše organizacije kada su postojala posebna odeljenja razvoja i inovacija nije donosilo rezultate, jer su zaposleni bili odvojeni od procesa inoviranja koji je u novim organizacijama, pre svega, pripao njima samima. Organizacije moraju da prepoznu značaj inovacija za njihov razvoj i napredak i da stvore uslove u kojima će inovacije postati sastavni deo njihove organizacione kulture. Sa aspekta ljudskih resursa od presudnog značaja je stvaranje klime u organizaciji koja pruža podršku inovacijama. Kako bi se proces inoviranja uspostavio neophodno je jasno i precizno razmenjivanje ključnih poslovnih informacija, kao i stvaranje atmosfere u kojoj inovacija ima značajno mesto u sistemu radnih vrednosti.

Strategija organizacije često usmerava taktička i izvršna rešenja u pravcu smanjivanja broja zaposlenih i njihovo trenutno ili trajno otpuštanje sa posla. Ciljevi daunsajzinga u organizaciji se mogu svrstati u nekoliko kategorija: povećanje profita, smanjenje postojećih troškova, fleksibilnija organizaciona struktura, preusmeravanje poslovnih procesa i promena poslovnih aktivnosti.

Redukovanje broja zaposlenih najčešće je u zavisnosti od toga da li se zaposleni posmatraju kao potencijal čije mogućnosti je potrebno iskoristiti u procesu rada ili kao broj neophodnih zaposlenih koji mogu izvršavati zadati posao. Organizacije koje neguju odnos prema zaposlenima u pravcu tretiranja zaposlenih kao izvora ideja, inovacija i postignuća preuzimajući odgovornost na sebe i stvarajući klimu odgovornog restrukturiranja mogu i da računaju na motivisanost, lojalnost i posvećenost svojih zaposlenih. Mogućnosti izbegavanja daunsajzinga postoje u organizacijama koje brinu o svojim zaposlenima na sledeće načine: ukidanje prekovremenog rada i skraćivanje postojećeg radnog vremena, neplaćeni godišnji odmori i beneficije koje su se do tada plaćale i otvaranje novih aktivnosti koje nisu u skladu sa dosadašnjim poslovanjem organizacije.

Razvoj organizacije nije moguć bez adekvatne brige o svojim zaposlenima, a otpuštanje je način koji se može razumeti samo u okvirima političkog zapošljavanja kakvo je dominiralo kod nas. Ljudi su dobijali često i izmišljena radna mesta, a da nisu imali poslove koji bi bili povezani sa dobijenim radnim mestom. U svim ostalim

slučajevima, otpuštanje se može smatrati neuspehom organizacije koja nije u stanju da osmisli i ostvari nove poslove u okviru postojećih ili mogućih radnih aktivnosti. Uloga menadžera u ovim poslovima je presudna. Stvaranje preduslova u kojima se mogu uspostavljati novi poslovi, razvijati inicijativa i inovacije, jedini su uslovi za brže prevazilaženje tranzicije i njenih negativnih efekata. Specifičnost okruženja koja podrazumeva povećanu nestabilnost uslova privređivanja od ključnog značaja za razvoj organizacija je spremnost zaposlenih za promene i promena u njihovom dosadašnjem načinu ponašanja. Ukoliko je ljudima poznata svrha i prave vrednosti organizacije - ukoliko shvataju za šta se njihova organizacija zalaže - njihove pojedinačne spremnosti za promene će rezultirati koherentnošću širom sistema. U organizacijama koje znaju šta su i koje zaista veruju u ono šta objavljuju, ljudi su slobodni da kreiraju i doprinose. Takođe, klima koja neguje inovacije na svim nivoima će verovatno identifikovati i primenjivati inovacije relativno često, što će inspirisati i manja poboljšanja u svakodnevnim poslovima. Prihvatanje ciljeva organizacije kao sopstvenih i emotivno angažovanje u pravcu realizovanja tih ciljeva, doprinosi povećanju organizacione posvećenosti zaposlenih poslu koji obavljaju.

Za razvoj spremnosti za promene pojedinca u organizaciji neophodno je omogućiti radne uslove koji neće uticati negativno na samo obavljanje posla a u samom poslu dozvoliti i podržati: postojanje autonomije i odgovornosti u radu, formulisanje programa pozitivnog potkrepljenja, postojanje mogućnosti za fleksibilno obavljanje posla, usklajivanje zahteva posla sa mogućnostima i očekivanjima zaposlenih, olakšavanje obavljanja posla sa jasnim zahtevima i analizom posla, neprestano informisanje zaposlenih o finansijskim i razvojnim planovima organizacije, stalno učešće u odlučivanju o značajnim segmentima posla, postojanje osećanja sigurnosti, postojanje međusobnog poverenja, razvijanje verovanja u ono što rade, svest o značaju posla koji obavljaju, postojanje zajedničkog cilja i usaglašavanje ličnog cilja sa ciljevima organizacije. Razvoj ljudskih resursa podrazumeva sledeće aspekte razvoja: razvoj ljudskih potencija, razvoj procesa upravljanja, razvoj nivoa korišćenja znanja i razvoj komunikacija između pojedinaca, organizacionog znanja i tehnologija sa sistemom upravljanja njima.

Činjenica koja se ustanovljava u većini istraživanja kod nas, jasno pokazuje nepostojanje radnih vrednosti i jasnog vrednovanja radnih vrednosti. Lično i profesionalno uvažavanje dobro obavljenog posla je jedan od najvažnijih pokretača motivacije. Dobijanjem povratne informacije zaposleni uvidaju kakav je kvalitet njihovog rada i mogućnosti unapređivanja. U praksi se pokazalo da je poznavanje rezultata sopstvenog rada jedan od najmoćnijih i najuticajnijih podsticaja motivacije, jer omogućava takmičenje čoveka sa samim sobom i drugima. Zapaženo je da je čak i negativna informacija bolja od nepostojanja informacije. Povratna informacija mora biti tačna, pravovremena, iskrena i podsticajna na bolje rezultate. Dobra organizacija rada je suštinski motivator, naročito u uslovima u kojima ona gotovo i da ne postoji. Tek u jasno određenim zakonskim okvirima, u jasno definisanom okviru, možemo govoriti o razvoju ostalih parametara radne efikasnosti i efektivnosti.

## OTKRIVANJE MENEDŽERSKIH POTENCIJALA

Menadžeri su dragocen i važan resurs svake organizacije, ali istovremeno zbog činjenice da su za izgradnju dobrog menadžerskog tima potrebna velika ulaganja kao i mnogo vremena, uvrštavaju se i među najoskudnije resurse. Pri otkrivanju menadžerskih potencijala i njihovom razvoju treba imati na umu njihove osobne, profesionalne i poslovne, kao što su preduzetnost, komunikativnost, kreativnost, poznavanje metoda rukovođenja, pouzdanost, predanost poslu i preduzeću.

Za ocenu ličnosti važna je sposobnost vođenja ljudi i razvijanje pozitivnih osobina, delegiranje zadataka, komunikativnost, poznavanje posla, prosuđivanje sposobnosti planiranja, organizacije, ocena ličnih karakteristika saradnika i slično. Pri otkrivanju menadžerskih potencijala upotrebljavaju se brojne tehnike, poput psiholoških testova, upitnika, ocene kolega, intervjuja, preporuke i druge tehnike. Bitna pretpostavka za utvrđivanje menadžerskih potencijala i selekcije menadžera je određivanje dimenzija menadžerske motivacije i razrada instrumenata za njezino merenje i identifikaciju.

Pokazalo se da određeni stavovi pridonose izboru menadžerske karijere, a to su: pozitivni stavovi prema autoritetu i ljudima na pozicijama autoriteta, potreba za takmičenjem, potreba za dokazivanjem i potvrđivanjem, potreba za pokazivanjem moći, potreba za istaknutom pozicijom i ponašanjem, i potreba za odgovornošću i osjećaj odgovornosti. U prvoj fazi otkrivanja rukovodećih potencijala utvrđuju se menadžerove poželjne osobine nakon čega slede određivanje standardnih poslova menadžera, analiza poslovne strategije i stepen razvoja preduzeća i tek tada izbor menadžerskih talenata za školovanje ili postavljanje. Sam postupak otkrivanja rukovodećih potencijala složen je i težak, no znatno se može olakšati ukoliko su i mentori kandidata sposobni i spremni za to i ako su precizno definisani poslovi koje bi kandidat trebao obavljati.

## INFORMISANOST U PODRUČJU LJUDSKIH POTENCIJALA

Uspešno upravljanje razvojem i upotrebom ljudskih potencijala nije moguće bez informacionog sistema i informisanja u području delovanja vezanim za taj potencijal. Osnovni cilj informacionog sistema ljudskih potencijala u preduzeću je pravovremena informisanost svih zaposlenih o tome šta je bitno za njihovu aktivnost i međusobne odnose u sklopu delokruga njihovog delovanja u procesu rada, upravljanja i odnosa u preduzeću.

S obzirom na činjenicu da sistem informacija vezan za razvoj i upotrebu ljudskog potencijala zavisi od predmeta izvođačke i upravljačke aktivnosti mogući su modeli za razne namene: model informacija za utvrđivanje strategije i politike razvoja i upotrebe ljudskog potencijala, model za potrebe planiranja u području ljudskih potencijala i model za potrebe zapošljavanja. Postojanje informativnog sistema znatno olakšava obavljanje poslova evidencije o razvoju ljudskog potencijala, platama, troškovima vezanim za razvoj i upotrebu ljudskog potencijala, školovanju i usavršavanju. Time je bitno olakšan rad odeljenja ljudskih potencijala budući da su

im takvi izveštaji dostupni istovremeno sa postavljanjem zahteva od strane vlasnika i menadžera kompanije. Osim koncipiranja politike informisanja zaposlenih vrlo je bitna stavka i njihovo obučavanje kako bi sam informativni sistem funkcionisao.

## LJUDSKI POTENCIJALI I STRATEGIJSKI MENADŽEMENT

U svakom trenutku čovek pokreće više različitih motiva. U radnoj situaciji nismo uvek u mogućnosti, iz različitih razloga, da sledimo svoje potrebe i motive. Ponašanje čoveka u procesu rada je veoma često nepredvidivo i teško ga je razumeti. Pre svega se to odnosi na radne situacije u kojima nisu u potpunosti jasne propozicije i gde ne postoje zajednički interesi i vrednosti. Ne postoje tajne formule za motivisanje zaposlenih, nema kalkulacija koje donose trenutne uspehe u motivisanju, nema pravila koja važe u svakom pojedinačnom slučaju. Područje upravljanja ljudskim resursima se u oblasti motivisanja zaposlenih suočava sa nizom problema na koje ne zna uvek prave odgovore. Današnji menadžeri imaju složen zadatok da se i sami pripreme za nove oblike spremnosti za promene, za samomotivisanje i da tek tada mogu da se ozbiljno pozabave motivisanjem zaposlenih. Promene u poslovnom svetu koje se svakodnevno dešavaju, kreću se u pravcu traženja mogućnosti za život kojim bi čovek današnjice bio zadovoljniji. Kada se razmišlja o modernom motivisanju zaposlenih neophodno je uzeti u obzir potrebe i motive zaposlenih, njihova očekivanja, verovanja, vrednosti, ciljeve..., rukovodeći se principima razvoja, pravednosti, integrifući u njima moguće i željeno kako bi se što lakše realizovali. U svakom pristupu formulisanja strategije motivisanih radnika neophodno je na najoptimalniji način objediniti teorijske pristupe koncepte motivacije za rad, osnovne karakteristike ljudske prirode i zahteve samih organizacija. Motivacija za rad se mora posmatrati kao: proces u ličnosti pojedinca koji je u neprestanoj komunikaciji sa procesima u organizaciji, najneposrednija veza između pojedinca i organizacije, najbliža povezanost između teorije i prakse u menadžmentu i jedan od najvažnijih pokretača radne efikasnosti.

Otežavajući faktori u koncipiranju samostalnih modela motivisanja zaposlenih u našem društvu se može naći u specifičnostima kulture koja je zasnovana na egalitarizmu, gde su pravne regulative nejasne ili neadekvatne, gde je socijalna nesigurnost izražena i gde ne postoje zajednički interesi pojedinca i organizacije. Loša informisanost zaposlenih o poslovanju i o poslovnim rezultatima organizacije, kao i nepostojanje komunikacije na različitim nivoima upravljanja. Primena modela motivisanja zaposlenih nije moguća u organizacijama koje nisu spremne na promene i razvoj. Spremnost zaposlenih da sagledaju situaciju, kako bi se sa takvom realnošću borili je jedan od najznačajnijih elemenata u pripremi primene novih motivacionih modela.

Promene u organizaciji, kada je u pitanju čovek, nemoguće je izvesti bez promene u motivacionom sistemu, jer on zadire u sistem vrednosti zaposlenih i direktno je povezan sa kompletним organizacionim ponašanjem. Ono što je potrebno, jeste promena našeg mišljenja i sistema vrednosti u organizaciji, našeg opažanja

sopstvenog mesta u njoj i zajedničkog funkcionisanja. Preduzeće ima potrebu za ljudima i ljudi imaju potrebu za preduzećem i tek zajedničkim delovanjem ostvaruju ciljeve. Ljudski potencijali su osnovica na kojoj se gradi strategija preduzeća a svi resursi kao mašine, sirovine i kapital, ciljevi kao proizvodnost i zadovoljavanje potrošača dolaze od ljudi i na temelju njihovog delovanja. Izbor strategije ništa posebno ne znači ukoliko se ona ne transformiše u strategijski plan koji se potom implementira u praksi, te sprovede kontrola ostvarivanja izabrane strategije. Uz rukovođenje se obično veže i moć, koja predstavlja socijalni proces uticaja rukovodioca na ponašanje i akcije zaposlenih. Postoji pet osnovnih izvora moći (moć nagrađivanja, prinude, legitimite, referentna i znanja), a koje će tipove moći menadžer izražavati zavisi od situacije, okoline i vremena. Moć prinude je svakako najnegativnija s obzirom da se oslanja na strah.

Stil rukovođenja je veoma značajan za motivaciju zaposlenih jer direktno utiče na njihovu slobodu u radu, mogućnost odlučivanja, a time zapravo i na njihovu mogućnost isticanja i samozadovoljenja. Tako se kod autokratskog stila rukovođenja sve usmerava na moć menadžera i on upravlja uz pomoć nagrade i kazne, kod demokratskog se naglašava uloga zaposlenih u preduzeću i omogućena im je participacija u odlučivanju, dok je kod *laissez-faire* stila (slobodnog) zaposlenima data maksimalna samostalnost. Savremeni menadžeri sve su svesniji važnosti umeća rada sa ljudima te od presudne važnosti postaju njihove sledeće sposobnosti: da izaberu, treniraju i osposobljavaju zaposlene, da upravljaju svim vrstama konflikata između jakih pojedinaca i grupa, da utiču i pregovaraju na ravnopravnoj osnovi i da integrišu napor osoba različitih stručnih specijalnosti.

## OCENJIVANJE RADNE EFIKASNOSTI

Cilj ocenjivanja radne efikasnosti je da se zaposleni ohrabre i da im se pomogne da podignu svoju radnu efektivnost na viši nivo, da razviju svoje potencijale i usvoje nove veštine koje će im biti od koristi na poziciji na kojoj se nalaze, ali i na nekim drugim pozicijama koje ih čekaju u njihovom budućem profesionalnom životu. Vrednovanje efikasnosti na poslu je način da se zaposleni kao pojedinci, kao timovi i kao organizacija u celini, podstaknu na neprestano usavršavanje. To je prilika da se utvrde razvojne potrebe zaposlenih i da im se u skladu sa tim obezbede odgovarajući treninzi.

## RADNA NEEFIKASNOST

Problemi se najčešće javljaju zbog nepostizanja datog obima posla, nezadovoljavajućeg kvaliteta obavljenog posla, prekoračenja zadatih rokova, teškoća u komunikaciji sa menadžerom, kolegama ili klijentima. Dužnost menadžera je da istraži razloge nedovoljne efikasnosti zaposlenog. Važno je da menadžer ume da kreira neformalnu, prijateljsku i opuštenu atmosferu u kojoj se zaposleni neće osećati ugroženo i ponašati odbrambeno. Svaki menadžer treba da preispita da li su zaposlenom date odgovarajuće smernice i pružena adekvatna podrška, da li zaposleni

ima neke lične probleme koji ga ometaju u poslu, da li mu je već skrenuta pažnja da ne radi u skladu s onim što se od njega očekuje, da li je zaposleni u potpunosti shvatio šta se od njega traži, da li se radi o tome da zaposleni ne raspolaže potrebnim sposobnostima ili se samo radi o nedostatku određenih veština koje mogu da budu usvojene kroz odgovarajuću obuku ili su problemi, možda, vezani za ponašanje i stav koji zaposleni ima prema poslu. Kada se dođe do razloga zbog kojih je zaposleni neuspisan, sledeći korak je dolaženje do toga šta da se uradi kako bi se postiglo poboljšanje i koliko vremena zaposlenom dati za prevazilaženje problema. Menadžer mora da postigne saglasnost sa zaposlenim u vezi sa akcijom koju treba preduzeti kao i krajnjeg roka do kada poboljšanje treba da bude vidljivo.

Ako menadžer ne može da postigne saglasnost sa zaposlenim može da mu omogući da se obrati višoj instanci ili u slučaju da zaposleni ne nudi nijedno prihvatljivo opravdanje za svoj neuspeh menadžeru ne preostaje drugo nego da pokrene disciplinski postupak. Svi dogovori između menadžera i zaposlenog u vezi sa ciljevima i standardima rada, rokovima, merama uspešnosti, korektivnim aktivnostima i slično treba da budu u pisanoj formi.

## METOD ISTRAŽIVANJA

Kao glavni istraživački metod koristili smo *survey* metod, kako bi na odgovarajućem uzorku ispitanika na terenu prikupili željene podatke. Ove podatke obradili smo uz pomoć statističkih postupaka i tehnika kako bismo prikazali i protumačili dobijene rezultate, te na osnovu njih izveli odgovarajuće zaključke. U procesu istraživanja kombinovani su kvalitativni i kvantitativni pristup. Brojne specifičnosti srpske privrede tokom perioda tranzicije, koje se razlikuju od privreda u kojima su standardizovani postojeći instrumenti, naveli su nas da za potrebe ovog istraživanja razvijemo sopstveni instrument.

Podaci dobijeni istraživanjem obrađeni su:

- a) kvantitativno (odgovarajućom matematičko-statističkom metodom);
- b) kvalitativno (metodom indukcije, analize, sinteze, deskripcije).

## REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### Uzorak ispitanika

Od ukupno 87 ispitanjem je obuhvaćeno 85 svih profila i stepena obrazovanja, zaposlenih u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“. Anketiranje je izvršeno u prostorijama Instituta. Ispitanici su sami popunjavali upitnik, a ispitanje je trajalo u proseku 20 minuta.

Primećene su značajne oscilacije u pogledu odbojnosti i nespremnosti na saradnju prilikom popunjavanja upitnika. Naime, zaposleni sa nižim stepenom obrazovanja teže su pristajali na saradnju za razliku od visokoobrazovanih radnika koji su ne samo popunili upitnik nego su i usmeno izneli svoj stav o poslovanju Instituta.

## Vrednosna orjentacija zaposlenih

Vrednost se u psihologiji smatra subjektivnom pojavom, dispozicijom za određeno ponašanje i ciljevima na čije ostvarenje je ponašanje usmereno. Istraživanjem je utvrđeno kojim vrednostima života ispitanici lično teže, a za koje veruju da su danas najrasprostranjenije kod zaposlenih. Među ponuđenim vrednostima iz ličnog života ispitanici su trebali da izaberu one tri vrednosti koje su najbliže onome čemu oni lično težite u životu i tri za koje veruju da su danas najrasprostranjenije kod ljudi. Iz prikazanih podataka jasno se vidi da zaposleni najviše teže sledećim vrednostima: voditi dobar porodičan život – 30 ispitanika, odnosno 35,3%, biti široko i moderno obrazovan – 8 ispitanika, odnosno 9,5% i biti prirođan i neposredan – 7 ispitanika, odnosno 8,3%. Prema mišljenju ispitanika, vrednosti koje su najrasprostranjenije među ljudima su sasvim druge prirode od njihovih ličnih vrednosti. Oni u prvi plan ističu sledeće najrasprostranjenije vrednosti: steći i imati što više imovine – 30 ispitanika, odnosno 35,3%, imati dobre veze i poznanstva – 14 ispitanika, odnosno 16,5% i brzo i lako se obogatiti – 11 ispitanika, odnosno 13%.

Na pitanje: Koliko ste zadovoljni upravom Instituta, ispitanici su odgovorili: 48% ispitanika (41) je zadovoljno upravom, 17% (15) ispitanika nisu zadovoljni upravom Instituta, 30% (25) ispitanika je odgovorilo da im je svejedno kakva je uprava Instituta i 5% (4) nisu odgovorili. O tome koliko su zaposleni uključeni u proces dogovaranja i odlučivanja vezano za organizaciju poslova na Institutu, ispitanici su odgovorili: manje nego što treba 60% (52) ispitanika, koliko i treba 30% (25) ispitanika i 10% (8) ispitanika daleko manje nego što treba. Da li smatraju opravdanim da zaposleni povremeno ocenjuju svoje menadžere (u smislu njihove pripremljenosti za posao, umešnosti u komunikaciji sa zaposlenima, načinu ophođenja i dodeljivanja posla) ispitanici su odgovorili: 85% (73) ispitanika odgovorilo je potvrđno, a samo 15% (12) ispitanika dalo je odgovor „Nisam siguran/na”.

Na pitanje: „Menadžer nije spremjan čuti kritiku podređenog vezanu za efikasnost poslovanja“ ispitanici su imali sledeći stav: 30% (25) ispitanika se slažu sa navedenom tvrdnjom, 47% (40) ispitanika su odgovorili da ne znaju da li su menadžeri spremni čuti kritiku, 20% (17) ispitanika ne slažu se sa pomenutom tvrdnjom i 3% (3) ispitanika nisu dali komentar na pomenutu tvrdnju. Na pitanje: „Menadžeri su stručni i primenjuju savremene metode u obavljanju radnih zadataka“, 60% (50) ispitanika smatraju da je takvih menadžera u Institutu oko 50%, 16% (13) ispitanika misli da takvih u Institutu ima mnogo, 13% (12) takvih je veoma mnogo i 11% (10) ispitanika smatra da je takvih menadžera malo.

Na pitanje: „Da li su menadžeri visoko motivisani - orjentisani na organizacione i naučne uspehe“, da li su nepristrasni, kreativni i otvoreni za nova iskustva, 72% (61) ispitanika smatra da je takvih oko pola menadžera koji rade u Institutu, 16% (13) ispitanika misli da takvih menadžera ima mnogo i 12% (11) ispitanika misli da je takvih menadžera malo.

Na pitanje: „Da li menadžeri nastoje da podređeni angažuju sve svoje fizičke i mentalne kapacitete, svakom pojedinačno objašnjavaju, daju im instrukcije šta treba da urade, ukazuju im na dobre i loše strane rada i zajedno analiziraju postignuća u grupi”, zaposleni su imali sledeći stav: 12% (11) ispitanika misli da je takvih menadžera mnogo, 11,7% (9) ispitanika misli da je takvih oko pola, 17% (15) ispitanika misli da je takvih menadžera malo i 60% (50) ispitanika izjasnilo se da je takvih menadžera u Institutu veoma malo.

„Menadžere karakteriše ne zavisno odlučivanje i isticanje ličnog autoriteta. Planira i donosi odluke nezavisno od zaposlenih, ne objašnjava svoje postupke, ne pravi kompromise pri rešavanju problema i drže se na rastojanju od podređenih.” 12% (11) ispitanika misli da je takvih menadžera mnogo, 10% (8) ispitanika misli da je takvih oko pola, 18% (16) ispitanika misli da je takvih menadžera malo i 60% (50) ispitanika misli da je takvih menadžera u Institutu veoma malo. „Da li menadžeri omogućavaju participaciju i odlučivanje zaposlenih, traže njihovo mišljenje za pojedinačne probleme, da učestvuju u donošenju odluka o načinu rada, podstiču zaposlene da iznose sugestije i postavljaju sopstvene ciljeve?” 59% (51) ispitanika smatra da je takvih oko pola menadžera koji rade u Institutu, 30% (25) ispitanika misli da takvih menadžera ima mnogo i 11% (9) ispitanika misli da je takvim menadžera malo. Na pitanje: „Da li zaposleni imaju pasivan odnos prema uticaju spoljnih faktora (politika, Ministarstvo za poljoprivrednu, Ministarstvo za nauku i tehnologiju...) na rad Instituta?”, ispitanici su reagovali na sledeći način: 50% (42) ispitanika ne zna da li zaposleni imaju pasivan stav na uticaj spoljnih faktora na rad Instituta, 30% (25) ispitanika se slaže da zaposleni imaju pasivan stav i 20% (18) ispitanika se ne slaže da zaposleni u Institutu imaju pasivan stav prema uticaju spoljnih faktora na rad Instituta. „Da li ste zadovoljni sredstvima koje Ministarstvo za nauku i tehnologiju ulaže u naučne projekte Instituta?”, ispitanici su odgovorili na sledeći način: 60% (51) ispitanika je zadovoljno sredstvima koje Institut dobija od Ministarstva na ime finansiranja naučnih projekata, 16,5% (14) ispitanika nije zadovoljno, 20% (17) ispitanika je odgovorilo da im je svejedno koliko para Ministarstvo ulaže u naučne projekte Instituta i 3,5% (3) ispitanika nije se izjasnilo.

## ZAKLJUČAK

Stavovi zaposlenih su da je menadžerski tim Instituta visoko motivisan i orijentisan na organizacione i naučne uspehe, otvoren i spreman da prihvati nova iskustva, uprkos činjenici da se nauka u našem društву nalazi na ne zavidnom mestu, bar kada je u pitanju finansiranje nauke.

Stavovi zaposlenih sa naučnim zvanjem (doktori nauka) imaju formiran gotovo isti pozitivan stav prema menadžerima, naučno-istraživačkim projektima i ocenjivanju individualnih radnih rezultata. Slične stavove po ovim pitanjima su formirale i ostale grupe sa nižim stepenom kvalifikacije. Stavovi ovih grupa su bili uopšteni. Stavovi zaposlenih nedvosmisленo pokazuju da u Institutu postoji

zadovoljavajući potencijal onih kvalifikacija koji su najneposrednije odgovorne za uspešnu realizaciju naučnih i istraživačkih projekata.

Stavovi zaposlenih ukazuju da naučne radnike i istraživače saradnike Instituta karakteriše visoka osposobljenost (imaju veliko znanje, visoku osposobljenost i iskustvo), visoka motivacija i posvećenost poslu, odlične komunikacije sa Ministarstvom za nauku i tehnologiju, Ministarstvom za poljoprivredu, Izvršnim većem AP Vojvodine, kao i sa menadžerima iz privrede i farmaceutske industrije.

## LITERATURA

1. Bahtijarević i sar.: Menadžment ljudskih potencijala. Zagreb: Golden marketing, 1999.
2. Kljajić, R., Prokić, Vera: Bibliografija : 2000-2005. Novi Sad, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, 2005.
3. Belbin, M., Beyond the Team - Why They Succeed or Fail. Oxford: Butterwoth Heinemann, 2000.
4. Bojanović, R.: Psihologija međuljudskih odnosa. Beograd, Naučna knjiga, 1988.
5. Kutlača Đ.: Upravljanje ljudskim resursima, Skripta-teze i prezentacije po temama. Novi Sad – Beograd, Fakultet za menadžment, 2003.
6. Stojanović Jelena: Projektovanje alata za evaluaciju radne efikasnosti naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad„, magistarski rad, Novi Sad: Fakultet za Menadžment, 2008.

Primljeno: 25.02.2009.

Odobreno: 03.03.2009.

# **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 evidencijski 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 nazine 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. Uredaji ili aparati se takođe označavaju njihovim trgovackim 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 tabele) 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 ogledi izvedeni, navesti pun naziv metoda koje su korišćene u ispitivanjima, materijal i životinje na kojima su izvedena ispitivanja.

**Rezultati.** Rezultate prikazati pregledno uz pomoć tabela ili grafikona. Svuda treba da stoji redni broj i tekst, koji opisuje šta određena slika, tabela, grafikon prikazuje. Redni broj sa tekstrom 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 radeve, 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, Brucelozna svinja, Beograd: Poljoprivredni fakultet, 2000, str. 47-49.

**4. Članak u zborniku radova sa naučno-stručnog skupa:**

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

## **Napomena**

Rad koji ne ispunjava sve gore navedene uslove neće biti poslat na recenziju i biće vraćen autorima da ga dopune i isprave.

## **Adresa časopisa**

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad  
Rumenački put 20, tel. 021/ 518-008, fax. 021/518-544, e-mail: arhiv@niv.ns.ac.yu

## **NOTE FOR CONTRIBUTORS**

**ARHIVE 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, Brucelozna svinja, Beograd: Poljoprivredni fakultet, 2000, str.47-49

**4. Articles in proceedings:**

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

**Note**

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

**Address of the journal**

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad

Rumenački put 20, tel. 021/ 518-008, fax. 021/518-544, e-mail: arhiv@niv.ns.ac.yu